

Artykuł przeglądowy

Uwarunkowania genetyczne odporności na wysoce zjadliwą grypę ptaków u kur

Wioleta Drobik-Czwarno^{1#}, Anna Wolc^{2,3},
Kornelia Kucharska⁴, Elżbieta Martyniuk¹

¹Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Zwierzętach, Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt,

ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; #e-mail: wioleta_drobik@sggw.pl

²Iowa State University, Department of Animal Science, Stange Road, 239E Kildee Hall, Ames, IA 50010, USA

³Hy-Line International, Dallas Center, IA 50063, USA

⁴Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Zwierzętach, Katedra Biologii Środowiska Zwierząt, Zakład Zoologii, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Wysoce zjadliwa grypa ptaków (ang. *Highly Pathogenic Avian Influenza* – HPAI) stanowi ogromne zagrożenie dla produkcji drobiarskiej, stwarza również ryzyko epidemiologiczne dla populacji ludzkiej. Obecnie stosowane narzędzia kontroli obejmują przede wszystkim upowszechnienie zasad bioasekuracji, a w przypadku zakażenia – likwidację stad i wyznaczanie stref ochronnych. Wśród strategii alternatywnych, które mają na celu walkę z wirusem HPAI wymienia się między innymi szczepienia, modyfikacje genetyczne oraz selekcję genetyczną, mającą na celu zwiększenie ogólnej i specyficznej odporności ptaków. Strategie te wymagają identyfikacji genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną przeciwko HPAI. Dotychczasowe badania pozwoliły na wytypowanie wielu genów, które mogą być powiązane ze zróżnicowaną reakcją gatunkową lub osobniczą na zakażenie. Jak dotąd największej uwagi poświęcano genom biorącym udział w regulacji nieswoistej odpowiedzi organizmu, która ma na celu zapobieganie zakażeniu oraz ograniczenie namnażania i rozprzestrzeniania się wirusa. Do najczęściej wymienianych kandydatów dla kur niosek należą między innymi geny z grupy ISG oraz rodziny receptorów RIG-I-podobnych. Białka kodowane przez geny z rodziny BTLN, defensyny oraz białka powiązane z procesami apoptozy były również łączone ze zróżnicowaną odpowiedzią na HPAI. W ostatnich latach podejmowano coraz więcej badań nad identyfikacją uwarunkowań genetycznych wpływających na różnice międzyosobnicze w odpowiedzi na HPAI u kur. Dane zgromadzone w czasie epidemii w Stanach Zjednoczonych z wiosny 2015 roku oraz z Meksyku z lat 2012-2016 umożliwiają dokładniejsze spojrzenie na ten problem. Dotychczas zidentyfikowano wiele genów powiązanych z odpowiedzią

immunologiczną, ale ich indywidualna rola w warunkowaniu przeżywalności ptaków wymaga dalszych badań. Wstępne wyniki wskazują, że uwarunkowania genetyczne odporności na HPAI są bardzo złożone i mogą różnić się zarówno w przypadku poszczególnych szczepów wirusa, jak i linii ptaków.

SŁOWA KLUCZOWE: wysoce zjadliwa grypa ptaków / uwarunkowania genetyczne odporności / kury nioski

Wysoce zjadliwa grypa ptaków (ang. *Highly Pathogenic Avian Influenza* – HPAI) ma ogromny wpływ na produkcję drobiarską, gdyż powoduje wysoką śmiertelność ptaków, konieczność eutanazji wszystkich zakażonych stad oraz problemy z eksportem mięsa i jaj. Przypadki zakażenia HPAI występowały na całym świecie, w ostatnich latach miały one miejsce również na terenie Polski [35]. Dotychczas podjęto wiele prac mających na celu opracowanie strategii, które pozwoliłyby zapobiegać bądź ograniczać negatywne skutki epidemii HPAI u drobiu. Obecnie najskuteczniejszym sposobem walki z HPAI jest przestrzeganie zasad bioasekuracji. Przy potwierdzeniu obecności wirusa praktykowana jest utylizacja wszystkich ptaków w miejscu zakażenia oraz wprowadzenie szczególnego nadzoru weterynaryjnego w promieniu 3 oraz 10 km, poprzez wyznaczenie stref ochronnych. Działania te są jednak niezwykle kosztowne, dlatego cały czas trwają prace nad skuteczniejszymi strategiami walki z wirusem. Jedną z metod są szczepienia ochronne, które są obecnie stosowane w niektórych krajach [14]. Mimo bezsprzecznych zalet, takich jak ograniczenie rozprzestrzeniania się wirusa, zmniejszenie śmiertelności i mniejsze straty ekonomiczne, rozwiązanie to ma jednak sporo wad [6]. Poza ograniczoną skutecznością szczepień, problematyczna jest również bardzo duża zmienność wirusa grypy, co powoduje konieczność prawidłowej predykcji oraz częstej modyfikacji składu szczepionki. Ponadto, szczepienia mogą powodować problemy w imporcie oraz eksporcie ptaków, z uwagi na trudności w odróżnieniu ptaków zaszczepionych od tych, które miały styczność z wirusem w warunkach naturalnych. Aby rozwiązać ten problem powstały takie strategie jak DIVA (ang. *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*), stosowane we wszystkich krajach europejskich, w tym w Polsce, nie są one jednak rozwiązaniem idealnym [34].

Wirus grypy należy do rodziny *Orthomyxoviridae* i składa się z jednoniciowego RNA o ujemnej polarności, nielicznych białek oraz osłonki lipidowej, w skład której wchodzi dwa typy glikoprotein, hemaglutynina (H) i neuraminidaza (N), odpowiedzialne za wniknięcie do komórki gospodarza oraz uwolnienie wirusów potomnych. Głównym składnikiem komórki gospodarza odpowiedzialnym za rozpoznanie receptorów wirusa przez hemaglutyninę jest kwas sialowy, w uproszczeniu SA_{2,3}Gal dla grypy ptaków oraz SA_{2,6}Gal dla grypy człowieka [29]. W następnym etapie wirus wnika do komórki na drodze endocytozy i jest przygotowywany do strawienia przez lizosomy. Na skutek aktywacji hemaglutyniny dochodzi jednak do połączenia osłonki wirusa z błoną endosomu, uwolnienia materiału genetycznego wirusa do wnętrza komórki oraz jego replikacji. Mechanizmy odpowiedzialne za unieszkodliwienie i eliminację cząstek wirusa grypy oraz mające znaczenie podczas jego wniknięcia do komórki są obiektem licznych badań prowadzonych na całym świecie. Uznaje się na przykład, że różnice w zjadliwości

między poszczególnymi wirusami należącymi do grup HPAI i LPAI (ang. *Low Pathogenic Avian Influenza*) są powiązane ze szczepem wirusa i tropizmem tkankowym, ale również specyficzną odpowiedzią gospodarza [27]. W ostatnich latach zintensyfikowano badania nad genetycznym uwarunkowaniem odporności, a więc nad różnicami międzygatunkowymi i międzyosobniczymi na poziomie DNA.

Modyfikacje genetyczne

Strategią alternatywną, która w ostatnich latach jest coraz częściej brana pod uwagę w walce z HPAI są modyfikacje genetyczne. Pierwsza udana próba stworzenia transgenicznego kury wykazującego odporność na grypę ptaków miała miejsce w 2011 roku [24]. Za pomocą wektorów lentiwirusowych Lyall i wsp. [24] wprowadzili do genomu kury cząsteczki RNA o strukturze typu „spinki” (ang. *hairpin*). Wprowadzona sekwencja jest miejscem wiązania polimerazy wirusa wysoce zjadliwej grypy ptaków i wykazuje właściwości hamowania aktywności polimerazy wirusa *in vitro*. Na skutek modyfikacji uzyskano kury, które były podatne na zakażenie, jednak ilość wydalanego przez nie wirusa uległa znacznemu zmniejszeniu, co potencjalnie może znacznie ograniczyć rozprzestrzenienie się zakażenia w stadzie. Jak dotąd nie jest jednak znany wpływ tej modyfikacji na wirusa grypy typu LPAI ani jej ewentualny wpływ na produktywność i żywotność zmodyfikowanych zwierząt w warunkach produkcyjnych.

Kolejną próbą uzyskania kur odpornych na wysoce zjadliwą grypę ptaków jest metoda zaproponowana przez Byun i wsp. [5]. W doświadczeniu tym kury zmodyfikowano tak, aby wykazywały ekspresję jednołańcuchowego zmiennego fragmentu 3D8 (ang. *single chain variable fragment – scFv*), który wykazuje duże powinowactwo do nukleoproteiny wirusa grypy. Autorzy wskazali, że obecność tej krótkiej wstawki scFv może chronić gospodarza także przed szerokim wachlarzem innych patogenów wirusowych. Wadą tego rozwiązania jest jednak konieczność ścisłego kontrolowania poziomu ekspresji scFv, ponieważ niekontrolowany wzrost jego ilości w organizmie może prowadzić do degeneracji kwasów nukleinowych komórki gospodarza.

W 2018 roku ukazała się praca Rohaim i wsp. [30], w której opisano sposób uzyskania transgenicznego kury wykazującego stabilną ekspresję genów z rodziny *chIFIT5* (ang. *IFN-induced proteins with tetratricopeptides repeats 5*). Zmodyfikowane genetycznie ptaki zakażone kliniczną dawką wirusów HPAI oraz choroby Newcastle wykazywały zwiększoną odporność. Podanie dawki letalnej prowadziło do śmierci części ptaków, obserwowano jednak opóźnienie występowania objawów choroby, niższą śmiertelność oraz ograniczone siewstwo wirusa po zakażeniu. Obserwacje te mogą wskazywać, że stabilna ekspresja genów z rodziny *chIFIT5* zmniejsza nasilenie objawów klinicznych i jest jedną ze składowych w walce organizmu ptaka z zakażeniem retrowirusem.

Mimo coraz liczniejszych prób, nie udało się dotychczas upowszechnić modyfikacji genetycznych jako formy walki z wirusem HPAI ani innymi patogenami występującymi u kur. Warto zauważyć, że poza ograniczeniami wynikającymi z samej technologii, wykorzystanie w produkcji organizmów zmodyfikowanych genetycznie spotyka się z wieloma barierami, zarówno ekonomicznymi, prawnymi, jak i brakiem akceptacji społecznej [23].

Genetyczne uwarunkowanie odporności u kur

Genetyczne uwarunkowania odporności na HPAI u ptaków wynikają z różnic międzygatunkowych, międzyrasowych, jak i międzyosobniczych. W ostatnich latach bardzo dużo uwagi poświęcono przede wszystkim różnicom międzygatunkowym, które były wielokrotnie analizowane u ptaków. Największą wrażliwością na zakażenie wirusem grypy ptaków charakteryzują się gatunki z rzędu Galliformes, głównie kury i indyki. Na przykład niektóre podtypy wirusa HPAI wywołują słabą odpowiedź zapalną oraz brak objawów infekcji u kaczek, podczas gdy u kur domowych obserwowana jest bardzo wysoka śmiertelność [4]. W tym przypadku zainteresowanie środowiska naukowego miało na celu przede wszystkim poznanie odpowiedzi immunologicznej nieswoistej. Podejrzewa się, że różnice międzygatunkowe w reakcji na HPAI między kurami a kaczkami mogą być powiązane z brakiem lub obniżoną ekspresją kluczowych genów antywirusowych, takich jak gen RIG-I (ang. *Retinoic Acid-inducible Gene-1*) [16, 25]. Gen ten koduje białko należące razem z MDA5 (ang. *Melanoma Differentiation-Associated Gene 5*) oraz LGP2 (ang. *Laboratory of Genetics and Physiology 2*) do rodziny receptorów RIG-I-podobnych oraz w szerszym kontekście do grupy receptorów rozpoznających patogeny, tzw. PRR (ang. *Pattern Recognition Receptors*). Receptory RIG-I-podobne są receptorami wewnątrzkomórkowymi i biorą czynny udział w odpowiedzi przeciwwirusowej u wielu gatunków zwierząt, rozpoznając wirusowy RNA obecny w zakażonej komórce [15]. Do ich zadań należy uruchomienie produkcji cytokin oraz interferonów aktywujących dalszą odpowiedź przeciwwirusową. Barber i wsp. [1] wykazali, że wprowadzenie genu RIG-I kaczki do komórek fibroblastów kury domowej prowadzi do zwiększonej ekspresji wielu genów biorących udział w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, takich jak MX1, PKR, OASL i IFN- β , co powoduje z kolei ograniczenie tempa replikacji wirusa wysoce zjadliwej grypy ptaków. Niektóre badania sugerują, że to gen MDA5 może rekompensować brak genu RIG-I u kur [22]. Badania Ranaware i wsp. [28] wskazują, że w komórkach zainfekowanych wirusem HPAI podwyższoną ekspresję wykazały między innymi geny MDA5, TLR3 oraz NLRC5.

Do genów, które są powiązane z odpowiedzią immunologiczną organizmu na HPAI zalicza się również geny z grupy ISG (ang. *Interferon Stimulated Genes*), do których należą między innymi MX, OAS, PKR, IFITM and IFIT5. Białka z rodziny IFITM (ang. *Interferon Induced Transmembrane Proteins*) należą do białek przeciwwirusowych, które utrudniają wnikanie wirusów do komórek gospodarza, a ich rola w odpowiedzi na wirusa grypy zastała wcześniej dobrze udokumentowana u ssaków [3]. Mechanizm działania genów z rodziny IFITM polega na zmianie składu lipidowego błony komórkowej oraz zmniejszeniu jej płynności, co ogranicza fuzję osłonki wirusa z błoną cytoplazmatyczną [20]. Związek między HPAI a tą rodziną białek u ptaków potwierdzono w pracy Smith i wsp. [33], w której dokonano sekwencjonowania transkryptomu kaczek oraz kur zakażonych szczepami H5N1 oraz H5N2. Wykazano, że u kur właściwie nie zachodzi zwiększona ekspresja genów IFITM1, IFITM2 oraz IFITM3. Jedynie w przypadku genu IFITM3 obserwowano niewielki wzrost ekspresji w początkowej fazie infekcji H5N1, nie było to jednak odnotowane w dalszych etapach choroby. W przeciwieństwie do kur, kaczki reagują na zakażenie H5N1 poprzez znaczne zwiększenie ekspresji genów IFITM1, IFITM2 oraz

IFITM3 w płucach oraz jelicie krętym. Przyjmuje się więc, że jedną z przyczyn odmiennej odpowiedzi na infekcję wirusem HPAI obserwowanej u tych gatunków może być właśnie różnica w ekspresji genów z rodziny IFITM.

Obecny stan wiedzy wskazuje, że jedną z głównych przyczyn bardzo wysokiej śmiertelności ptaków przy zakażeniu HPAI jest nieprawidłowa regulacja odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza. Badania Ranaware i wsp. [28] wykazały, że zakażenie układu oddechowego szczepem HPAI H5N1 prowadziło do znacznie zwiększonej ekspresji interferonów typu I, cytokin, chemokin oraz genów z rodziny ISG. Dla porównania, w powyższych badaniach nie zaobserwowano takiego efektu dla szczepu LPAI H9N2. Szczególne znaczenie ma w tym przypadku zbyt duża produkcja cytokin, tzw. hipercytokinemia, co określa się również pojęciem burzy cytokin [4]. Zjawisko to prowadzi do wysokiej ekspresji cytokin prozapalnych oraz uszkodzenia narządów wewnętrznych gospodarza. Warto również zauważyć, że opóźniona produkcja cytokin prozapalnych może przyczyniać się do zwiększonej zjadliwości szczepu H7N1 HPAI u kur [7]. W badaniach Kuchipudi i wsp. [19] zaobserwowano z kolei, że transkrypcja genów, w której uczestniczy czynnik transkrypcyjny STAT-3 może odgrywać ważną rolę w różnicowaniu reakcji występujących u kur i kaczek. Mechanizmy obronne przeciwko grypie ptaków u kaczek obejmują również duże zróżnicowanie w genach kodujących β -defensyny oraz receptorów należących do rodziny BTLN (ang. *butyrophilin-like*) [13]. Rola genów z tych rodzin była już wcześniej zauważona u ssaków, jednak ich działanie u ptaków nie było potwierdzone. W pracy Huang i wsp. [13] zauważono, że wiele tych genów uległo duplikacji w genomach kaczek, czego nie obserwowano u kur. Podejrzewa się, że warianty liczby kopii w obrębie tej rodziny genów miały istotny wpływ na ewolucję genomów kaczek w odpowiedzi na kontakt z wirusem grypy i mogą warunkować przeżycie zakażenia przez gospodarza.

Podejrzewa się, że geny uczestniczące w regulacji procesu apoptozy mogą być odpowiedzialne za różnice we wrażliwości ptaków na poszczególne podtypy i szczepy wirusa. Według badań Kuchipudi i wsp. [18] komórki kaczek podlegały szybkim procesom apoptozy po infekcji szczepem grypy ptaków o niskiej zjadliwości H2N3, grypy świń H1N1 oraz wysoce zjadliwym szczepem grypy ptaków H5N1. Wyniki uzyskane *in vitro* na komórkach kaczek pekin, które były odporne na zakażenie, odbiegały od wyników zaobserwowanych w komórkach kur, u których procesy apoptozy przebiegały wolniej z mniejszą fragmentacją DNA oraz aktywacją szlaku kaspaz. Doprowadziło to w konsekwencji do zwiększenia liczby komórek, które ulegały zakażeniu. Ponadto, po zainfekowaniu komórek płucnych kaczek szczepem H5N1, który jest dla nich śmiertelny, obserwowano podobne wzorce apoptozy, jak w komórkach kur. Zakłada się, że różnice te wynikają z wykształconego u gospodarza mechanizmu odporności na grypę typu A, a utrata zdolności do szybkiej apoptozy skutkuje zwiększoną wrażliwością na nowo powstałe szczepy H5N1 u kur.

Słabo poznany dotychczas zagadnieniem są uwarunkowania genetyczne różnic międzyrasowych oraz międzyosobniczych w reakcji na HPAI. W nielicznych dotąd badaniach obserwowano zmienność pomiędzy liniami oraz rasami ptaków w podatności na zakażenie różnymi szczepami HPAI [26, 31, 38]. Przyjmuje się, że różnice międzyosobnicze są powiązane głównie z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną [31]. Jednym z genów, któ-

rych polimorfizm był łączony ze zróżnicowaną reakcją na zakażenie HPAI jest gen MX1, jednak dotychczasowe wyniki badań nie są jednoznaczne. Niektórzy autorzy sugerują, że mutacje takie jak S631N mogą zwiększać działanie przeciwwirusowe genu MX1 [21], mimo że wcześniejsze badania wykazywały brak takiej aktywności u kur [2]. Dodatkowo wykazano, że mutacja S631N ma niższą frekwencję w rasach wykorzystywanych w produkcji towarowej, co sugeruje, że ich właściwości antywirusowe mogły zostać utracone na skutek intensywnej selekcji [21]. Jak dotąd badania prowadzone *in vivo* oraz *in vitro* nie dały jednoznacznej odpowiedzi na temat roli genu MX1 w odpowiedzi na zakażenie HPAI [32, 37].

Badania asocjacyjne genomu

Według informacji CRS (ang. *Congressional Research Service*) straty w wyniku epidemii wywołanej szczepem H5N2, która wybuchła w Stanach Zjednoczonych wiosną 2015 roku przekroczyły miliard dolarów [12]. Choroba charakteryzowała się wysoką śmiertelnością, na poziomie ponad 99%, obserwowano jednak pojedyncze ptaki, które przeżywały kilka tygodni i nie wykazywały objawów klinicznych [8]. Niektóre z ptaków wykazywały dodatni poziom przeciwciał, co wskazuje, że miały kontakt z wirusem, jednak zakażenie przebiegało bezobjawowo. Materiał zabezpieczony w trakcie trwania tej epidemii pozwolił na podjęcie prac mających na celu identyfikację różnic w genomie pomiędzy ptakami, które przeżyły zakażenie, będącymi grupą badawczą oraz podatną grupą kontrolną [8, 9, 39]. Z uwagi na biobezpieczeństwo, materiał biologiczny do grupy kontrolnej musiał być pobrany od ptaków, które nie miały kontaktu z HPAI, pochodzących z tych samych systemów krzyżowania. Materiał badawczy stanowiło łącznie 1119 ptaków (tab. 1).

Tabela 1 – Table 1

Liczba próbek zgenotypowanych na komercyjnej mikromacierzy 600 k. Linie komercyjne oznaczone 1, 2, 3, 4, to komercyjne linie niosek należące do czterech różnych firm [8, 9]

Number of samples genotyped on a 600 k commercial microarray. Lines 1, 2, 3 and 4 are commercial lines of layers belonging to four breeding companies [8, 9]

Linie Line	Podtyp wirusa Virus subtype	Lokalizacja Location	Liczebność grup Group size		
			kontrolna control	badana experimental	razem total
1	H5N2	US Iowa, 2015	37	44	81
2	H5N2	US Iowa, 2015	49	52	101
3	H5N2	US Iowa, 2015	45	47	92
4	H5N2	US Iowa, 2015	186	104	290
4	H7N3	Meksyk, 2012	95	460	555
Razem Total			412	707	1119

Wszystkie ptaki z linii 1-4 zgenotypowano na komercyjnej mikromacierzy 600 k Affymetrix [17]. Analiza bioinformatyczna obejmowała analizę asocjacyjną w skali całego genomu, przeprowadzoną z podziałem na linie oraz szczep wirusa [8, 9]. Do analiz wykorzystano łącznie 420 458 segregujących markerów typu SNP, z których po kontroli jakości wyselekcjonowano 348 161 markerów SNP dla próbek z Meksyku oraz 340 791 markerów SNP dla próbek z Iowa. Przeprowadzono standardową analizę GWAS za pomocą regresji liniowej, modelu mieszanego w ASREML [11] oraz metodą Bayes B w programie Gensel [10]. Analizie poddano zarówno pojedyncze markery, jak i haplotypy wyodrębnione jako sąsiadujące 100 tysięcy par zasad. Brak istotnych sygnałów podczas zbiorczej analizy wszystkich próbek skłonił do przypuszczenia, że genetyczne uwarunkowania przeżycia infekcji mogą różnić się w zależności od szczepu wirusa odpowiedzialnego za epidemię. Najważniejsze wyniki dotyczące linii komercyjnej Hy-Line 4 przedstawiono w tabeli 2.

Zidentyfikowano cztery regiony powiązane z przeżyciem zakażenia szczepem H5N2 w Iowa oraz trzy regiony powiązane z przeżyciem zakażenia szczepem H7N3 w Meksyku (tab. 2). Największą zmienność pomiędzy ptakami, które przeżyły oraz grupą kontrolną wyjaśniał region zidentyfikowany dla epidemii w Meksyku, który znajdował się na chromosomie 1, 126 Mpz. W regionie tym najbliższe miejsca sygnału znajdował się między innymi gen kodujący neuroliginę 4 (NLGN4X), będącą białkiem błonowym 1 typu zlokalizowanym najczęściej na powierzchni neuronów. Według niektórych doniesień wirus grypy ptaków może replikować się w komórkach nerwowych, a wysoka skuteczność tego procesu ogranicza szanse przeżycia zakażonych osobników [7]. Drugi istotny sygnał dla tej samej grupy wskazywał na chromosom 5, 39 Mpz, gdzie znajduje się gen kodujący neureksynę 3 (NRXN3), białko związane z funkcją synaps. Neuroligina należy do rodziny białek wiążących neureksyny, co może wskazywać na związek funkcjonalny pomiędzy tymi genami. Dodatkowo obydwa geny znajdowały się w pobliżu sekwencji mikro-RNA, które odgrywają istotną rolę w interakcjach żywiciela z patogenem, także w odniesieniu do grypy ptaków [36].

Dla próbek pochodzących od ptaków z Iowa najsilniejszy sygnał został zidentyfikowany na chromosomie 7, 28 Mpz. Region pokrywał się z lokalizacją genu DPP10 (ang. *dipeptidyl-peptidase 10*), który jest białkiem błonowym zaangażowanym w komunikację komórek i odpowiedź komórkową. Pozostałe regiony zlokalizowane na chromosomie 9 oraz 15 obejmowały takie geny, jak BCL6 (ang. *B-cell CLL/lymphoma 6*) i ZNF639 (ang. *zinc finger protein 639*) – pełniące istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej organizmu, czy gen MAPK1 (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase 1*) zaangażowany w procesy apoptozy.

W badaniach prowadzonych na 3 liniach kur, które nie miały podłoża genetycznego Hy-Line również udało się wyodrębnić szereg genów mogących mieć znaczenie przy zakażeniu HPAI [9]. Uzyskane wyniki wykazują jednak, że linie różniły się pod względem wytypowanych regionów, ponadto nie otrzymano silnych sygnałów, które jednoznacznie wskazywałyby na związek pojedynczego regionu z przeżywalnością HPAI. Badania te potwierdziły, że uwarunkowania genetyczne mają wpływ na przeżywalność ptaków podczas epidemii wywołanej HPAI, jednak wytypowane regiony oraz geny kandydujące muszą być poddane dalszym badaniom, w celu potwierdzenia otrzymanych wyników.

Tabela 2 – Table 2

Regiony wyjaśniające największy procent wariancji dla próbek z Meksyku (Mexico/H7N3) oraz Iowa (Iowa/H5N1) według metody Bayes B [8]
 Regions explaining the highest percentage of variance for samples from Mexico (Mexico / H7N3) and Iowa (Iowa / H5N1) according to the Bayes B method [8]

Chromosom Chromosome	Allele SNP dla metody Bayes B Bayes B – SNP alleles			Haplotypy dla metody Bayes B Bayes B – Haplotypes			Istotność dla modelu logistycznego Logistic model <i>P</i> -value
	lokalizacja okna window location (Mb)	wariancja genetyczna genetic variance (%)	iteracje iterations (%) ¹	wariancja genetyczna genetic variance (%)	lokalizacja location (Mb)	iteracje iterations (%) ¹	
Meksyk H7N3 – Mexico/H7N3 outbreak							
1	126,0 – 127,0	42,55	99,5	31,29	126,1	91,2	315546485
5	39,0 – 40,0	0,23	14,0	1,15	39,3	5,9	315754877
12	12,0 – 13,0	0,54	32,8	1,31	12,5	9,6	317538164
Iowa H5N2 – Iowa/H5N2 outbreak							
1	32,0 – 33,0	2,12	23,8	0,45	32,7	4,0	313567940
7	28,0 – 29,0	1,59	21,3	0,06	28,8	1,2	16605877
9	16,0 – 17,0	1,25	31,3	0,04	16,3	1,5	14677594
15	1,0 – 2,0	1,35	38,3	0,18	1,9	1,5	315054601

Regions explaining a high percentage of variance (>0.8%) in the Bayes B model were selected (windowed SNPs or haplotypes)

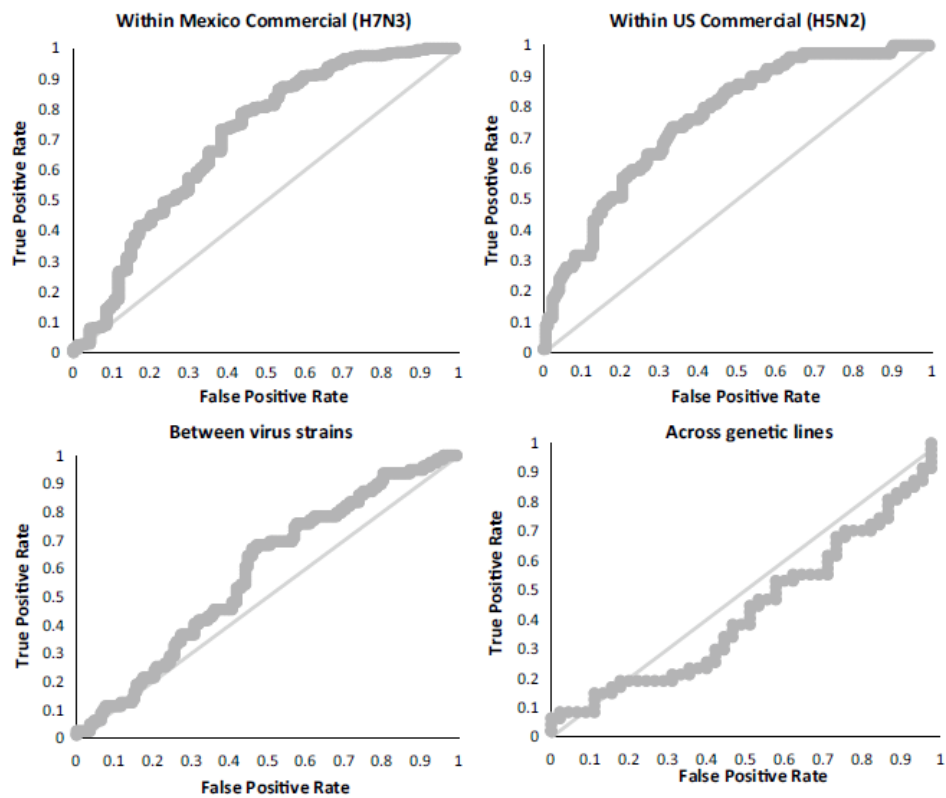
¹% okien z niezerowym efektem – % of windows with non-zero effect

²Liczba SNP rs z najniższą wartością *P* (model logistyczny) w oknie – SNP rs number with lowest *P*-value (logistic model) within the window

W dalszym etapie prac analizowano możliwość przewidywania przeżywalności ptaków w trakcie epidemii wyłącznie na podstawie ich informacji genomowej [39]. W badaniach wykorzystano materiał doświadczalny należący do trzech grup ptaków: komercyjnej linii Hy-Line z epidemii H5N2 z 2015 roku w Iowa, komercyjnej linii Hy-Line z epidemii H7N3 w Meksyku w 2012 roku oraz komercyjnej linii 1 (tab. 1). Analizowano wszystkie polimorfizmy typu SNP, wykorzystując model Bayes B oraz program GenSel. Do danych dopasowano liniowy model mieszany, uwzględniający stały efekt średniej oraz efekty losowe poszczególnych polimorfizmów typu SNP. Oszacowania *a posteriori* dla efektów SNP były użyte do oszacowania genomowych wartości hodowlanych dla przeżywalności przy potencjalnym zarażeniu HPAI innych zgenotypowanych ptaków, które nie były uwzględnione w treningowym zbiorze danych.

Potencjał predykcji genomowej został zweryfikowany metodą walidacji krzyżowej z podziałem na 5 podzbiorów oraz krzywej ROC, która wskazuje, na ile predykcja za pomocą modelu jest lepsza niż losowe przypisanie osobników do poszczególnych grup. Pole powierzchni pod krzywą ROC wynosiło 0,76 w przypadku predykcji dla ptaków przy potencjalnym zarażeniu szczepem H5N2, 0,71 – szczepem H7N3 oraz jedynie 0,58 w sytuacji, kiedy starano się przewidywać przeżywalność przy zarażeniu szczepem H5N2 na podstawie oszacowań efektów SNP uzyskanych przy zarażeniu szczepem H7N3. Nieskuteczne okazało się przewidywanie pomiędzy liniami genetycznymi kur z polem powierzchni pod krzywą ROC równym 0,43, co jest wynikiem gorszym niż losowa klasyfikacja dająca wartość 0,5 (rys.). Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że uwarunkowania genetyczne przeżywalności są specyficzne dla szczepu wirusa oraz linii genetycznej ptaków. Potwierdzają również, że przeżywalność grypy u ptaków ma istotny komponent genetyczny.

Jesienią 2017 roku rozpoczęto realizację projektu, w ramach którego dokonano sekwencjonowania całego genomu dla części próbek pochodzących od ptaków zgenotypowanych wcześniej na mikromacierzy 600 k (tab. 1) oraz dodatkowych 34 próbek pochodzących od ptaków, które przeżyły kolejną epidemię grypy w Meksyku w 2016 roku. Badania realizowane są dzięki wsparciu Egg Industry Center z siedzibą w Iowa i firmy Hy-Line International. W projekcie uczestniczą trzy grupy badawcze: pierwsza pod kierunkiem dr Anny Wolc, dr Janet Fulton i dr Jesusa Arango (Hy-Line) we współpracy z dr Wioletą Drobik-Czwaro ze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, druga pod kierunkiem Jacka Dekkersa (Uniwersytet Stanowy Iowa USA) oraz trzecia pod kierunkiem dr Jacqueline Smith oraz prof. Paula Digarda (Instytut Roslin, UK). Łącznie w badaniach wykorzystano 293 indywidualnych sekwencji genomowych. Poza sekwencjami, które były analizowane wcześniej, obecnie uwzględniono również próbki pochodzące od 8 kur, które jako jedyne z 1171 osobników utrzymywanych na fermie w Meksyku przeżyły zakażenie szczepem H7N3 w 2016 roku. Jako grupę kontrolną wybrano 18 ptaków, które na podstawie analizy DNA zostały sklasyfikowane jako pełne rodzeństwo dla osobników, które przeżyły. Odczyty dla wszystkich ptaków zostały zmapowane do genomu referencyjnego (galGal5), przeprowadzono również wstępne wykrywanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) oraz krótkich insercji i delecji (INDEL). Regiony, które różnicują badane grupy są obecnie poddawane dalszej analizie bioinformatycznej. Geny kandydujące, które udało się do tej pory wytypować są obecnie testowane w warunkach *in vitro* w Instytucie Roslin w Edynburgu.



Rys. Krzywe ROC dla przewidywania przeżywalności HPAI. Górny lewy róg – w obrębie H7N3, Meksyk; górny prawy róg – H5N2 Iowa; dolny lewy róg – pomiędzy szczepami H7N3 oraz H5N2; dolny prawy róg – pomiędzy liniami genetycznymi [39]

Fig. ROC curves for predicting HPAI survival. Upper left corner – H7N3 Mexico; top right corner – H5N2 Iowa; lower left corner – between H7N3 and H5N2 strains; bottom right corner – between genetic lines [39]

Podsumowanie

Przyjmuje się, że genetyczne uwarunkowania odpowiedzi na wysoce zjadliwą grypę ptaków u kur niosek są bardzo złożone. Dotychczas zidentyfikowano liczne geny, które mogą być odpowiedzialne zarówno za różnice obserwowane na poziomie międzygatunkowym, jak i międzyosobniczym, nie dają one jednak jednoznacznej odpowiedzi co do mechanizmów, które warunkują przeżycie po zakażeniu. Liczne prace wskazują na duży udział odporności nieswoistej. Badania dotyczące różnic międzyosobniczych wśród ptaków, które przeżyły epidemię na fermach w Iowa i w Meksyku wykazały istotny udział zmienności genetycznej w odporności oraz przeżywalności HPAI. W ramach prowadzo-

nych badań zidentyfikowano szereg genów, znanych ze względu na ich powiązania z odpowiedzią immunologiczną, replikacją wirusów oraz funkcjonowaniem układu nerwowego. Wyniki wskazują jednak, że regiony genomu, które dawały sygnał w poszczególnych badaniach asocjacyjnych (obejmujących osobniki, które przeżyły infekcję i osobniki kontrolne) różnią się od siebie, co może wskazywać, że odporność oraz przeżywalność są zależne od szczepu wirusa oraz linii genetycznej ptaków. Konieczne są dalsze badania mające na celu weryfikację wytypowanych regionów, genów oraz wariantów, jak również roli, jaką poszczególne geny mogą pełnić w odporności na wysoce zjadliwą grypę ptaków u kur niosek.

PIŚMIENNICTWO

1. BARBER M.R., AILDRIDGE J.R.Jr., WEBSTER R.G., MAGOR K.E., 2010 – Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (13), 5913-5918.
2. BERNASCONI D., SCHULTZ U., STAEHELI P., 1995 – The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 15 (1), 47-53.
3. BRASS A.L., HUANG I.C., BENITA Y., JOHN S.P., KRISHNAN M.N., FEELEY E.M., RYAN B.J., WEYER J.L., van der WEYDEN L., FIKRIG E., ADAMS D.J., XAVIER R.J., FARZAN M., ELLEDGE S.J., 2009 – The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139 (7), 1243-1254.
4. BURGGRAAF S., KARPALA A., BINGHAM J., LOWTHER S., SELLECK P., KIMPTON W., BEAN A., 2014 – H5N1 infection causes rapid mortality and high cytokine levels in chickens compared to ducks. *Virus Research* 185, 23-31.
5. BYUN S.J., YUK S.S., JANG Y.J., CHOI H., JEON M.H., ERDENE-OCHIR T.O., KWONJ.H., NOH J.Y., KIM J.S., YOO J.G., SONG C.S., 2017 – Transgenic Chickens Expressing the 3D8 Single Chain Variable Fragment Protein Suppress Avian Influenza Transmission. *Scientific Reports* 7, Article number: 5938.
6. CAPUA I., ALEXANDER D.J., 2008 – Avian influenza vaccines and vaccination in birds. *Vaccine* 26 (4), D70-D73.
7. CORNELISSEN J.B., VERVELDE L., POST J., REBEL J.M., 2013 – Differences in highly pathogenic avian influenza viral pathogenesis and associated early inflammatory response in chickens and ducks. *Avian Pathology* 42 (4), 347-364.
8. DROBIK-CZWARNO W., WOLC A., FULTON J.E., ARANGO J., JANKOWSKI T., O'SULLIVAN N.P., DEKKERS J.C.M., 2018 – Identifying the genetic basis for resistance to avian influenza in commercial egg layer chickens. *Animal* 12 (7), 1363-1371.
9. DROBIK-CZWARNO W., WOLC A., FULTON J.E., ARANGO J., JANKOWSKI T., O'SULLIVAN N.P., DEKKERS J.C.M., 2018 – Genetic basis of resistance to avian influenza in different commercial varieties of layer chickens. *Poultry Science* 97 (10), 3421-3428.
10. FERNANDO R.L., GARRICK D.J., 2008 – GenSel: User manual for a portfolio of genomic selection related analyses. Animal Breeding and Genetics, Iowa State University, Ames.
11. GILMOUR A.R., GOGEL B.J., CULLIS B.R., WELHAM S.J., THOMPSON R., 2015. ASReml user guide release 4.1 structural specification. VSN International Ltd, UK.

12. GREENE J.L., 2015 – Update on the Highly-Pathogenic Avian Influenza Outbreak of 2014-2015. Congressional Research Service 7-5700. R44114.
13. HUANG Y., LI Y., BURT D.W., CHEN H., ZHANG Y., QIAN W., KIM H., GAN S., ZHAO Y., LI J., YI K., FENG H., ZHU P., LI B., LIU Q., FAIRLEY S., MAGOR K.E., DU Z., HU X., GOODMAN L., TAHER H., VIGNAL A., LEE T., KIM K.W., SHENG Z., AN Y., SEARLE S., HERRERO J., GROENEN M.A.M., CROOIJMANS R.P.M.A., FARAUT T., CAI Q., WEBSTER R.G., ALDRIDGE J.R., WARREN W.C., BARTSCHAT S., KEHR S., MARZ M., STADLER P.F., SMITH J., KRAUS R.H.S., ZHAO Y., REN L., FEI J., MORISSON M., KAISER P., GRIFFIN D.K., RAO M., PITEL F., WANG J., LI N., 2013 – The duck genome and transcriptome provide insight into an avian influenza virus reservoir species. *Nature Genetics* 45, 776-783.
14. IWAMI S., TAKEUCHI Y., LIU X., NAKAOKA S., 2009 – A geographical spread of vaccine-resistance in avian influenza epidemics. *Journal of Theoretical Biology* 259 (2), 219-228.
15. JABŁOŃSKA A., PARADOWSKA E., 2014 – Rola receptorów RIG-I-podobnych w odpowiedzi przeciwvirusowej. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 68, 541-556.
16. KARPALA A.J., STEWARD C., MCKAY J., LOWENTHAL J.W., BEAN A.G.D., 2011 – Characterization of Chicken Mda5 Activity: Regulation of IFN- in the Absence of RIG-I Functionality. *The Journal of Immunology* 186 (9), 5397-5405.
17. KRANIS A., GHEYAS A.A., BOSCHIERO C., TURNER F., YU L., SMITH S., TALBOT R., PIRANI A., BREW F., KAISER P., HOCKING P.M., FIFE M., SALMON N., FULTON J., STROM T.M., HABERER G., WEIGEND S., PREISINGER R., GHOLAMI M., QANBARI S., SIMIANER H., WATSON K.A., WOOLLIAMS J.A., BURT D.W., 2013 – Development of a high density 600K SNP genotyping array for chicken. *BMC Genomics* 14, 59.
18. KUCHIPUDI S.V., DUNHAM S.P., NELLI R., WHITE G.A., COWARD V.J., SLOMKA M.J., BROWN H., CHANG K.C., 2012 – Rapid death of duck cells infected with influenza: a potential mechanism for host resistance to H5N1. *Immunology and Cell Biology* 90 (1), 116-123.
19. KUCHIPUDI S.V., TELLABATI M., SEBASTIAN S., LONDT B.Z., JANSEN C., VERVELDE L., BROOKES S.M., BROWN I.H., DUNHAM S.P., CHANG K.C., 2014 – Highly pathogenic avian influenza virus infection in chickens but not ducks is associated with elevated host immune and pro-inflammatory responses. *Veterinary Research* 45, 118.
20. LI K., MARKOSYAN R.M., ZHENG Y.M., GOLFETTO O., BUNGART B., LI M., DING S., HE Y., LIANG C., LEE J.C., GRATTON E., COHEN F.S., LIU S.L., 2013 – IFITM Proteins Restrict Viral Membrane Hemifusion. *PLoS Pathogens* (<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003124>).
21. LI X.Y., QU L.J., YAO J.F., YANG N., 2006 – Skewed allele frequencies of an Mx gene mutation with potential resistance to avian influenza virus in different chicken populations. *Poultry Science* 85 (7), 1327-1329.
22. LINIGER M., SUMMERFIELD A., ZIMMER G., MCCULLOUGH K.C., RUGGLI N., 2012 – Chicken cells sense influenza A virus infection through MDA5 and CARDIF signaling involving LGP2. *Journal of Virology* 86 (2), 705-717.
23. LOOI F.Y., BAKER M.L., TOWNSON T., RICHARD M., NOVAK B., DORAN T.J., SHORT K.R., 2018 – Creating Disease Resistant Chickens: A Viable Solution to Avian Influenza? *Viruses* 10, 561.

24. LYALL J., IRVINE R.M., SHERMAN A., MCKINLEY T.J., NÚÑEZ A., PURDIE A., OUTTRIM L., BROWN I.H., ROLLESTON-SMITH G., SANG H., TILEY L., 2011 – Suppression of avian influenza transmission in genetically modified chickens. *Science* 331 (6014), 223-226.
25. MAGOR K.E., MIRANZO NAVARRO D., BARBER M.R., PETKAU K., FLEMING-CANEPA X., BLYTH G.A., BLAINE A.H., 2013 – Defense genes missing from the flight division. *Developmental and Comparative Immunology* 41 (3), 377-388.
26. MATSUU A., KOBAYASHI T., PATCHIMASIRI T., SHIINA T., SUZUKI S., CHAICHOUNE K., RATANAKORN P., HIROMOTO Y., ABE H., PARCHARIYANON S., SAITO T., 2016 – Pathogenicity of Genetically Similar, H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Strains in Chicken and the Differences in Sensitivity among Different Chicken Breeds. *PLoS ONE* 11 (4), doi: 10.1371/journal.pone.0153649.
27. POST J., BURT D.W., CORNELISSEN J.B., BROKS V., van ZOELLEN D., PEETERS B., REBEL J.M., 2012 – Systemic virus distribution and host responses in brain and intestine of chickens infected with low pathogenic or high pathogenic avian influenza virus. *Virology Journal* 9, 61.
28. RANAWARE P.B., MISHRA A., VIJAYAKUMAR P., GANDHALE P.N., KUMAR H., KULKARNI D.D., RAUT A.A., 2016 – Genome Wide Host Gene Expression Analysis in Chicken Lungs Infected with Avian Influenza Viruses. *PLoS ONE* 11 (4), doi: 10.1371/journal.pone.0153671.
29. ROGERS G.N., PAULSON J.C., DANIELS R.S., SKEHEL J.J., WILSON I.A., WILEY D.C., 1983 – Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature* 304, 76-78.
30. ROHAIM M.A., SANTHAKUMAR D., NAGGAR R.F.E., IQBAL M., HUSSEIN H.A., MUNIR M., 2018 – Chickens Expressing IFIT5 Ameliorate Clinical Outcome and Pathology of Highly Pathogenic Avian Influenza and Velogenic Newcastle Disease Viruses. *Frontiers in Immunology* 9, 2025.
31. RUIZ-HERNANDEZ R., MWANGI W., PEROVAL M., SADEYEN J.R., ASCOUGH S., BALKISSOON D., STAINES K., BOYD A., MCCAULEY J., SMITH A., BUTTER C., 2016 – Host genetics determine susceptibility to avian influenza infection and transmission dynamics. *Scientific Reports* 6, Article number: 26787.
32. SIRONI L., WILLIAMS J.L., MORENO-MARTIN A.M., RAMELLI P., STELLA A., JIANLIN H., WEIGEND S., LOMBARDI G., CORDIOLI P., MARIANI P., 2008 – Susceptibility of different chicken lines to H7N1 highly pathogenic avian influenza virus and the role of Mx gene polymorphism coding amino acid position 631. *Virology* 380 (1), 152-156.
33. SMITH J., SMITH N., YU L., PATON I.R., GUTOWSKA M.W., FORREST H.L., DANER A.F., SEILER J.P., DIGARD P., WEBSTER R.G., BURT D.W., 2015 – A comparative analysis of host responses to avian influenza infection in ducks and chickens highlights a role for the interferon-induced transmembrane proteins in viral resistance. *BMC Genomics* 16, 574.
34. SUAREZ D.L., 2012 – DIVA vaccination strategies for avian influenza virus. *Avian Diseases* 56 (4 Suppl.), 836-844.
35. ŚMIETANKA K., NIEMCZUK K., ŚWIĘTOŃ E., NIEMCZUK P., 2017 – Wysoce zjadliwa grypa ptaków podtypu H5 w Europie i Polsce w latach 2016 i 2017 – aktualna sytuacja, zwalczanie i ocena ryzyka. *Życie Weterynaryjne* 92, 7.

36. WANG Y., BRAHMAKSHATRIYA V., LUPIANI B., REDDY S., OKIMOTO R., LI X., CHIANG H., ZHOU H., 2012 – Associations of chicken Mx1 polymorphism with antiviral responses in avian influenza virus infected embryos and broilers. *Poultry Science* 91 (12), 3019-3024.
37. WANG Y., BRAHMAKSHATRIYA V., LUPIANI B., REDDY S.M., SOIBAM B., BENHAM A.L., GUNARATNE P., LIU H.C., TRAKOOLJUL N., ING N., OKIMOTO R., ZHOU H., 2012 – Integrated analysis of microRNA expression and mRNA transcriptome in lungs of avian influenza virus infected broilers. *BMC Genomics* 13, 278.
38. WANG Y., LUPIANI B., REDDY S.M., LAMONT S.J., ZHOU H., 2014 – RNA-seq analysis revealed novel genes and signaling pathway associated with disease resistance to avian influenza virus infection in chickens. *Poultry Science* 93 (2), 485-493.
39. WOLC A., DROBIK-CZWARNO W., FULTON J.E., ARANGO J., JANKOWSKI T., DEKKERS J.C.M., 2018 – Genomic prediction of avian influenza infection outcome in layer chickens. *Genetic Selection Evolution* 50 (1), 21.

Wioleta Drobik-Czwaro, Anna Wolc,
Kornelia Kucharska, Elżbieta Martyniuk

Genetic determinants of resistance to highly pathogenic avian influenza in chickens

Summary

Highly pathogenic avian influenza (HPAI) poses a huge threat to poultry production and also introduces an epidemiological risk in the human population. Thus far, HPAI has been controlled mainly through widespread implementation of biosecurity, and in the case of an outbreak, liquidation of flocks and establishment of protection zones. Alternative strategies for combating HPAI include the use of vaccines, genetic modification, and genetic selection for increased general and specific immunity in birds. These kinds of strategies often require identification of the genes involved in the immune response to the pathogen. Many genes have been identified as potentially associated with differences in the response to HPAI between poultry species and between individuals. Thus far, the most attention has been focused on genes taking part in regulating the innate immune response, which is responsible for preventing infection and limiting the replication and spread of the virus. The most commonly mentioned candidates for layer chickens include interferon-stimulated genes (ISGs) and RIG-I-like receptors. Proteins encoded by genes of the BTLN family, defensins, and proteins involved in apoptosis have also been associated with differences in the response to HPAI. Recent years have seen an increasing number of studies on the genetic determinants of individual differences in the response to HPAI in chickens. Data from HPAI outbreaks in the US in the spring of 2015 and Mexico in the years 2012-2016 have enabled a more precise analysis of this problem. A number of genes have been identified as associated with the immune response, but their specific role in determining the survival of birds requires further study. Preliminary results indicate that genetic determinants of resistance to HPAI are highly complex and can vary depending on the virus strain and the genetic line of birds.

KEY WORDS: highly pathogenic avian influenza / layer chicken / genetic basis of host resistance