

Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Zakład Biochemii/Zakład Analiz Omicznych

Aneta Pluta

Badanie wpływu mutacji w regionie LTR oraz genie *tax* wirusa enzootycznej
białaczki bydła na poziom replikacji wirusa u zwierząt zakażonych

Effect of mutations in the LTR region and the *tax* gene of Bovine Leukemia Virus (BLV) on virus
replication in BLV infected cattle

Rozprawa doktorska

Promotor rozprawy:

prof. dr hab. Jacek Kuźmak

Zakład Biochemii
PIWet-PIB w Puławach

Promotor pomocniczy:

dr hab. Marzena Rola-Łuszczak

Zakład Biochemii/Zakład Analiz Omicznych
PIWet-PIB w Puławach

Recenzenci:

prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk

Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Instytut Biotechnologii UG
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
(Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego)

prof. dr hab. Krzysztof Wąsowicz

Katedra Patofizjologii, Weterynarii Sądowej i Administracji
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Puławy, 2021

Spis treści

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską.....	3
Wykaz używanych skrótów.....	4
1. Wstęp.....	6
1.1. Ogólna charakterystyka zakażeń BLV.....	6
1.2. Budowa i funkcja genomu wirusa BLV.....	8
1.2.1. Sekwencje LTR.....	8
1.2.2. Geny kodujące białka strukturalne i enzymatyczne.....	10
1.2.3. Geny kodujące białka regulatorowe.....	11
1.2.4. Sekwencje kodujące mikroRNA i lncRNA.....	12
1.3. Ekspresja i propagacja wirusa.....	12
1.3.1. Powinowactwo komórkowe.....	13
1.3.2. Cykl życiowy wirusa.....	13
1.3.3. Poliklonalna ekspansja zakażonych limfocytów B.....	15
1.3.4. Prowirusowe DNA.....	15
1.4. Zmienność genetyczna BLV.....	17
2. Cel i zakres pracy.....	21
3. Omówienie uzyskanych wyników badań.....	22
4. Wnioski.....	34
5. Streszczenie.....	36
6. Summary.....	39
7. Piśmiennictwo.....	42

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

I. Praca przeglądowa

1. Pluta A, Jaworski JP, Douville RN. Regulation of Expression and Latency in BLV and HTLV. *Viruses* 2020, 25; 12(10):1079.

Punkty MNiSW= 100; IF= 3.816

II. Prace oryginalne

1. Pluta A, Rola-Łuszczak M, Douville RN, Kuźmak J. Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences. *Virology Journal* 2018, 25; 15(1):165.

Punkty MNiSW=20 ; IF= 2.37

2. Pluta A, Willems L, Douville RN, Kuźmak J. Effects of naturally occurring mutations in bovine leukemia virus 5'-LTR and tax gene on viral transcriptional activity. *Pathogens* 2020; 9(10):836.

Punkty MNiSW=100 ; IF= 3.018

3. Pluta A, Blazhko NV, Ngirande C, Joris T, Willems L, Kuźmak J. Analysis of nucleotide sequence of Tax, miRNA and LTR of bovine leukemia virus in cattle with different levels of persistent lymphocytosis in Russia. *Pathogens* 2021; 10(2):246.

Punkty MNiSW=100 ; IF= 3.018

Łącznie: punkty MNiSW=320 ; IF= 12.22

Punktacja według wykazu czasopism MNiSW oraz współczynnik wpływu Impact Factor (IF) według Journal Citations Reports zgodnie z rokiem opublikowania prac.

Wykaz używanych skrótów

AL	asymptomatyczna postać zakażenia wirusem enzootycznej białaczki bydła (ang. <i>aleukemic state</i>)
AS1-L, S	długie i krótkie antysensowne transkrypty BLV (ang. <i>long and short antisense transcripts</i>)
ATF	aktywujący czynnik transkrypcyjny (ang. <i>activating transcription factor</i>)
BCL6	onkogen kodujący białko należące do rodziny represorów transkrypcyjnych charakteryzujących się obecnością domeny BTB/POZ (ang. <i>bric-a-brac, tramtrack, broadcomplex/pox virus zinc finger</i>) oraz palców cynkowych (ang. <i>B-cell lymphoma 6</i>)
BLIMP1	białko różnicowania limfocytów B w komórki plazmatyczne (ang. <i>B lymphocyte-induced maturation protein 1</i>)
BLV	wirus enzootycznej białaczki bydła (ang. <i>bovine leukemia virus</i>)
boAP3D1	bydlęcy gen kodujący podjednostkę <i>delta</i> białkowego kompleksu adapterowego AP3 (ang. <i>bovine adaptor protein 3 complex subunit delta-1</i>)
BoLA-DRB3	jeden z genów MHC klasy II, inaczej bydlęcy antygen limfocytarny składający się z łańcuchów <i>beta</i> (ang. <i>bovine leukocyte antigen- DR beta 3 chain</i>)
cAMP	cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan (ang. <i>cyclic adenosine 3',5'-monophosphate</i>)
CAT1	pierwszy transporter dla aminokwasów kationowych (ang. <i>first cationic amino acid transporter</i>)
CBP	białko wiążące czynnik CREB (ang. <i>CREB binding protein</i>)
CRE	region wzmacniacza DNA zlokalizowany w LTR BLV aktywowany z udziałem CREB (ang. <i>cyclic-AMP response element</i>)
CREB	czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cAMP (ang. <i>cAMP-response element binding protein</i>)
DAS	sekwencja DNA pełniąca funkcję aktywatora transkrypcji prowirusa BLV znajdująca się za miejscem startu transkrypcji (ang. <i>downstream activator sequence</i>)
EBB	enzootyczna białaczka bydła
EBL	enzootyczna białaczka bydła (ang. <i>enzootic bovine leukosis</i>)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
Ets	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>E26 transformation-specific</i>)
FLK-BLV	ciągła linia komórkowa wywodząca się z nerki płodu owczego zakażona BLV (ang. <i>fetal lamb kidney cell line persistently infected with bovine leukemia virus</i>)
gp51	białko powierzchniowe wirusa białaczki bydła (ang. <i>glycoprotein gp51</i>)
GRE	element odpowiedzi hormonalnej na glukokortykoidy (ang. <i>glucocorticoid response element</i>).
HeLa	linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy (ang. <i>line derived from cervical cancer cells from Henrietta Lacks</i>)
H3F3A	białko histonowe H3.3 (ang. <i>H3.3 histone protein</i>)
HIV-1	ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HTLV	ludzki wirus białaczki T- komórkowej (ang. <i>Human T-cell Leukemia Virus</i>)
IGJ	gen kodujący polipeptydowy łańcuch J, wiążący części ogonowe immunoglobulin A (IgA) oraz M (IgM) (ang. <i>Immunoglobulin J polypeptide</i>)
IRF	czynnik regulujący interferon (ang. <i>interferon regulatory factor</i>)
kDA	jednostka masy atomowej równa 1000 daltonów
lncRNA	długie niekodujące RNA (ang. <i>long non-coding RNAs</i>)

LTR	długie powtórzenia końcowe (ang. <i>long terminal repeats</i>)
MA	białko macierzy (ang. <i>matrix protein</i>)
MAZ	białko palca cynkowego związane z czynnikiem transkrypcyjnym MYC (ang. <i>Myc-associated zinc finger protein</i>)
miRNA	cząsteczki mikroRNA (ang. <i>microRNA</i>)
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. <i>messenger RNA</i>)
MYC	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>cellular homologue to the transforming sequences of the avian myelocytomatosis retrovirus</i>)
NC	nukleokapsyd (ang. <i>nucleocapsid</i>)
ncRNA	niekodujące RNA (ang. <i>non coding RNA</i>)
ND1,2	domena wiążąca przeciwciała neutralizujące 1, 2 (ang. <i>neutralizing domain</i>)
NES	sygnał eksportu jądrowego (ang. <i>nuclear export sequence</i>)
NF-κB	jądrowy czynnik transkrypcyjny (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NJ	metoda najbliższego sąsiedztwa (ang. <i>neighbour-joining</i>)
NLS	sygnał lokalizacji jądrowej (ang. <i>nuclear localization signal</i>)
OE-PCR	metoda wydłużania nakładających się odcinków w reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. <i>overlap extension PCR</i>)
OIE	Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt (fr. <i>Office International des Epizooties</i>)
P300/CBP	koaktywator transkrypcji (ang. <i>p300/cyclic-AMP-response-element binding protein</i>)
PAX5	czynnik transkrypcyjny, którego ekspresja zachodzi w komórkach B, biorący udział w rozwoju limfocytów B (ang. <i>Paired Box Protein 5</i>)
PL	przewlekła limfocytoza (ang. <i>persistent lymphocytosis</i>)
PTLV	wirus T-limfotropowy naczelnych (ang. <i>Primate T-lymphotropic Virus</i>)
PU.1	czynnik transkrypcyjny z rodziny czynników Ets, wiążący się z sekwencjami bogatymi w purynę
PVL	poziom prowirusowego DNA (ang. <i>proviral load</i>)
real time PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time polymerase chain reaction</i>)
RT	odwrotna transkryptaza (ang. <i>reverse transcriptase</i>)
SLC7A1	błonowe białko transportujące aminokwasy kationowe (ang. <i>solute carrier family 7 member 1</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SPI-B	rodzina czynników transkrypcyjnych Ets (ang. <i>erythroblast transformation specific</i>)
TFIID	ogólny czynnik transkrypcyjny wchodzący w skład kompleksu preinicjacyjnego wiążącego polimerazę RNA II (ang. <i>general transcription factor (TF) IID of RNA polymerase II</i>)
USF	nadrzędny czynnik transkrypcyjny (ang. <i>an upstream stimulatory factor</i>)
pBLV344	plazmid infekcyjny posiadający wklonowany genom BLV typu dzikiego (szczep 344)
pGL4.11	wektor plazmidowy zawierający bioluminescencyjny lucyferazowy gen reporterowy nie posiadający sekwencji promotora
pSG5	eukariotyczny wektor ekspresyjny z promotorem SV40 umożliwiający produkcję białka
pGL4.74(hRluc/TK)	wektor plazmidowy zawierający bioluminescencyjny lucyferazowy gen reporterowy oraz promotor TK

1. Wstęp

1.1. Ogólna charakterystyka zakażeń BLV

Wirus enzoptycznej białaczki bydła (ang. *Bovine leukemia virus*, BLV) należy do rodziny *Retroviridae*, podrodziny *Orthoretrovirinae* i rodzaju *Deltaretrovirus*. Ponadto do rodzaju *Deltaretrovirus* należą trzy gatunki wirusów T-limfotropowych naczelnych (ang. *Primate T-lymphotropic virus*, PTLV), do których zalicza się ludzki wirus białaczki T- komórkowej typu 1, 2 (ang. *Human T-cell leukemia virus-1,-2*, HTLV-1, -2) oraz małpi wirus białaczki T- komórkowej (ang. *Simian T-cell leukemia virus*, STLV) (Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów, ICTV, 2019). BLV jest czynnikiem etiologicznym enzoptycznej białaczki bydła (EBB), będącej chorobą nowotworową o przewlekłym przebiegu, którą cechuje rozwój zmian proliferacyjnych układu limforetikularnego (Gillet i wsp., 2007). W przebiegu choroby wyróżnia się trzy postacie:

- asymptomatyczną (ang. *aleukemic state*, AL) – postać ta dotyczy około 70% zakażonych zwierząt, charakteryzuje się obecnością swoistych przeciwciał i wirusowego DNA zintegrowanego z genomem komórek w postaci prowirusa, a zakażenie przebiega bezobjawowo (Schwartz i wsp., 1994b).
- przewlekłą limfocytozę (ang. *subclinical persistent lymphocytosis*, PL) – postać ta rozwija się u około 30% zakażonych zwierząt, charakteryzuje się poliklonalną proliferacją limfocytów B o fenotypie CD5+IgM+ (Aida i wsp., 1993); zaobserwowano iż rozwój PL jest związany również z jednym z genów MHC klasy II oznaczonym jako *BoLA-DRB3* (Mirsky i wsp., 1998).
- postać guzową białaczki (ang. *malignant lymphoma state*) – rozwija się u około 5% zwierząt z przewlekłą limfocytozą w wieku powyżej 5 lat, charakteryzuje się zmianami guzowymi w węzłach chłonnych i narządach wewnętrznych takich jak: żołądek, serce, jelita, nerki, płuca, wątroba i macica. Objawy kliniczne choroby zależą od lokalizacji guzów i związane są przede wszystkim z powiększeniem węzłów chłonnych, zaburzeniami trawienia, utratą apetytu, utratą masy ciała, tachykardią, osłabieniem, niewydolnością wątroby i nerek, niepowodzeniem w zakresie rozrodu, zapaleniem gruczołu mlekowego oraz zmniejszoną produkcją mleka (OIE 2018).

W warunkach naturalnych na zakażenie wrażliwe jest bydło domowe, zebru (bydło domowe garbate), bawoły wodne, jaki i żubry (Radke, 1999; Ma i wsp., 2016; Moe i wsp., 2020). Opisano również przypadek występowania swoistych przeciwciał u owiec i alpak utrzymywanych wspólnie z bydłem (Lee i wsp., 2012; Green i wsp., 1988). Dodatkowo, badania przeprowadzone przez Buehring i wsp. wykazały obecność wirusowych białek w

preparatach barwionych immunohistochemicznie oraz sekwencji prowirusowych BLV w próbkach pochodzących z guzów piersi u kobiet (Buehring i wsp., 2014). Jednak, obecnie nie ma jednoznacznych dowodów wskazujących na potencjał zoonotyczny tego wirusa (Gillet i wsp., 2007). Źródłem wirusa mogą być: krew, ślina, mleko, a także nasienie pochodzące od zakażonych zwierząt (Lucas i wsp., 1980; Roberts i wsp., 1981; Klintevall i wsp., 1991). BLV przenoszony jest przez bezpośredni kontakt między zwierzętami, drogą łożyskową - z matki na płód w trakcie ciąży, podczas porodu - przez kontakt noworodka z krwią matki i jej wydzielinami, a także przez picie siary i mleka zakażonej matki (Piper i wsp., 1979; Lassauzet i wsp., 1991). Ponadto do transmisji wirusa może dojść przez nieprawidłowo wykonane zabiegi zootechniczne a także owady kłująco-ssące takie jak muchówki z rodziny bąkowatych i muchowatych żywiące się krwią kręgowców stałocieplnych (Ohshima i wsp., 1981; Gutiérrez i wsp., 2014).

Enzootyczna białaczka bydła jest ważnym problemem dla zdrowia bydła na świecie. Dane epidemiologiczne potwierdzają, że występowanie EBB ma zasięg globalny. Najwięcej stad bydła zakażonego BLV - powyżej 40% stwierdza się w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Argentynie, Chile, Peru, Korei, Rosji, Japonii, Tajlandii i Chinach (Efsa Panel on Animal Health 2017). Nie udało się, jak dotąd, opracować skutecznego leku czy szczepionki chroniącej przed zakażeniem BLV. W związku z tym występowanie EBB przyczynia się do znacznych strat ekonomicznych związanych z wysokimi kosztami programów kontroli i zwalczania tej choroby, ograniczeniami wywozu bydła, obrotu nasieniem i ubocznymi produktami pochodzenia zwierzęcego do krajów wolnych od EBB, zmniejszoną produkcją mleka, zmniejszoną wydajnością reprodukcyjną, utratą masy ciała, upadkami, koniecznością uboju zwierząt zakażonych, zwykle wysokoprodukcyjnych, większą podatnością na zakażenia innymi patogenami (Chi i wsp., 2002; Ott i wsp., 2003).

W krajach Unii Europejskiej, dzięki wprowadzeniu programów uzdrawiania stad polegających na wykrywaniu zwierząt z obecnością swoistych przeciwciał i poddawaniu ich ubojowi, doprowadzono do stanu urzędowej wolności od EBB w prawie wszystkich krajach wspólnoty. Aktualnie, występowanie EBB w przypadku państw członkowskich UE ogranicza się do określonych endemicznych obszarów na terenie Bułgarii, Węgier, Grecji i Malty (Efsa Panel on Animal Health 2017). Od 2017 r. Polska została uznana oficjalnie za kraj urzędowo wolny od białaczki bydła, co oznacza, że odsetek stad bydła reagujących dodatnio w badaniach serologicznych nie przekracza 0,2%. Nie udało się jednak w pełni wyeliminować zakażeń BLV i w trakcie serologicznych badań monitoringowych corocznie notuje się kilkadziesiąt potwierdzonych przypadków zakażenia. W 2018 r. zarejestrowano 63 przypadków zakażeń

BLV, a w 2019 r. 68 odpowiednio w 21 i 18 stadach. W Polsce, podobnie jak w innych krajach, EBB jest chorobą zwalczaną z urzędu co oznacza, że wszystkie przypadki zakażeń podlegają obowiązkowemu zgłaszaniu organom inspekcji weterynaryjnej. Dyrektywa Rady 64/432/EWG oraz Kodeks Zdrowia Zwierząt Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) określają sposób postępowania w przypadku wykrycia zakażeń BLV, jak i określają sposób monitorowania tych zakażeń i rodzaj rekomendowanych metod. Zgodnie z wytycznymi OIE podstawą diagnostyki zakażeń BLV jest stosowanie testów serologicznych – testu immunodyfuzji w żelu agarozowym AGID (ang. *agar gel immunodiffusion test*) i testu immunoenzymatycznego ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Testy te, reprezentujące różny poziom czułości i swoistości, pozwalają wykryć obecność swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko białkom otoczki wirusa w badanej surowicy krwi. Dopuszcza się również badanie obecności przeciwciał w mleku krów. W celu wykrycia materiału genetycznego wirusa w badanej próbce rekomenduje się użycie łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR), w której stosowane są dwie pary starterów (nested PCR) oraz reakcję PCR z odczytem sygnału w czasie rzeczywistym (ang. *real time PCR*) (OIE 2018). Metody te są jednak traktowane jako metody alternatywne w diagnostyce zakażeń BLV.

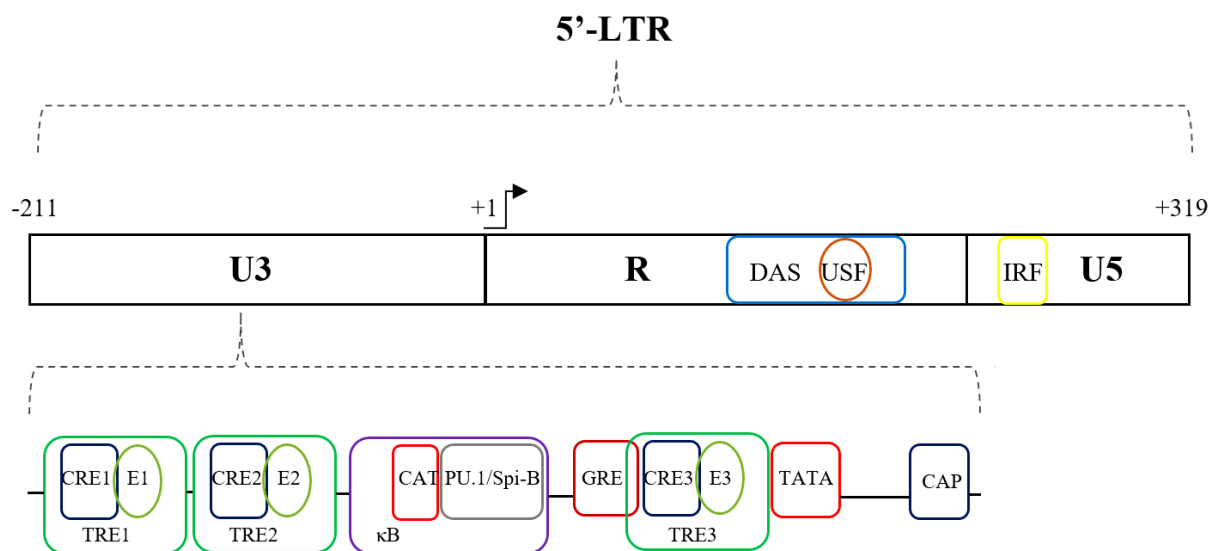
1.2. Budowa i funkcja genomu wirusa BLV

Genom BLV, zawiera dwie identyczne kopie jednoniciowego RNA o dodatniej polarności złożone z 8714 nukleotydów (Sagata i wsp., 1985). Wykazuje on budowę charakterystyczną dla tzw. retrowirusów złożonych, w której występują geny kodujące białka strukturalne (*gag*, *pol*, *pro*, *env*) typowe dla wszystkich retrowirusów, geny kodujące białka regulacyjne (*tax*, *rex*, *R3* i *G4*), cząsteczki mikroRNA (ang. *microRNA*, miRNA) i sekwencje dla długich niekodujących RNA (ang. *long non-coding RNAs*, lncRNA) związane z regulacją cyklu życiowego BLV (Gillet i wsp., 2007; Durkin i wsp., 2016). Graniczne sekwencje 5' i 3' genomu wirusa stanowią długie powtórzenia końcowe (ang. *long terminal repeats*, LTRs), zbudowane z trzech regionów: U3, R i U5 o długości odpowiednio 211, 228 i 91 par zasad (Sagata i wsp., 1985).

1.2.1. Sekwencje LTR

Sekwencje LTR odpowiadają za integrację prowirusowego DNA z genomem komórek gospodarza, zawierają odpowiednie sygnały do inicjacji i terminacji transkrypcji mRNA wirusowego oraz sekwencje regulatorowe – kontrolujące aktywność transkrypcyjną prowirusa.

Region U3 zawiera krytyczne dla replikacji wirusa sekwencje promotorowe obejmujące kasetę TATA - miejsce wiązania ogólnego czynnika TFIID oraz kasetę CAT -miejsce wiązania innych czynników transkrypcyjnych, wpływających na szybkość inicjacji transkrypcji (Sagata i wsp., 1984) (Ryc.1).



Rycina 1. Schemat budowy regionu LTR.

Istotny wpływ na inicjację transkrypcji mają sekwencje wzmacniające (ang. *enhancers*) składające się z trzech prostych powtórzeń o długości 21 nukleotydów zwanych sekwencjami TRE (ang. *tax-responsive elements*). Sekwencje TRE zawierają *elementy odpowiedzi* na cykliczny AMP (ang. *cAMP-response elements, CREs*) oraz kasety E (ang. E box), przyłączające inne kompleksy białkowe o funkcji czynnika transkrypcyjnego m.in. AP4 (Derse 1987; Unk i wsp., 1994). Elementy CRE pełnią nadrzędną rolę w regulacji transkrypcji prowirusa. Oddziałują one z czynnikami transkrypcyjnymi CREB, ATF-1 i ATF-2, natomiast ilość utworzonych kompleksów białko-DNA koreluje z poziomem ekspresji wirusa (Willems i wsp., 1992). W elementach tych obserwuje się polimorfizm pojedynczych nukleotydów, który prowadzi do obniżenia poziomu transkrypcji prowirusa i ograniczonej ekspresji genów wirusowych (Merezak i wsp., 2001). Istniejący polimorfizm w obrębie elementów CRE stanowi mechanizm obronny wirusa umożliwiający „wymknięcie” się spod nadzoru układu immunologicznego gospodarza i uzyskanie przewagi ewolucyjnej. Jednocześnie kasety E, częściowo nachodzące na elementy CRE, są sekwencjami wyciszającymi transkrypcję, gdyż przyłączanie się do nich kompleksów białkowych z grupy AP4 zapobiega wiązaniu się czynnika TFIID z kasetą TATA. Ponadto, w regionie U3 LTR znajdują się inne *cis*-elementy regulujące transkrypcję genów wirusowych, są to m. in. miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych NF- κ B, PU.1, Spi-B oraz element odpowiedzi hormonalnej - GRE (ang.

glucocorticoid response element) (Brooks i wsp., 1998; Niermann i wsp., 1997; Dekoninck i wsp., 2003). Koniec regionu U3 poprzedza miejsce inicjacji transkrypcji wirusowego mRNA będące jednocześnie pierwszym (+1) nukleotydem regionu R (Ryc.1). Region R ten zawiera dwa elementy regulatorowe tj.: miejsce wiązania nadrzędnego czynnika transkrypcyjnego USF (ang. *an upstream stimulatory factor*) oraz sekwencję DAS (ang. *downstream activator sequence*) obejmującą kasety A, B i C (Calomme i wsp., 2002; Kiss-Tóth i wsp., 1994). Region ten kończy się sekwencją CA ulegającą poliadenylacji, którą wcześniej poprzedza sygnał poliadenylacji, w 3' końcowej części U3 (Sagata i wsp., 1984). Ostatni region LTR, U5 region, zawiera pojedyncze miejsce wiązania interferonów IRF-1 i IRF-2 (Kiermer i wsp., 1998). Poprzez analogię do innych retrowirusów złożonych uważa się, że elementy regulatorowe zlokalizowane w regionach R i U5 pełnią funkcję enhancerów oraz utrzymują zdolność wirusa do reagowania – odpowiednio na inne czynniki transkrypcyjne zależne od typu komórki.

1.2.2. Geny kodujące białka strukturalne i enzymatyczne

Ekspresja genów BLV, pozostająca pod kontrolą czynników transkrypcyjnych wiążących się z sekwencjami LTR, obejmuje złożone etapy dojrzewania pre-mRNA, a następnie wykorzystanie ich do syntezy białek wirusowych. Ekspresja genu *gag* dostarcza prekursora białek strukturalnych rdzenia, Pr44 odpowiedzialnego za inicjację procesu pączkowania wirionów z zakażonej komórki i upakowywania RNA w procesie tworzenia cząstki wirusowej (Kato i wsp., 1991). W wyniku proteolizy powstają z niego poszczególne białka kapsydu określane jako: białko macierzy (MA) (p15), główne białko kapsydu (CA) (p24) oraz silnie zasadowe peptydy, które tworzą kompleks z genomowym RNA wirusa i noszą nazwę nukleokapsydu (NC) (p12) (Willems i wsp., 1997). Z końcowego fragmentu prekursora Gag – Pro (Pr66) syntetyzowana jest proteaza (p14) odpowiedzialna za rozcinanie białek prekursorowych Pr44Gag, Pr66Gag-Pro i Pr145Gag-Pro-RT-IN na pojedyncze białka (Llames i wsp., 2001). Gen *pol* stanowi matrycę w syntezie prekursora białek enzymatycznych BLV takich jak odwrotna transkryptaza (RT) (p80) i integraza (IN). Odwrotna transkryptaza katalizuje syntezę dwuniciowej cząsteczki DNA na matrycy wirusowego RNA jak również wykazuje aktywność rybonukleazy H, która hydrolizuje wiązania fosfodwustrowe RNA w hybrydach DNA-RNA (Avidan i wsp., 2002). Integraza odpowiada za integrację prowirusowego DNA z genomem komórek gospodarza. Produktem ekspresji genu *env* jest prekursor białek otoczki Pr72, z którego za pomocą komórkowej fury (enzymu z klasy konwertaz), powstają dwa bogato glikozylowane białka: białko transmembranowe (ang. *glycoprotein gp30*) i białko powierzchniowe (ang. *glycoprotein gp51*) (Bruck i wsp., 1984). Białko transmembranowe zakotwicza białko gp51 w otoczce wirusa i uczestniczy w procesie infekcji *in vivo* poprzez

destabilizację błony komórkowej oraz udział w fuzji wirusa z komórką gospodarza. Białko powierzchniowe gp51 jest odpowiedzialne za rozpoznawanie receptorów na powierzchni komórki; wyróżnia się w nim między innymi epitopy konformacyjne, domeny uczestniczące w interakcji z receptorami CD4 i CD8 limfocytów oraz domeny neutralizujące (Callebaut i wsp., 1993; Bruck i wsp., 1982).

1.2.3. Geny kodujące białka regulatorowe

Produktem ekspresji genu *tax* jest 310-aminokwasowe białko Tax bogate w prolinę i leucynę, o masie cząsteczkowej 34kDa. Białko to umiejscawia się głównie w jądrze komórkowym, chociaż jego znaczące ilości są wykrywane również w cytozolu (Willems i wsp., 1987b). Taka lokalizacja białka Tax świadczy o jego związku z procesem transkrypcji, w której pełni funkcję transaktywatora ekspresji genów wirusowych. W białku tym można wyróżnić trzy domeny zaangażowane w proces transaktywacji: 1) w części N-końcowej motyw palca cynkowego (ang. *zinc finger domain*), 2) w części centralnej domena aktywacyjna zawierająca powtórzenia bogate w leucynę (ang. *leucine-rich activation domain*) oraz 3) w części C-końcowej domena wielofunkcyjna (ang. *multifunctional domain*) (Willems i wsp., 1991; Tajima i wsp., 2000). Dodatkowo, w białku tym są obecne determinanty antygenowe (epitopy) rozpoznawane przez limfocyty cytotoksyczne CD8+ i limfocyty B. Ponadto, białko Tax przypisuje się kluczową rolę w wywoływaniu transformacji nowotworowej u części zakażonych zwierząt (Willems i wsp., 1987). Powoduje ono różnorodne zmiany w komórce poprzez aktywację transkrypcji genów gospodarza zaangażowanych w cykl i proliferację komórkową oraz zahamowanie apoptozy (Klener i wsp., 2006; Tajima i wsp., 2002; Arainga i wsp., 2012).

Gen *rex* ulega transkrypcji wraz z genem *tax*, tworząc wspólny *tax/rex* mRNA (Willems i wsp., 1987). Produktem ekspresji genu *rex* jest wysoce konserwatywne, 180-aminokwasowe białko Rex o masie cząsteczkowej 18kDa (Choi i wsp., 2005). W białku tym można wyróżnić dwie domeny: 1) w części centralnej domena aktywacyjna zawierająca bogate w leucynę sekwencje sygnału eksportu jądrowego (ang. *nuclear export sequence*, NES) oraz 2) w części C-końcowej bogatą w argininę sekwencję lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal*, NLS), które umożliwiają wiązanie oraz transport wirusowego mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy (Sagata i wsp., 1985). W wyniku ekspresji genu *R3* powstaje białko o masie cząsteczkowej 5.5 kDa, które lokalizując się w jądrze i błonach komórkowych bierze udział w po-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów (Gillet i wsp., 2007). Z kolei gen *G4* koduje proteinę o masie 11.6 kDa, której przypisuje się właściwości onkogenne. Produkty genów *R3* i *G4* są niezbędne w prawidłowym rozprzestrzeleniu wirusa w komórce (Gillet i wsp., 2007; Debacq i wsp., 2004).

1.2.4. Sekwencje kodujące mikroRNA i lncRNA

W obrębie genomu BLV, w regionie pozbawionym otwartych ramek odczytu (koniec 3' genu *env*), zlokalizowane są sekwencje kodujące regulatorowe cząsteczki RNA tzw. miRNA (Kincaid i wsp., 2012). Transkrypty tych sekwencji kodują grupę pięciu struktur pre-miNA, które ze względu na swój kształt określane są mianem struktur typu spinki do włosów (ang. *hairpin*). W cytoplazmie pre-miRNA ulegają dojrzewaniu do dziesięciu cząsteczek miRNA w szlaku niezależnym od Drosha (Rosewick i wsp., 2013). Cząsteczki miRNA BLV ulegają silnej ekspresji zarówno w limfocytach B izolowanych z guzów limfocytoblastycznych bydła, jak i limfocytach B izolowanych z krwi cieląt zakażonych eksperymentalnie (Gillet i wsp., 2016). Głównym mechanizmem działania miRNA BLV jest zwiększona proliferacja limfocytów B. Cząsteczki miRNA mogą zakłócać działanie układu odpornościowego poprzez obniżanie ekspresji genów związanych z funkcją i różnicowaniem limfocytów B, a w szczególności IGJ, PAX5, BLIMP1 i BCL6 (Frie i wsp., 2018). Usunięcie sekwencji kodujących miRNA z genomu BLV wpływa hamująco na rozwój nowotworu u bydła (Gillet i wsp., 2016).

Dodatkowo w 2016 zidentyfikowano trzy antysensowne transkrypty wirusa (AS1-S, AS1-L, AS2) o długości od 400 do około 2 200 par zasad, które ze względu na krótką otwartą ramkę odczytu (264 par zasad), uważa się za pozbawione potencjału kodowania białek (Durkin i wsp., 2016). Obecność tych transkryptów wskazuje, że region LTR posiada także aktywność dwukierunkową -antysensownego promotora. Wykryte transkrypty gromadzą się głównie w jądrze komórkowym, co wskazuje na ich funkcję jako lncRNA. Konstytutywna ekspresja lncRNA u wszystkich zwierząt zarówno we wczesnym, jak i późnym etapie zakażenia BLV (postać kliniczna białaczki limfatycznej), wskazuje na jego istotną rolę w cyklu życiowym wirusa i potencjał onkogenny. Dodatkowo, rozszczepianie transkryptu AS1-L z udziałem microRNA wirusowego oraz interferencja transkrypcji obu rodzajów wirusowego ncRNA sugeruje wspólną rolę w regulacji BLV (Durkin i wsp., 2016).

1.3. Ekspresja i propagacja wirusa

Rozprzestrzenianie się wirusa BLV w organizmie gospodarza odbywa się jako element naturalnego cyklu infekcyjnego wirusa, na który składają się m.in. wniknięcie genomu wirusa do komórki docelowej, odwrotna transkrypcja genomowego RNA na DNA, integracja prowirusa do genomu gospodarza, cykl replikacyjny, składanie elementów wirusa i uwolnienie wirusów potomnych, oraz w wyniku proliferacji klonalnej limfocytów latentnie zakażonych BLV (Florins i wsp., 2007).

1.3.1. Powinowactwo komórkowe

Głównymi komórkami docelowymi dla wirusa białaczki bydła są limfocyty B o fenotypie CD5 + IgM + (Meirom i wsp., 1997). Ponadto BLV może zakażać także limfocyty T CD4 +, limfocyty T CD8 +, limfocyty T γ/δ , monocyty, granulocyty, komórki śródbłonkowe i komórki nabłonka gruczołu mlekowego u bydła (Schwartz i wsp., 1994a; Stott i wsp., 1991; Rovnak i wsp., 1991; Buehring i wsp., 1994). Oprócz wielu badań wykazujących, szeroki zakres gospodarzy BLV, wirus może także skutecznie zakażać *in vitro* inne typy komórek pochodzących od psa, kota, owcy, bydła, świnki morskiej czy też nietoperza (Graves i wsp., 1976; Miller i wsp., 1976; Derse i wsp., 1990). Jednakże zakażenie to rzadko prowadzi do powstania zakażenia trwałego związanego z nowotworową transformacją ciągłych linii komórkowych i w większości przypadków namnażanie BLV jest mało produktywne (Inabe i wsp., 1998).

1.3.2. Cykl życiowy wirusa

Cykl infekcyjny rozpoczyna się od wiązania białka powierzchniowego wirusa (gp51) do swoistego receptora na powierzchni komórki gospodarza. Chociaż receptor ten nie został ostatecznie potwierdzony, zidentyfikowano dwie możliwe cząsteczki wiążące się z podjednostką powierzchniową wirusa tj. boAP3D1 (ang. *bovine adaptor protein 3 complex subunit delta-1*) (Corredor i wsp., 2018) i CAT1/SLC7A1 (ang. *cationic amino acid transporter 1 /solute carrier family 7 member 1*) (Bai i wsp., 2019). Po związaniu białka gp51 z receptorem następuje gwałtowna zmiana konformacji otoczki wirusa z odsłonięciem cząsteczki gp30, poprzez którą dokonuje się fuzja z błoną komórki gospodarza. Po fuzji genomowe RNA wirusa zostaje odsłonięte i wnika do wnętrza komórki docelowej. Następnie enzym odwrotna transkryptaza (ang. *reverse transcriptase*, RT), obecny w zakażającym wirionie, katalizuje odwrotną transkrypcję genomowego RNA na podwójną nić DNA. Ta przemieszcza się do jądra, gdzie integruje się w przypadkowy sposób z chromosomami komórki gospodarza dzięki działaniu integrazy wirusowej. Preferencyjnymi miejscami integracji prowirusa w jądrowym DNA we wczesnej fazie infekcji są aktywnie transkrybowane regiony genomu komórki (Gillet i wsp., 2007). Po włączeniu do genomu komórkowego, prowirusowy DNA jest kopiowany wraz z całym genomem gospodarza przez komórkowe kompleksy replikacyjne.

W wyniku aktywacji komórki gospodarza wysokie stężenie cyklicznego AMP (cAMP) w cytozolu uruchamia kaskadę reakcji, której końcowym efektem jest przemieszczenie się kinazy białkowej typu A z cytoplazmy do jądra komórki, fosforylacja czynnika transkrypcyjnego-CREB, co umożliwia jego oddziaływanie i tworzenie kompleksu z CBP (Willems i wsp., 1992).

Rozpoczęcie procesu transkrypcji BLV zachodzi w regionie promotora zlokalizowanego w regionie U3 sekwencji 5' LTR genomu prowirusa. Nieodzownymi elementami biorącymi udział w inicjacji transkrypcji są trzykrotnie powtórzone, 21 nukleotydowe regiony TRE. Do tych sekwencji przyłączają się trzy czynniki transkrypcyjne CREB, AFT-1 i AFT-2, a ich poziom wiązania z regionem TRE regulowany jest przez białko Tax, będące głównym białkiem transaktywującym BLV (Willems i wsp., 1987a). Przed rozpoczęciem transkrypcji Tax wiąże się również z koaktywatorami p300/CBP wykazującymi aktywność acetylotransferazy histonowej. Acetylacja histonów promuje dostępność DNA do kompleksów białek transkrypcyjnych, ułatwiając „odprężenie” struktury chromatyny i zwiększa transkrypcję genów wirusowych. Cząsteczki genomowe BLV transkrybowane są przez komórkową polimerazę RNA.

Inicjacja transkrypcji BLV może zachodzić także na drodze niezależnej od białka Tax. Odpowiedzialnymi są za to regiony zlokalizowane w U5 5'LTR, które posiadają zdolność wiązania się z czynnikami IRF-1 i IRF-2 (Kiermer i wsp., 1998). Ponadto, między regionami TRE znajdują się miejsca wiązania κ B, które aktywują transkrypcję BLV w obecności czynnika NF- κ B i Tax. W początkowym okresie zakażenia jak również podczas okresu latencji wirusa w zakażonych limfocytach B (ekspresja Tax jest słabo wykrywalna) aktywowany czynnik NF- κ B może inicjować transkrypcję prowirusa BLV na poziomie podstawowym. Ta podstawowa transkrypcja może prowadzić do syntezy Tax, który wraz z NF- κ B synergistycznie aktywuje transkrypcję BLV (Brooks i wsp., 1998).

W wyniku transkrypcji powstaje mRNA, którego transport z jądra komórkowego do cytoplazmy zachodzi przy udziale białek komórkowych oraz wirusowego białka Rex. Cząsteczki mRNA BLV podlegają translacji na białka, które przechodzą modyfikacje na drodze glikozylacji, mirystylacji, fosforylacji i rozszczepienia z wykorzystaniem organelli i układów enzymatycznych zakażonej komórki (Sagata i wsp., 1985). Cząsteczka wirionu formowana jest przez połączenie białek wirusa, enzymów i genomowego RNA przy błonie plazmatycznej komórek. Pączkowanie potomnego wirionu następuje przez wyspecjalizowane domeny w podwójnej warstwie lipidowej błony komórkowej gospodarza, gdzie część wewnętrzna wirionu uzyskuje swoją zewnętrzną otoczkę. Następnie kodowana przez wirusa proteaza katalizuje rozszczepienie prekursorowego białka Gag-Pol, co prowadzi do powstania dojrzałego wirionu (Gillet i wsp., 2007).

1.3.3. Poliklonalna ekspansja zakażonych limfocytów B

Prowirusowy DNA preferencyjnie integruje się z aktywnie transkrybowanymi regionami genomu gospodarza, co umożliwia aktywną replikację wirusa i wytwarzanie wirionów potomnych we wczesnym okresie zakażenia (Barez i wsp., 2015). Po okresie utajenia, trwającym najczęściej od 2 do 4 tygodni po zakażeniu, pojawia się humoralna reakcja immunologiczna organizmu gospodarza przeciwko wirusowej glikoproteinie gp51 i białku kapsydu p24. Niemal jednocześnie z okresem serokonwersji pojawiają się również limfocyty cytotoksyczne (ang. *cytotoxic T-lymphocytes*, CTL) o swoistości anty-gp51 i anty-Tax oraz limfocyty T pomocnicze CD4⁺ przyczyniające się do szybkiego wzrostu ogólnej liczby limfocytów CD8⁺ (Stone i wsp., 2000). Badania wykazują, że zdecydowana większość limfocytów B, która uległa zakażeniu BLV w pierwszych tygodniach infekcji nie przeżywa. Zbadano, że klony limfocytów B niosące prowirusowe DNA zintegrowane w pobliżu aktywnie transkrybowanych genów wykazują wyższą podatność na zniszczenie. Obecnie przyjmuje się, że silniejsza selekcja negatywna skierowana przeciwko prowirusom zlokalizowanym w pobliżu genów jest wynikiem zwiększonej ekspresji wirusa i tym samym większej ekspozycji na układ odpornościowy gospodarza (Gillet i wsp., 2013). Powoduje to, że głównym mechanizmem rozprzestrzeniania się wirusa w późniejszym okresie zakażenia staje się proliferacja (ekspansja klonalna) latentnie zakażonych limfocytów B, nie wykazujących ekspresji białek wirusowych na powierzchni komórki (Gillet i wsp., 2013; Florins i wsp., 2012). Jest to typowy dla BLV stan latencji, potwierdzony brakiem wykrycia ekspresji białek antygenowych takimi technikami jak ELISA, metoda immunoprecypitacji czy Western blot. Nie mniej jednak zastosowanie sortowania komórek krwi obwodowej metodą cytometrii przepływowej i wykonanie reakcji amplifikacji czułą techniką RT-PCR, wykazało ekspresję mRNA *tax/rex* w pojedynczych limfocytach B, co towarzyszyło utrzymującej się limfocytozie (Gillet i wsp., 2007). Obecność transkryptów BLV w pojedynczych komórkach jest związana ze strategią propagacji wirusa, która polega na indukowaniu proliferacji zakażonych komórek limfocytów za pomocą wirusowych białek regulatorowych, takich jak białko Tax (Gillet i wsp., 2013).

1.3.4. Prowirusowe DNA

Poziom prowirusowego DNA (ang. *proviral load*, PVL) przedstawiany najczęściej jako liczba kopii prowirusa w genomowym DNA w leukocytach krwi, stał się w ostatnich latach przedmiotem badań dotyczących tworzenia nowych strategii kontroli zakażeń BLV. Możliwość identyfikowania prowirusowego DNA jest pomocna jako skuteczna metoda diagnostyczna do określenia statusu zakażenia BLV, szczególnie w sytuacji kiedy badanie serologiczne daje

niejednoznaczny wynik. Drugim elementem badania liczby kopii prowirusowego DNA jest możliwość odniesienia tych wartości jako elementu prognostycznego, związanego z określonym przebiegiem zakażenia i choroby. U zakażonych krów posiadających wysokie wartości PVL występuje potencjalnie wyższe prawdopodobieństwo rozwoju formy PL oraz formy guzowatej EBB (Kobayashi i wsp., 2019). Ponadto u zwierząt, z oznaczoną wysoką wartością PVL, występuje o wiele większe ryzyko zakażenia bydła w porównaniu z tymi o niskich wartościach PVL; z tego względu zdolność identyfikacji krów o wysokim PVL stanowi aktualnie przedmiot wzmożonego zainteresowania. Badania przeprowadzone w stadach bydła mlecznego wykazały, że rozprzestrzenienie BLV w stadzie zostało ograniczone poprzez zidentyfikowanie i eliminację krów, u których wartości PVL były najwyższe, podczas gdy w stadach, w których zidentyfikowano krowy o wysokich wartościach PVL, ale ich nie usunięto, rozprzestrzenienie się wirusa BLV w stadzie nie zostało ograniczone mimo zastosowania innych metod kontroli zakażeń (Ruggiero i wsp., 2019; Bartlett i wsp., 2019). W rezultacie szeregu badań wykazano, związek pomiędzy polimorfizmem genu *BoLA-DRB3* a podwyższonymi wartościami PVL u krów zakażonych BLV. W szczególności wykazano, że u osobników u których występuje allel *BoLA* klasy II DRA/DRB3*0902 istnieje niższe prawdopodobieństwo wystąpienia wysokich wartości PVL (Forletti i wsp., 2013; Hayashi i wsp., 2017). Natomiast występowanie allelu *BoLA* DRB3*1501, związane było z większym prawdopodobieństwem podwyższonych wartości PVL. Obserwacje te zostały niedawno potwierdzone u doświadczalnie i zakażonych cieląt, o różnych profilach haplotypu *BoLA* (Forletti i wsp., 2020). Inne czynniki ryzyka, jakie towarzyszą podwyższonej wartości PVL u bydła mlecznego, obejmują wyższy wiek oraz utrzymywanie krów w oborach wolnostanowiskowych lub stad zarodowych z zastosowaniem naturalnego zapłodnienia (Ohno i wsp., 2015). Ponadto obserwuje się umiarkowaną, dodatnią korelację pomiędzy wartościami PVL a liczbą limfocytów. W badaniach, jakim objęto bydło mleczne rasy holsztyńskiej zdecydowana większość krów zakażonych BLV z wysoką limfocytozą wykazywała także wysokie wartości PVL (Juliarena i wsp., 2007; Alvarez i wsp., 2013). Odrębne badania stad bydła rasy mięsnej *Wagyu* potwierdziły związek między podwyższonym PVL a wysokim poziomem limfocytów, jak również wykazały związek między podwyższonym PVL a wyższym wiekiem (Nakada i wsp., 2018). Nadal wiele aspektów determinujących liczbę kopii prowirusa w genomowym DNA w leukocytach krwi obwodowej nie zostało jeszcze do końca poznanych i wymaga dalszych badań. Innym aspektem wymagającym badań jest określenie zależności między wartościami PVL a różnymi wariantami genetycznymi BLV, co to tej pory było przedmiotem ograniczonych badań (Murakami i wsp., 2019).

1.4. Zmienność genetyczna BLV

Obecnie znanych jest 11 podstawowych genotypów BLV (oznaczonych jako G1 do G11). Dodatkowo każdy z nich można podzielić na wiele podtypów, a występowanie ich związane z poszczególnymi obszarami geograficznymi. W Polsce dominuje genotyp 4, choć obserwuje się również występowanie genotypu 7 oraz 8. Uważa się, że wszystkie obecnie znane genotypy BLV nie różnią się pod względem zakaźności i patogenności, jednak szczegółowe badania pod tym kątem nie zostały do tej pory przeprowadzone. Analiza molekularna izolatów terenowych BLV wykazuje wysoki stopień homologii między sekwencjami w porównaniu do zmienności genetycznej występującej w obrębie pozostałych rodzajów w obrębie rodziny *Retroviridae*. Analiza sekwencji nukleotydowych dwóch izolatów terenowych BLV, oznaczonych jako K02120.1 (wyizolowanego w 1984 roku od bydła domowego) i MF580992 (wyizolowanego w 2016 od jaka domowego) wykazała 94,5% identyczności sekwencji w obrębie całego genomu, 96,6% w obrębie regionu LTR, 95,0% w obrębie genu kodującego glikoproteinę powierzchniową gp51 i 93,6% w obrębie genu kodującego białko Tax. Wyniki te zostały potwierdzone w toku dalszych analiz, gdy porównywano większą liczbę izolatów (Zhao i wsp., 2007; Rola-Łuszczak i wsp., 2013; Polat i wsp., 2016; Panei i wsp., 2013). Zmiany w obrębie genomu wirusa mogą pojawiać się w wyniku działania bardzo różnych czynników. Jednak większość tych zmian jest wynikiem nieprecyzyjnego kopiowania genomów wirusa. Wykazano, że odwrotna transkryptaza, pozbawiona jest aktywności naprawczej, stąd też katalizowane przez nią reakcje są głównym źródłem mutacji. Pomimo tego faktu, z dostępnych dotąd danych wynika, że odwrotna transkryptaza (RT) BLV kopiuje cząsteczki genomowe z 10-krotnie wyższą dokładnością (4.8×10^{-6} par zasad podczas jednego cyklu replikacyjnego w badaniach *in vitro*) niż RT innych wirusów (3.4×10^{-5} pz wirus HIV, 5.9×10^{-5} pz wirus ptasiej mieloblastozy, 3.3×10^{-5} pz wirus mysiej białaczki Moloneya oraz 1.2×10^{-5} pz wirus ptasiej martwicy śledziony), co jest typowe dla wszystkich wirusów z rodzaju *Deltaretrovirus* (Johnson i wsp., 1991; Preston i wsp., 1988; Roberts i wsp., 1988; Mansky i wsp., 1994). Zmienność genetyczną wirusa BLV w warunkach *in vivo* zbadano na przykładzie owiec eksperymentalnie zakażonych (klonem infekcyjnym pBLV344). Analiza zmian w sekwencjach genu *env* i regionu LTR BLV pochodzących od owiec asymptomatycznych wykazała tempo substytucji 0,009% i 0,034% nukleotydów /rok (Willems i wsp., 1993). Odsetek mutacji u owiec, u których rozwinęła się białaczka, wynosił 0,043% i 0,041% zmian nukleotydów /rok, odpowiednio w genie *env* i LTR. Dane te wskazują na niski poziom zmienności BLV *in vivo* u zwierząt asymptomatycznych jak i prezentujących objawy kliniczne (Willems i wsp., 1995). Najczęściej pojawiającymi się mutacjami w obrębie genomu wirusa są substytucje

nukleotydowe - tranzycje. Zdecydowanie rzadziej obserwuje się transwersje, delecje, insercje, duplikacje czy zmiany ramki odczytu. Stosunkowo niedawno, zidentyfikowano również w próbkach krwi pobranych od zakażonych BLV krów z przewlekłą limfocytową różnorodną populacją BLV złożoną z quasi –gatunków czyli spokrewnionych ze sobą wariantów wirusa (Zyrianova i wsp., 2018; Zyrianova i wsp., 2020). Zjawisko to występuje w obrębie retrowirusów z rodzaju *Lentivirus*, gdzie obecność quasi – gatunków jest jednym z mechanizmów prowadzących do ominięcia odpowiedzi immunologicznej i powstawania odporności na leki przeciwwirusowe (Domingo, 2020).

Zainteresowani zmiennością genetyczną wirusa BLV badacze skupiają swoją uwagę głównie na glikoproteinie powierzchniowej (gp51) wirusa odpowiedzialnej za wiązanie z receptorem komórki gospodarza, determinację tropizmu BLV, jak również będącej pierwszym antygenem rozpoznawanym przez komórki układu immunologicznego zakażonych zwierząt. Analogicznie do innych retrowirusów, glikoproteina gp51 zawiera domenę wiążącą receptor (ang. *receptor binding domain*, RBD) formowaną głównie przez epitopy konformacyjne F, G i H, epitopy CD4⁺ i CD8⁺ i domeny neutralizujące (ND1, ND2) decydujące o zakaźności wirusa oraz tworzeniu syncytiów. Dane literaturowe szeroko opisują mutacje, w obrębie regionów genu *env* kodujących determinanty antygenowe u innych retrowirusów, które generują powstawanie wariantów wirusa niekontrolowanych przez układ immunologiczny (Kato i wsp., 1999; VandeWoude i wsp., 2006). Badania na obecność selekcji pozytywnej w genie *env* kodującym gp51 BLV wykazały występowanie tego zjawiska w obrębie epitopów konformacyjnych G i liniowych epitopów D, D' (Nei i wsp., 1986; Zhao i wsp., 2007; Pluta i wsp., 2017). Szczegółowa analiza komputerowa pojedynczych kodonów przeprowadzona dla 256 sekwencji kodujących gp51 wykazała istnienie selekcji pozytywnej w sześciu pozycjach aminokwasowych. Wyłonione reszty aminokwasowe 48, 74 i 82 obejmowały położeniem aminokwasy w konformacyjnym epitopie G, reszty 133 i 142 były zlokalizowane w domenie ND2 pokrywającej się z peptydem wiążącym cynk, natomiast reszta 291 znajdowała się w liniowym epitopie A (Pluta i wsp., 2018). Uważa się że, mutacje w obrębie tych epitopów mogą indukować syntezę przeciwciał o zmienionym powinowactwie niż te, indukowane przez szczepy referencyjne BLV stosowane w serologicznych testach diagnostycznych. Dotychczas, opisano liczne mutacje w domenie wiążącej receptor (RBD) skutkujące zmianami w sekwencji aminokwasowej, jednak nie zaobserwowano bezpośredniego związku między tymi mutantami a zmienioną odpowiedzią humoralną organizmu gospodarza.

Kolejnym regionem genomu BLV, w którym badano zmienność genetyczną wirusa jest region LTR. Region ten zawiera szereg sekwencji regulatorowych zaangażowanych w

ekspresję wirusa oraz determinujących tropizm do określonych komórek organizmu gospodarza. Występowanie mutacji w sekwencjach wzmacniaczy i promotorów LTR, może uniemożliwiać efektywne wiązanie się czynników transkrypcyjnych do LTR i przyczynić się do obniżenia lub podwyższenia poziomu transkrypcji wirusa zależnie od lokalizacji mutacji (Radke i wsp., 1992). W tym względzie badanie nowych mutacji w obrębie regionów regulatorowych LTR jest szczególnie istotne, zwłaszcza w kontekście pojawiania się nowych zakażeń i ich wczesnej diagnostyki. Badania Merezaka i wsp. wykazały, iż suboptymalne sekwencje CRE (AGACGTCA, TGACGGCA, TGACCTCA) są niezbędne dla replikacji wirusa, a mutacje w tych sekwencjach są jednym z elementów ułatwiających ucieczkę wirusa przed układem odpornościowym (Merezak i wsp., 2001). Dowodem tego jest fakt, że mutageneza w tych suboptymalnych sekwencjach zwiększała powinowactwo wiązania czynników ATF i CREB do sekwencji CRE, wpływając tym samym na wydajność promotora, ale zdecydowanie osłabiała replikację wirusa *in vivo*. Kolejnym regionem uczestniczącym w regulacji procesu transkrypcji BLV jest sekwencja $\kappa\beta$, wewnątrz której znajduje się miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych PU.1 oraz Spi-B. Wykazano, iż mutacja (GGAA \rightarrow CCAA) w tej sekwencji znacząco obniżała stopień wiązania powyższych czynników (Dekoninck i wsp., 2003), redukując poziom transkrypcji prowirusa. Kolejny region R, zawiera sekwencję DAS (ang. *downstream activator sequence*) wraz z motywem E box (5-CACGTG-3) rozpoznawanym przez czynniki USF1 i USF2. Badania wykazały, że mutacje w motywie E box (CATATG oraz CACGGA) uniemożliwiały przyłączanie się USF1 oraz USF2 oraz powodowały spadek ekspresji genów wirusa (Calomme i wsp., 2002). Ostatni region U5 zawiera miejsce wiązania (5- TACTTTCTGTTTCTCG-3) dla IRF (ang. *interferon regulatory factor*), odpowiedzialnego za niezależną od Tax ekspresję BLV we wczesnym etapie infekcji (Zhao i wsp., 2007). Zaobserwowano, że trzy pojedyncze mutacje (5- TACAGTCTGTGTCTCG-3) znacząco obniżały stopień wiązania IRF, co w konsekwencji prowadziło do dwukrotnego spadku ekspresji genów wirusowych (Kiermer i wsp., 1998). Generalnie, obserwacje te wskazują, że zależnie od lokalizacji miejsca docelowego dla danego czynnika transkrypcyjnego w obrębie sekwencji LTR, indukowana jest pozytywna lub negatywna regulacja transkrypcji (Xiao i wsp., 1998). Jednak większość powyższych wyników badań pochodzi z obserwacji *in vitro*, przy wykorzystaniu mechanizmów mutagenezy ukierunkowanej i istnieje ograniczona liczba badań odnoszących się do występowania mutacji w regionie LTR u zwierząt naturalnie zakażonych BLV. Zhao i wsp. w oparciu o badanie sekwencji LTR 52 izolatów BLV, z różnych regionów geograficznych świata, wykazali stopień zróżnicowania sekwencji na poziomie 2.45% (Zhao i wsp., 2007). W podobnych badaniach

Hirsch i wsp. w oparciu o analizę sekwencji LTR 22 izolatów terenowych BLV z Brazylii, przeprowadzili analizę filogenetyczną różnicując pięć grup i potwierdzając występowanie licznych mutacji nukleotydowych, przy czym aż 40% z nich zlokalizowanych było w subregionie R-U5 (Hirsch i wsp., 2015). Na podstawie badań własnych, przeprowadzonych w oparciu o analizę 5 izolatów terenowych BLV z Polski (Pluta A., 2015), wykazano występowanie szeregu mutacji w miejscach wiązania czynników transkrypcyjnych w obrębie sekwencji TATA box, TRE, NF- κ B oraz IRF. W powyższych badaniach nie analizowano jednak funkcjonalnego znaczenia tych mutacji w aspekcie poziomu transkrypcji prowirusowego DNA. Można jednak założyć istnienie takiego związku podobnie jak opisywano to w przypadku zakażeń wirusem HTLV-1 u asymptomatycznych pacjentów, wykazując istnienie korelacji pomiędzy mutacjami punktowymi w LTR i poziomem prowirusowego DNA (Neto i wsp., 2011). Podobnie, w odniesieniu do wirusa HIV-1 wykazano, że mutacje w regionie LTR badanych subtypów A-G wirusa generują subtelne różnice w aktywności promotora, które miały znaczący wpływ na kinetykę replikacji wirusa i były podstawą stwierdzenia znacznych różnic biologicznych pomiędzy poszczególnymi podtypami HIV-1 (Jeeninga i wsp., 2000). W patogenezie zakażeń BLV krytycznym elementem biorącym udział w procesie transkrypcji prowirusowego DNA jest wspomniane białko Tax, które, jako transaktywator, oddziałuje na sekwencje wzmacniające transkrypcję tj. TRE w regionie U3, za pośrednictwem tworzenia się kompleksu z czynnikami komórkowymi: ATF1, ATF2 oraz CREB. W skład sekwencji białka Tax wchodzi trzy główne domeny, motyw palca cynkowego - domena biorąca bezpośredni udział w związaniu cząsteczki kwasu nukleinowego, region bogaty w powtórzenia leucynowe - wiążący różnego rodzaju ligandy komórkowe oraz region regulatorowy, odpowiedzialne za aktywację promotora w obrębie LTR, ekspresję i propagację wirusa *in vitro*, indukcję apoptozy oraz ekspresję licznych genów komórkowych (c-fos, AP-1, GTP). Arainga i wsp. wykazał, że mutacje aminokwasowe D247G oraz S240P w regionie regulatorowym Tax wpływają odpowiednio na regulację pozytywną lub negatywną transkrypcji (Arainga i wsp., 2012).

2. Cel i zakres pracy

Celem pracy była ocena występowania i charakteru mutacji w regionach regulatorowych LTR i genie *tax* wirusa enzootycznej białaczki bydła (BLV) i określenie związku tych mutacji z aktywnością transkrypcyjną wirusa i poziomem prowirusowego DNA.

Zadania szczegółowe obejmowały:

1. Analizę molekularną i filogenetyczną sekwencji LTR izolatów BLV będących przyczyną tzw. zakażeń nowopojawiających się oraz zakażeń występujących endemicznie na terenie Polski i innych sąsiadujących krajów (praca II.1, 2, 3).
2. Wykazanie związku między określonymi mutacjami w obrębie regionu LTR i białka Tax a aktywnością transkrypcyjną BLV *in vitro*. Analizie został poddany prowirusowy DNA BLV uzyskany z zakażeń definiowanych, jako tzw. nowopojawiające się w stadach, które uprzednio uzyskały status wolnych od białaczki bydła (praca II.2).
3. Wykazanie czy istnieje korelacja między określonymi mutacjami w regionie LTR, białku Tax i regionie kodującym cząsteczki miRNA a poziomem prowirusowego DNA w leukocytach krwi obwodowej (praca II.2, 3).

3. Omówienie uzyskanych wyników badań

Szczegółowy opis materiałów, metodyki i wyników badań wraz z dyskusją zawarty jest w publikacjach składających się na niniejszą rozprawę doktorską.

praca II.1

Pluta A, Rola-Łuszczak M, Douville RN, Kuźmak J. Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences. *Virology Journal* 2018, 25; 15(1):165.

Cel pracy i uzasadnienie badań

Badanie zmienności oraz ewolucji BLV jest istotnym zagadnieniem, w szczególności w obszarze molekularnej diagnostyki zakażeń oraz identyfikacji nowych wariantów genetycznych wirusa, warunkujących cechy funkcjonalne wirusa. Celem pracy była analiza molekularna i filogenetyczna sekwencji LTR izolatów terenowych BLV występujących u zakażonego bydła w krajach Europy Środkowo-Wschodniej. Należy podkreślić, że badanie polimorfizmu sekwencji LTR, na tak dużej liczbie izolatów BLV, podjęto w Europie po raz pierwszy.

Materiał i metody

Materiał badawczy w postaci 47 próbek krwi pełnej oraz surowicy krwi pochodził od krów ze stad w Polsce, uznanych za wolne od EBB, u których zanotowano przypadki nowych zakażeń. Próbkę zostały pobrane przez powiatowych lekarzy weterynarii w latach 2013-2016 z 8 województw i przesyłane do laboratorium PIWet-PIB w Puławach. Diagnostykę serologiczną BLV przeprowadzono z wykorzystaniem testu ELISA (IDEXX, blocking ELISA). Genomowy DNA izolowano z leukocytów krwi bydła przy użyciu zestawu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Dodatkowo do badań włączono 5 próbek genomowego DNA wyizolowanych z leukocytów krwi bydła w Polsce w 2009 roku (Rola-Łuszczak i wsp., 2013a) i 12 próbek genomowego DNA pochodzących z terenów endemicznych BLV Mołdawii, Chorwacji, Ukrainy i Rosji, pobranych w latach 2009-2012, w ramach wspólnych badań. W celu amplifikacji całego regionu LTR opracowano nową metodę tzw. OE-PCR (ang. *overlap extension PCR*). Zestaw trzech specyficznych par starterów zaprojektowano na podstawie sekwencji LTR prowirusa BLV wyizolowanego z linii komórkowej FLK/BLV (nr akcesyjny GenBank: EF600696). Optymalizację przebiegu reakcji przeprowadzono na aparacie T-Personal Thermo-cycler (Biometra) z wykorzystaniem DNA wyizolowanego z hodowli FLK/BLV. Przy użyciu metody OE-PCR amplifikowano fragment o długości 914 pz, a następnie po oczyszczeniu produktów amplifikacji poddano je sekwencjonowaniu metodą Sangera. Otrzymane sekwencje analizowano przy użyciu programu Geneious Pro 5.5.9

(Biomatters Ltd). Do porównania otrzymanych 64 sekwencji i analizy filogenetycznej użyto dodatkowo 17 sekwencji, dostępnych w bazie GenBank, reprezentujących 10 ówczesnie znanych genotypów BLV. Aby ustalić czy analizowane sekwencje regulatorowe w obrębie subregionów LTR znajdowały się pod wpływem presji selekcyjnej obliczono stosunek podstawień nukleotydów w sekwencjach regulatorowych (VR) do podstawień nukleotydów w sekwencjach nieregulatorowych (VNR), a gdy otrzymany wynik przedstawiał wartość VR/VNR >1 wnioskowano o działaniu presji selekcyjnej. Aby ustalić czy zidentyfikowane mutacje mogą modyfikować miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych przeprowadzono analizę *in silico* na serwerze multiTF (<http://multitf.dcode.org>).

Rezultaty badań i ich interpretacja

Zmienność genetyczną badanych izolatów (n=64) analizowano w odniesieniu do sekwencji referencyjnych izolatów BLV pochodzących z Japonii, Myanmar, Stanów Zjednoczonych, Kostaryki i krajów Ameryki Południowej (n=17). Wartości dystansu genetycznego między badanymi sekwencjami wahały się w zakresie od 0.008 do 0.029 i były zbliżone do wartości dystansu genetycznego wyznaczonego między badanymi sekwencjami, a sekwencjami referencyjnymi od 0.012 do 0.037. Liczbę pojedynczych nukleotydowych polimorfizmów. (ang. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) oraz insercji i delecji we wszystkich 64 sekwencjach LTR porównano z sekwencją konsensusową. Zidentyfikowano 97 mutacji w 89 pozycjach na całej długości sekwencji LTR. Najwyższy stopień zmienności odnotowano w subregionach U3 i U5. Wśród zmian nukleotydowych w obrębie regionów regulatorowych najczęściej obecne były: substytucja G(-133)A/C w TRE2 substytucja T(-65)C w GRE, substytucje T(-41)A, T(-37)A i T(-36)C w kasecie TATA, substytucje A(+150)G, T(+161)C, TC(+188/9)CT i T(+190)C w elemencie DAS. Ponadto występowały w nich delecje w pozycji C(-72)del w GRE, T(-11)del w CAP i TC(+188/9)del w kasecie C i insercja w T(+191)ins w DAS.

Analiza filogenetyczna poparta wysokimi wartościami prawdopodobieństwa *a posteriori* metodą Bayesa wykazała afiliację 45 sekwencji do genotypu G4, 9 sekwencji do genotypu G8 oraz przynależność 8 sekwencji do genotypu G7. Szczegółowa analiza, poparta wysokimi wartościami *a posteriori*, wykazała przynależność tych izolatów do odrębnych podgrup. Do podgrupy G4-I, G4-II, G4-IV zaklasyfikowane zostały izolaty wyłącznie z Polski, natomiast G4-III zawierała izolaty z Polski, Ukrainy, Rosji i Mołdawii. Analogicznie w genotypie G8 wszystkie izolaty zostały przypisane do dwóch odrębnych podgrup G8-I i G8-II, które zawierały wyłącznie izolaty z Polski lub Chorwacji. Podobnie w genotypie G7, wszystkie izolaty można było pogrupować w obrębie dwóch podgrup G7-I i G7-II skupiających wyłącznie

izolaty z Polski lub Mołdawii. Ostatecznie, zaobserwowano występowanie odrębnych genetycznie podgrup, skupiających izolaty ze ściśle określonych obszarów geograficznych.

Analiza zależności między wyodrębnionymi genotypami i podgrupami wykazała obecność 12 specyficznych lub unikalnych substytucji odnoszących się do poszczególnych grup. Pięć z tych polimorfizmów występowało w obrębie regionów regulatorowych LTR. I tak izolaty zaklasyfikowane do podgrupy G7-II posiadały unikalne substytucje G(-133)C w TRE2 i T(+161)C w DAS, izolaty zaklasyfikowane do podgrupy G7-I posiadały unikalną substytucję T(-41)A w kasecie TATA, izolaty należące do podgrupy G4-IV posiadały unikalną substytucję C(+162)T w DAS, natomiast izolaty należące do podgrupy G8-I i II charakteryzowały się specyficzną substytucją T(-65)C w GRE. Analiza *in silico* regionów regulatorowych zawierających powyższe substytucje wykazała że, poza substytucją T(+161)C, pozostałe mutacje modyfikowały miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych. Na uwagę zasługuje fakt, że polimorfizmy te występowały wyłącznie w izolatach z określonych obszarów geograficznych, bowiem substytucja T(-41)A występowała wyłącznie w izolatach z Polski, G(-133)C, T(+161)C występowała wyłącznie w izolatach z Mołdawii, substytucja T(-65)C w polskich i chorwackich izolatach, zaś C(+162)T wyłącznie w rosyjskich izolatach. Ponadto, zaobserwowano, że sekwencje polskich izolatów BLV pochodzące z 2009 roku grupowały się w innych kładach filogenetycznych w porównaniu z sekwencjami izolatów pochodzących z przypadków nowych zakażeń (w latach 2013-2016), co może świadczyć między innymi o ewolucji wirusa w kierunku powstawania form o odmiennych cechach biologicznych.

Ze względu na znaczną częstość występowania polimorfizmów w sekwencjach regulatorowych LTR podjęto próbę określenia czy analizowane sekwencje znajdowały się pod wpływem presji selekcyjnej. W przypadku subregionów U3 i U5 wykazano niższą zmienność genetyczną w sekwencjach regulatorowych (VR) od zmienności w obrębie sekwencji nieregulatorowych (VNR), a stosunek wartości VR/VNR był mniejszy niż 1 wskazując na działanie doboru negatywnego. Z kolei wartość VR dla subregionu R była wyższa od wartości VNR wskazując istnienie pozytywnej selekcji w sekwencji DAS. Szczegółowe badanie doboru naturalnego w obrębie poszczególnych podgrup wykazało, iż pozytywna selekcyjna w obrębie subregionu R była uwarunkowana dużą zmiennością genetyczną izolatów należących do podgrupy G4-III stanowiącej grupę kosmopolityczną oraz polskich izolatów należących do podgrupy G8-I. Dodatkowo pozytywną selekcję wykryto w subregionie U3 wyłącznie wśród polskich izolatów zaklasyfikowanych do podgrupy G4-I.

Analiza sekwencji nukleotydowych regionu LTR wykazała małe zróżnicowanie genetyczne badanych izolatów BLV. Niemniej jednak zidentyfikowano charakterystyczne

polimorfizmy modyfikujące sekwencje regulatorowe LTR, jak również zmieniające miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych. Występowanie tych polimorfizmów było uwarunkowane w większości przypadków pochodzeniem geograficznym danego izolatu BLV. Badania prowadzone z użyciem sekwencji LTR izolatów pochodzących z różnych krajów potwierdziły możliwość ich stosowania do klasyfikacji genotypów BLV powszechnie występujących na świecie. Jednak uzyskane wyniki nie dawały podstawy do jednoczesnego stwierdzenia czy zaobserwowane mutacje w obrębie sekwencji regulatorowych LTR, będące efektem presji selekcyjnej i adaptacji wirusa do organizmu gospodarza, mogą być podstawą do wnioskowania o wpływie tych mutacji na poziom replikacji wirusa.

praca II.2

Pluta A, Willems L, Douville RN, Kuźmak J. Effects of Naturally Occurring Mutations in Bovine Leukemia Virus 5'-LTR and Tax Gene on Viral Transcriptional Activity. *Pathogens* 2020; 9(10):836.

Cel pracy i uzasadnienie badań

Zwalczanie EBB polega na wczesnym wykrywaniu zakażonych zwierząt i eliminowaniu ich z hodowli, co jest przyczyną strat ekonomicznych. Dlatego tak istotną rolę przypisuje się diagnostyce zakażeń BLV, w której dominującą rolę odgrywa stosowanie metod serologicznych (ELISA) i molekularnych (wykrywanie prowirusowego DNA metodą PCR). Jednak ciągłym problemem spotykanym w stadach już uwolnionych, zarówno w Polsce jak i w innych krajach, są tzw. nowopojawiające się przypadki zakażeń BLV. Przypuszcza się, że jednym z czynników determinujących to zjawisko może być obecność wariantów BLV o obniżonym potencjale replikacyjnym, co w warunkach zakażenia naturalnego charakteryzuje się niską liczbą kopii prowirusa. Jedną z przyczyn tego zjawiska upatruje się w obniżonym poziomie transkrypcji wirusa, do której może dojść na skutek mutacji w regionie regulatorowym LTR, uniemożliwiających efektywne wiązanie czynników transkrypcyjnych. Biorąc pod uwagę takie założenie, należy przyjąć, że poszukiwanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw tego zjawiska jest szczególnie istotne, zwłaszcza w kontekście pojawiania się nowych zakażeń i ich wczesnej diagnostyki. Przyjmując, że aktywność transkrypcyjna BLV w bezpośredni sposób determinuje jego poziom replikacji w zakażonych komórkach, liczbę zakażonych komórek, a także wpływa na poziom indukowania odpowiedzi humoralnej, wyniki takich badań będą pomocne w określeniu wpływu mutacji w regionach ważnych dla replikacji wirusa na poziom tej replikacji. Pozwoli to określić rolę i znaczenie zmienności genetycznej BLV na występowanie zakażeń charakteryzujących się

niską liczbą kopii prowirusa. Są to ważne elementy, biorąc pod uwagę fakt, że Polska od maja 2017 roku jest krajem wolnym od EBB, jednak choroba ta, zgodnie z przepisami UE i OIE musi podlegać regularnym badaniom monitoringowym.

Cele szczegółowe pracy obejmowały: 1. analizę polimorfizmów regionu LTR u wyselekcjonowanych wariantów wirusa BLV z Polski otrzymanych w latach 2013-2018. 2. konstrukcję wektorów reporterowych zawierających region LTR z 15 wariantami sekwencyjnymi oraz sekwencją referencyjną BLV 344. 3. konstrukcję wektorów ekspresyjnych zawierających gen *tax* z 15 wariantami sekwencyjnymi oraz sekwencją referencyjną BLV 344. 4. transfekcję linii komórkowej HeLa wektorami zawierającymi poszczególne warianty sekwencyjne LTR i Tax. 5. ocenę poziomu ekspresji genu reporterowego zależnie od badanych wariantów. 6. korelację otrzymanych wyników z poziomem prowirusowego DNA.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 106 próbek genomowego DNA pochodzących od krów serologicznie dodatnich z potwierdzoną obecnością prowirusowego DNA. Zwierzęta te pochodziły z 51 stad występujących na obszarach Polski uznanych za wolne od EBB i reprezentujących przypadki nowych zakażeń. Przy użyciu metody OE-PCR amplifikowano region LTR, a następnie po oczyszczeniu produktów amplifikacji poddano je sekwencjonowaniu metodą Sangera. Otrzymane sekwencje analizowano przy użyciu programu Geneious Pro 5.5.9 (Biomatters Ltd). Liczbę polimorfizmów we wszystkich 106 sekwencjach LTR porównano z sekwencją referencyjną BLV 344 (nr akcesyjny GenBank: JC613347.1). W oparciu o klasyfikację sekwencji do poszczególnych genotypów i podgrup filogenetycznych, lokalizację polimorfizmów w elementach regulatorowych sekwencji oraz częstość występowania zidentyfikowanych mutacji w analizowanych sekwencjach, do dalszych badań wybrano 15 reprezentatywnych wariantów sekwencyjnych LTR. W celu amplifikacji całego genu *tax* opracowano nową własną metodę nested PCR. Czterdzieści trzy próbki genomowego DNA amplifikowano przy użyciu dwóch par specyficznych starterów, produkty amplifikacji poddano sekwencjonowaniu, zaś uzyskane sekwencje porównywano do sekwencji izolatu referencyjnego BLV 344. Do dalszych badań przeznaczono 15 sekwencji genu *tax* pochodzących z próbek genomowego DNA, z których uzyskano reprezentacyjne warianty sekwencyjne LTR.

W celu uzyskania wektorów zawierających poszczególne warianty sekwencyjne regionu LTR oraz genu *tax* potrzebnych do przeprowadzenia analiz funkcjonalnych, wykonano szereg procesów obejmujących: reakcję PCR mającą na celu syntezę poszczególnych wariantów sekwencji LTR i genu *tax*, przygotowanie plazmidów, transformację bakterii kompetentnych

plazmidem z wprowadzonym konstruktem, namnożenie odpowiednich klonów, izolację plazmidowego DNA, analizę restrykcyjną oraz reakcję sekwencjonowania. Wykorzystując polimerazę Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs), wykazującą aktywność egzonukleazy 3'-5' oraz specjalnie zaprojektowane startery, otrzymano wymagane warianty sekwencyjne LTR i *tax*, zawierające określone miejsca restrykcyjne. W pierwszym etapie klonowania wszystkie warianty LTR i *tax* ligowano do wektora pMiniT 2.0 przy użyciu zestawu NEB PCR Cloning Kit (New England BioLabs). W celu wklonowania fragmentu LTR do wektora pGL4.11(luc2P) (Promega) plazmidowy DNA z namnożonych klonów bakteryjnych z odpowiednim wariantem sekwencyjnym, trawiono enzymami restrykcyjnymi NheI i HindIII, a następnie przeprowadzono reakcję ligacji z wykorzystaniem ligazy T4 (Promega). W celu wklonowania fragmentu *tax* do wektora ekspresyjnego pSG5 plazmidowy DNA z odpowiednim wariantem sekwencyjnym oraz wektor, trawiono enzymami restrykcyjnymi ClaI-SacI, a następnie przeprowadzono ligację. W celu uzyskania większej ilości plazmidowego DNA o wysokim stopniu czystości i wolnego od endotoksyn, prowadzono izolację plazmidowego DNA w dużej skali z wykorzystaniem zestawu Plasmid Maxi Kit (Qiagen). W przeprowadzonym doświadczeniu wykorzystano linię komórkową HeLa. Komórki HeLa transfekowano plazmidem pGL4.11 zawierającym gen lucyferazy oraz odpowiedni wariant sekwencyjny regionu LTR, oraz plazmidem ekspresyjnym zawierającym odpowiedni wariant sekwencyjny genu *tax* przy użyciu zestawu TransIT-LT1 Transfection Reagent (Mirus). Wydajność transfekcji oceniano po 24 godzinach, na podstawie luminescencji emitowanej przez lucyferazę pochodzącą z żebroplawa (*Renilla reniformis*). Badanie aktywności różnych wariantów sekwencyjnych LTR przeprowadzono z użyciem zestawu odczynników Dual Luciferase Reporter Assays System (Promega) przy pomocy luminometru (Thermo Labsystems). Po 24 godzinach inkubacji, transfekowane komórki poddawano lizie z użyciem Passive Lysis Buffer (Promega). Pomiar aktywności lucyferazy polegał na podaniu odpowiedniego substratu i pomiarze intensywności emitowanej luminescencji. W celu wykrycia prowirusowego DNA BLV w leukocytach krwi bydła użyto technikę real time PCR, opartą na amplifikacji fragmentu 120 par zasad z obszaru genu *pol* z użyciem sondy typu TaqMan i różnych rozcieńczeń plazmidowego DNA (Rola-Łuszczak i wsp., 2013b). Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykonana została w programie STATISTICA 10 (StatSoft). Prezentowane wyniki doświadczeń stanowią średnią pomiarów uzyskanych z trzech oddzielnych powtórzeń każdego eksperymentu. Do oszacowania wpływu mutacji w odcinkach regulatorowych na poziom aktywności lucyferazy oraz w do porównania poziomu aktywności

promotora z poziomem ładunku prowirusowego DNA zastosowano nieparametryczny test U Manna – Whitneya.

Rezultaty badań i ich interpretacja

Otrzymane sekwencje nukleotydowe LTR (n=106) i aminokwasowe białka Tax (n=43) zostały zestawione i wzajemnie dopasowane (multiple alignment), a następnie porównywane z sekwencjami BLV 344 w celu analizy polimorfizmów pomiędzy sekwencjami. W wyniku przeprowadzonych analiz wykryto szereg istotnych polimorfizmów w obrębie regionów regulatorowych w odcinku U3 LTR tj.: A(-137)G i A(-135)G w regionie podobnym do miejsca wiązania jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (tzw. κ B-like site), C(-65)T w GRE; G(-43)T i T(-41)A w kasecie TATA, A(-37)T i C(-36)T w miejscu wiązania białka TBP (ang. *TATA Box binding protein*); oraz w odcinku R: T(-11)del w CAP, A(+150)G w kasecie A DAS, TC(+188/9)CT, CT(+191/2)del i T(+190)C w kasecie C region DAS.

Analiza sekwencji aminokwasowych białka Tax wykazała występowanie mutacji w regionach regulatorowych związanych z procesem transkrypcji tj.: E(42)K w domenie cynkowej, T(152)I, L(161)S, L(173)P, R(183)K i I(186)T w domenie aktywacji transkrypcji, C(257)G, C(257)Y, C(257)F, D(258)N i S(265)G w domenie wielofunkcyjnej. Kolejnym etapem badań prowadzących do analizy funkcjonalnej zmian sekwencyjnych w odcinkach LTR i Tax było uzyskanie wektorów z odpowiednim wariantem sekwencyjnym oraz zastosowanie ich do transfekcji linii komórkowej HeLa. Komórki HeLa były transfekowane w następującym układzie: 1) kotransfekcja wektorem reporterowym pGL4.11(luc2P) zawierającym gen lucyferazy oraz odpowiedni wariant sekwencyjny LTR, oraz wektorem pGL4.74(hRluc/TK) 2) kotransfekcja wektorem reporterowym pGL4.11(luc2P) zawierającym gen lucyferazy oraz odpowiedni wariant sekwencyjny LTR, wektorem pGL4.74(hRluc/TK) oraz wektorem ekspresyjnym pSG5 zawierającym sekwencję genu *tax* izolatu referencyjnego BLV 344 3) kotransfekcja wektorem reporterowym pGL4.11(luc2P) zawierającym gen lucyferazy oraz sekwencję LTR pochodzącą od izolatu referencyjnego BLV 344, wektorem pGL4.74(hRluc/TK) oraz wektorem ekspresyjnym pSG5 zawierającym odpowiedni wariant sekwencyjny genu *tax* pochodzący od badanych izolatów 4) kotransfekcja wektorem reporterowym pGL4.11(luc2P) zawierającym gen lucyferazy oraz odpowiedni wariant sekwencyjny LTR, wektorem pGL4.74(hRluc/TK) oraz wektorem ekspresyjnym pSG5 zawierającym odpowiedni wariant sekwencyjny genu *tax* pochodzący od badanych izolatów. Poziom ekspresji promotora z odpowiednim wariantem sekwencyjnym określono na podstawie intensywności luminescencji emitowanej przez lucyferazę świetlika wschodniego (*Photinus pyralis*). W doświadczeniach analizujących wpływ wariantu

sekwencyjnego na poziom ekspresji genu reporterowego, wartość luminescencji emitowaną przez komórki transfekowane izolatem referencyjnym BLV 344 bez udziału silnego transaktywatora jakim jest białko Tax przyrównano do wartości 2, natomiast wartość luminescencji emitowaną przez komórki kotransfekowane izolatem referencyjnym i wektorem ekspresyjnym niosącym białko Tax izolatu BLV 344 przyrównano do wartości 100.

1) W przypadku badania bazowej aktywności promotora (bez udziału białka transaktywatorowego), u 3 z 15 wariantów LTR zaobserwowano od 2.3 do 3.7 razy wyższą ekspresję białka reporterowego w stosunku do wariantu referencyjnego i różnice te były istotne statystycznie. Warianty te posiadały następujące mutacje, które nie występowały u pozostałych wariantów: A(-137)G, A(-135)G i A(-134)G w regionie podobnym do miejsca wiązania NF- κ B, G(-43)T w kasecie TATA, C(-53)A w regionie wzmacniacza CRE3; and T(+113)G w domniemanym miejscu wiążącym białko palca cynkowego związane z MYC (ang. *Myc-associated zinc finger protein*, MAZ). Nie zaobserwowano wariantu LTR posiadającego niższą ekspresję białka reporterowego w stosunku do wariantu referencyjnego.

2) W przypadku badania aktywności promotora z udziałem białka transaktywatorowego pochodzącego od izolatu referencyjnego, u 6 z 15 wariantów LTR zaobserwowano istotnie statystycznie wyższą ekspresję białka reporterowego (od 1.6 do 2.4 razy) w stosunku do wariantu referencyjnego. Warianty te posiadały wyżej opisane mutacje w punkcie 1) oraz dodatkowe mutacje tj. C(-83)T w regionie PU.1/Spi-B; CT(+191/2)ins w kasecie C region DAS. W tym eksperymencie również nie zaobserwowano wariantu LTR posiadającego niższą ekspresję białka reporterowego w stosunku do wariantu referencyjnego.

3) W przypadku badania aktywności transaktywacyjnej wariantów sekwencyjnych białka Tax, u 2 z 15 wariantów Tax zaobserwowano najwyższą ekspresję lucyferazy (od 2.8 do 3 razy) w stosunku do wariantu referencyjnego. Warianty te posiadały charakterystyczne mutacje tj.: T(69)M, L(92)F, L(141)V oraz S(281)P. Dla jednego wariantu zaobserwowano 0.6 razy niższą ekspresję białka reporterowego w stosunku do wariantu referencyjnego Tax i była ona prawdopodobnie związana z obecnością mutacji C(257)F zlokalizowanej w domenie wielofunkcyjnej.

4) W przypadku badania aktywności promotora wariantów sekwencyjnych LTR z udziałem odpowiadającym im wariantom sekwencyjnym białka Tax otrzymanych z tych samych izolatów, u 6 z 15 wariantów łączonych zaobserwowano od 2.1 do 3.7 razy wyższą ekspresję białka reporterowego w stosunku do wariantów referencyjnych (LTR + Tax). Różnice te były istotne statystycznie. W badaniu tym nie zaobserwowano wariantów generujących niższą ekspresję białka reporterowego w stosunku do wariantów referencyjnych. W wyniku

przeprowadzonej analizy stwierdzono, że polimorfizmy A(-137)G, A(-135)G, A(-134)G, C(-83)T, C(-53)A, G(-43)T, CT(+191/2)ins i T(+113)G w odcinku LTR oraz polimorfizmy C(257)Y/G, D(258)N, T(69)M/A, L141V i S(281)P w odcinku Tax mogły mieć wpływ na podwyższony poziom ekspresji genu reporterowego w linii komórkowej HeLa. Wykazano, iż grupa wariantów sekwencyjnych LTR+Tax generujących podwyższony poziom aktywności lucyferazy pochodziła z próbek genomowego DNA, w których określono wysoki poziom prowirusowego DNA, zaś grupa wariantów posiadających poziom aktywności lucyferazy zbliżony do referencyjnego pochodziła z próbek posiadających niski poziom prowirusowego DNA. Różnica między tymi grupami była statystycznie istotna. Nie wykazano jednak bezpośredniej korelacji między wzrostem poziomu aktywności lucyferazy a poziomem prowirusowego DNA.

Na podstawie uzyskanych wyników w doświadczeniu z transfekcją linii komórkowej i pomiarach poziomu aktywności lucyferazy *in vitro* stwierdzono, że niektóre polimorfizmy obecne w elementach regulatorowych w odcinkach LTR oraz Tax wpływały na podwyższony poziom ekspresji genu reporterowego w linii komórkowej HeLa. Nie zaobserwowano natomiast wariantów generujących niższą ekspresję białka reporterowego w stosunku do wariantu referencyjnego. Ponadto, stwierdzono istotny związek pomiędzy aktywnością promotora i aktywnością transaktywacyjną białka Tax a poziomem prowirusowego DNA w badanych próbkach. Spośród piętnastu wariantów tylko trzy wykazywały aktywność promotora na poziomie szczepu referencyjnego. Z kolei pozostałe 12 wariantów wykazywało zwiększoną aktywność transkrypcyjną. Oszacowano, że około 76% izolatów z badanej populacji posiadało aktywność promotora BLV wyższą od aktywności szczepu referencyjnego BLV 344. Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki należy przyjąć, że warianty BLV krążące u krów zakażonych BLV charakteryzują się zwiększoną aktywnością transkrypcyjną w porównaniu ze szczepem referencyjnym. Determinować to może ich zwiększony potencjał do rozprzestrzeniania się wirusa między osobnikami w stadzie. Fakt ten może wyjaśniać efekt nowo pojawiających się zakażeń BLV, w stadach bydła posiadających status stad wolnych od EBB.

praca II.3

Pluta A, Blazhko NV, Ngirande C, Joris T, Willems L, Kuźmak J. Analysis of Nucleotide Sequence of Tax, miRNA and LTR of Bovine Leukemia Virus in Cattle with Different Levels of Persistent Lymphocytosis in Russia. *Pathogens* 2021; 10(2):246.

Cel pracy i uzasadnienie badań

W komórkach zakażonych BLV, sekwencje regionu LTR, cząsteczki miRNA i białko Tax pełnią rolę w regulacji i ekspresji genów wirusowych i komórkowych, a także w procesie nowotworzenia. Chociaż odgrywają one decydującą rolę w biologii BLV, niewiele wiadomo na temat zmienności sekwencji tych części genomu BLV w odniesieniu do różnych etapów zakażenia BLV i różnych form EBB. Celem tej pracy była ocena zmienności sekwencji regionów BLV *tax*, miRNA i LTR u zakażonych zwierząt wykazujących niski lub wysoki poziom przewlekłej limfocytozy (PL). W pracy zastosowano dwa kluczowe wskaźniki charakteryzujące fazę przewlekłej limfocytozy tj. liczbę leukocytów w krwi obwodowej i liczbę kopii prowirusowego DNA.

Materiał i metody

Materiał badawczy w postaci 48 próbek krwi pełnej oraz surowicy krwi pochodził od krów z 4 stad występujących na obszarach Rosji, o wysokiej seroprevalencji BLV. Diagnostykę serologiczną BLV przeprowadzono z wykorzystaniem testu immunodyfuzji w żelu agarowym (BIOK, Kursk, Russia). Genomowy DNA izolowano z krwi bydła przy użyciu zestawu DNA-sorb-B Nucleic acid Extraction Kit (AmpliSens, Moscow, Russia). Liczbę leukocytów określono przy użyciu konwencjonalnej metody mikroskopowej, natomiast różnicowanie krwinek białych przeprowadzono na podstawie barwienia rozmazów krwi metodą Romanovsky'ego-Giemsy. Do klasyfikacji zwierząt z różnym poziomem przewlekłej limfocytozy użyto metodę Bendixena. Podziału próbek na dwie grupy tj. z niską i wysoką limfocytozą dokonano w oparciu o liczbę limfocytów stosując analizę skupień i algorytm k-najbliższych sąsiadów. Przy użyciu poprzednio opracowanych metod OE-PCR i nested PCR amplifikowano odpowiednio region LTR i gen *tax* wykorzystując polimerazę Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs). W celu amplifikacji fragmentu kodującego cząsteczki miRNA opracowano nową metodę nested PCR z użyciem wysokowiernej polimerazy PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio, Japan) i dwóch par specyficznych starterów. Identyfikację polimorfizmu prowirusowego DNA w obrębie części regulatorowych LTR, miRNA oraz *tax* wykonano stosując technikę sekwencjonowania Sangera. Otrzymane sekwencje analizowano przy użyciu programu Geneious Pro 5.5.9 (Biomatters Ltd). Liczbę mutacji we wszystkich sekwencjach porównano z sekwencją konsensusową. Klasyfikację badanych sekwencji do poszczególnych genotypów i podgrup filogenetycznych wykonano w oparciu o metodę najbliższego sąsiedztwa (ang. *Neighbour Joining*, NJ) zaimplementowaną w programie MEGA X oraz 160 sekwencji referencyjnych z innych krajów. Liczbę kopii prowirusowego DNA w 1 000 komórkach obliczono według wzoru $= (\text{liczba kopii prowirusowego genu } pol) / (\text{liczba kopii komórkowego genu } H3F3A/2) \times 1\ 000$. W celu

określenia liczby kopii prowirusowego DNA zastosowano real time PCR do amplifikacji fragmentu genu *pol* (Rola-Łuszczak i wsp., 2013a). W celu oznaczenia liczby kopii genu *H3F3A* opracowano nową metodę real time PCR w oparciu o sondę TaqMan. Istotnym elementem opracowania testu było przygotowanie standardu DNA poprzez amplifikację fragmentu 135 pz z obszaru genu *H3F3A*, jego klonowanie w plazmidzie pCR4-TOPO, zlinearyzowanie poprzez trawienie enzymem restrykcyjnym *PstI* i użycie różnych rozcieńczeń plazmidowego DNA do przygotowania krzywej standardowej.

Rezultaty badań i ich interpretacja

W celu zidentyfikowania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, delecji oraz insercji uzyskane sekwencje Tax (n=34), miRNA (n=40) i LTR (n=41) przyrównano do sekwencji konsensusowej. Sekwencje aminokwasowe Tax wykazały 97.3% identyczności, sekwencje nukleotydowe kodujące miRNA i LTR wykazały odpowiednio 98.4% i 98.5% identyczności. Spośród analizowanych sekwencji białka Tax wyodrębniono 15 wariantów mutacyjnych (od Tax_A do Tax_O) reprezentujących odrębne wzorce mutacji występujące w ważnych domenach funkcjonalnych i epitopach. Warianty te zaklasyfikowano do genotypu G4 i G7. W wyniku analizy sekwencji kodujących miRNA wyodrębniono 11 wariantów (od miRNA_A to miRNA_K) przedstawiających odrębne wzorce mutacji w regionach promotorów, terminatorów i sekwencjach miRNA, które następnie zaklasyfikowano do genotypu G4 i G7. Analiza sekwencji LTR wykazała istnienie 13 wariantów (oznaczonych od LTR_A do LTR_M), które różniły się mutacjami w obrębie regionu promotora, wzmacniaczy transkrypcji oraz innych sekwencji regulujących transkrypcję; jak również sekwencje te pogrupowano do genotypu G4 i G7. W celu określenia związku między polimorfizmami w obrębie sekwencji Tax, miRNA i LTR a poziomem limfocytozy utworzono dwie grupy: grupę I z niską liczbą leukocytów w zakresie od 12 000 do 21 000 na μl i prowirusowym DNA w liczbie poniżej 100 kopii na 1 000 komórek oraz grupę II z wysoką liczbą leukocytów w zakresie od 22 000 do 42 000 leukocytów na μl i prowirusowym DNA w powyżej 100 kopii na 1000 komórek. Następnie przeprowadzono segregację wariantów sekwencyjnych do wcześniej ustalonych grup. Cztery warianty Tax, pięć wariantów miRNA i pięć wariantów LTR przypisano do grupy I. Do grupy II przypisano siedem wariantów Tax, pięć wariantów miRNA i sześć wariantów LTR. W toku dalszej analizy sekwencji zidentyfikowano od 4 do 5 polimorfizmów występujących w wariantach Tax, miRNA i LTR pochodzących od bydła z niską limfocytozą, oraz od 6 do 7 polimorfizmów charakterystycznych dla wariantów zaklasyfikowanych do grupy z wysoką limfocytozą. Na podstawie badania korelacji między częstością poszczególnych mutacji w obrębie badanych regionów prowirusowego DNA a poziomem limfocytozy wykazano istotny

statystycznie związek między substytucją A(+187)C w kasecie C regionu DAS w obrębie LTR a wysoką limfocytozą. Ponadto wykryto, iż 70 % izolatów BLV pochodzących od krów z niską limfocytozą posiadało substytucję A(-4)G w sekwencji CAP, która nie występowała u krów z wysoką limfocytozą. Inne substytucje takie jak: G(-133)A/C w CRE2 (46.7%), C(+160)T w DAS (30%) i A(310)del w BLV-mir-B4-5p, A(357)G w BLV-mir-B4-3p, A(462)G w BLV-mir-B5-5p i GA(497-498)AG w BLV-mir-B5-3p (26.5%) były często spotykane w grupie izolatów z wysoką limfocytozą i jednocześnie nie występowały w grupie izolatów z niską limfocytozą. Analiza filogenetyczna wszystkich sekwencji wykazała występowanie wśród badanych izolatów BLV dwóch genotypów molekularnych (genotypy 4 i 7 są powszechne w Rosji), jednak nie znaleziono wyraźnego związku między tymi genotypami a poziomem PL.

W tym badaniu wykonano analizę sekwencji Tax, miRNA i LTR pochodzących od krów zakażonych BLV wykazujących różne poziomy PL. Charakterystyka molekularna tych regionów wykazała, że zmienność genomu BLV występujących u tych osobników była bardzo niska. Niemniej jednak wykryto kilka znaczących polimorfizmów we wszystkich rodzajach sekwencji, które były specyficzne tylko dla określonej grupy – z niską bądź wysoką limfocytozą. Zaobserwowano statystycznie istotny związek między polimorfizmem A(+187)C w regionie DAS w LTR a wysoką limfocytozą charakteryzującą się wysoką liczbą leukocytów (powyżej 22 000 leukocytów na μ l) i wysoką liczbą kopii prowirusowego DNA (powyżej 100 kopii na 1 000 komórek). Nadal jednak konieczne są dalsze badania, które zweryfikują funkcjonalne znaczenie powyższych polimorfizmów oraz ich związek z wysoką aktywnością proliferacyjną limfocytów i progresją choroby.

4. Wnioski

1. Analiza sekwencji regionu LTR wykazała małe zróżnicowanie genetyczne izolatów BLV pochodzących z Europy Środkowo-Wschodniej. Jednakże zidentyfikowano pojedyncze mutacje w obrębie sekwencji regulujących transkrypcję prowirusa, jak również zmieniające miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych. Występowanie tych polimorfizmów było uwarunkowane w większości przypadków pochodzeniem geograficznym danego izolatu BLV.
2. Badania prowadzone z użyciem sekwencji LTR izolatów BLV pochodzących z różnych krajów potwierdziły możliwość ich wykorzystania w klasyfikacji genotypów BLV, powszechnie występujących na świecie.
3. Badania mające na celu wykazanie wpływu mutacji, charakterystycznych dla poszczególnych wariantów BLV, na poziom replikacji wirusa wykazały, że niektóre polimorfizmy obecne w elementach regulatorowych w LTR oraz Tax wpływały na podwyższony poziom ekspresji genu reporterowego w komórkach HeLa. Nie zaobserwowano natomiast wariantów generujących niższą ekspresję białka reporterowego w stosunku do wariantu referencyjnego. Ponadto, stwierdzono istotny związek pomiędzy aktywnością promotora i aktywnością transaktywacyjną białka Tax, a poziomem prowirusowego DNA w badanych próbkach.
4. Wykazano, że większość badanych izolatów BLV uzyskanych od krów ze stad w Polsce posiadało aktywność promotora wyższą od aktywności szczepu referencyjnego BLV 344 w badaniach *in vitro*, co może determinować zwiększony potencjał transmisji wirusa między osobnikami w stadach.
5. Charakterystyka molekularna genów kodujących białko Tax, miRNA i regionu LTR wykazała niską zmienność genetyczną w obrębie wirusów BLV izolowanych od bydła z Rosji. Niemniej jednak wykryto kilka znaczących polimorfizmów we wszystkich rodzajach sekwencji, które były specyficzne tylko dla określonej grupy – z niską bądź wysoką limfocytozą.
6. Zaobserwowano statystycznie istotny związek między polimorfizmem A(+187)C w regionie DAS w LTR a wysoką limfocytozą charakteryzującą się wysoką liczbą leukocytów (powyżej 22 000 na μ l) i wysoką liczbą kopii prowirusowego DNA (powyżej 100 kopii na 1 000 komórek).

7. Należy przyjąć, że polimorfizm A(+187)C oraz niektóre inne zmiany notowane w genie *tax*, miRNA i regionie LTR mają charakter predykcyjny odnoszący się do stopnia rozwoju przewlekłej limfocytozy.

5. Streszczenie

Wirus enzoptycznej białaczki bydła (BLV), który wspólnie z wirusem białaczki T-komórkowej (HTLV) u ludzi zaliczany jest do rodziny *Retroviridae* i klasyfikowany jako rodzaj *Deltaretrovirus* jest czynnikiem etiologicznym enzoptycznej białaczki bydła (EBB). Jakkolwiek choroba ta charakteryzuje się długim okresem inkubacji, to już w ciągu kilku godzin po zakażeniu materiał genetyczny wirusa pozostaje zintegrowany w formie prowirusowego DNA z genomem gospodarza. W przebiegu zakażenia większość zwierząt pozostaje klinicznie zdrowa (postać aleukemiczna), jednak u około 30-70% zakażonych zwierząt następują zmiany proliferacyjne w układzie limforetikularnym prowadzące do przewlekłej limfocytozy (postać leukemiczna), co związane jest głównie z rozplemem limfocytów B o fenotypie CD5+. U około 5% zakażonych zwierząt obserwuje się zmiany guzowate w węzłach chłonnych i narządach wewnętrznych, co określa się jako formę guzową EBB. Nieznana jest profilaktyka swoista zakażeń BLV, dlatego walka z EBB polega na wczesnym wykrywaniu zakażonych zwierząt i bezwzględny eliminowaniu z hodowli. To z kolei przyczynia się do ogromnych strat ekonomicznych spowodowanych ubojem takich zwierząt, restrykcjami w obrocie zwierzętami i sprzedaży mleka. Dlatego tak istotną rolę przypisuje się diagnostyce zakażeń BLV, w której dominującą rolę odgrywa stosowanie metod serologicznych (ELISA) i molekularnych (wykrywanie prowirusowego DNA metodą PCR). Obecnie w Polsce corocznie notuje się kilkadziesiąt potwierdzonych przypadków zakażeń BLV. Wzmoczone zainteresowanie tematyką BLV wskutek nowo pojawiających się przypadków zakażeń BLV w stadach już uwolnionych skłoniło do badań występowania i charakteru mutacji w regionach regulatorowych LTR i genie *tax* BLV i określenie związku tych mutacji z aktywnością transkrypcyjną wirusa i poziomem prowirusowego DNA. Realizacja tego zadania wymagała sformułowania celów szczegółowych: analizy molekularnej i filogenetycznej sekwencji LTR izolatów BLV będących przyczyną tzw. zakażeń nowopojawiających się zakażeń w stadach, które uprzednio uzyskały status wolnych od białaczki bydła oraz zakażeń występujących endemicznie na terenie Polski i innych sąsiadujących krajach, wykazanie związku między określonymi mutacjami w obrębie LTR oraz Tax a aktywnością transkrypcyjną BLV *in vitro*, wykazanie czy istnieje korelacja między określonymi mutacjami w LTR i Tax a poziomem prowirusowego DNA w leukocytach krwi obwodowej.

W pierwszej części pracy badaniem objęto łącznie 123 izolaty BLV uzyskane od krów ze stad w Polsce, Mołdawii, Chorwacji, Ukrainie i Rosji, w latach 2009-2018. Badania molekularne izolatów wykazały, że należą one do trzech genotypów G4, G7 i G8 oraz co najmniej 8 odrębnych podtypów G4 I-IV, G7 I-II, G8 I-II. Zaobserwowano związek między

przynależnością danego izolatu do podtypu i jego pochodzeniem geograficznym. Ponadto, uznano, że otrzymany podział izolatów BLV do poszczególnych grup w oparciu o sekwencje LTR odzwierciedlał pierwotną klasyfikację BLV przeprowadzoną w oparciu o fragment genu *env*. W analizie sekwencji LTR zwrócono szczególną uwagę na polimorfizmy w obrębie regionów promotorowych oraz regulatorowych pełniących ważną rolę w regulacji ekspresji materiału genetycznego prowirusa. Do najczęściej występujących polimorfizmów zaliczono: A(-137)G i A(-135)G w regionie podobnym do miejsca wiązania jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (tzw. κ B-like site), C(-65)T w GRE; G(-43)T i T(-41)A w kasecie TATA, A(-37)T i C(-36)T w miejscu wiązania białka TBP (ang. *TATA box binding protein*); oraz w odcinku R: T(-11)del w CAP, A(+150)G w kasecie A DAS, TC(+188/9)CT, CT(+191/2)del i T(+190)C w kasecie C region DAS. Ponadto, analiza sekwencji aminokwasowych białka Tax, pełniącego funkcję transaktywatora ekspresji genów wirusowych, wykazała występowanie mutacji w regionach regulatorowych związanych z procesem transkrypcji tj.: E(42)K w domenie cynkowej, T(152)I, L(161)S, L(173)P, R(183)K i I(186)T w domenie aktywacji transkrypcji, C(257)G, C(257)Y, C(257)F, D(258)N i S(265)G w domenie wielofunkcyjnej. Warianty LTR oraz Tax z opisanymi zmianami w regionach regulatorowych podejrzewane o wpływ na proces transkrypcji i replikacji wirusa przeznaczono do dalszych badań. W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę funkcjonalną w warunkach *in vitro* mającą ocenić, czy obecność szeregu polimorfizmów w regionie LTR i białku Tax ma wpływ na ekspresję genomu prowirusa. W tym celu skonstruowano 15 wektorów LTR oraz odpowiadającym im 15 wektorów ekspresyjnych Tax niosących najczęściej występujące warianty sekwencyjne oraz wariant referencyjny bez polimorfizmu. W większości przeprowadzonych eksperymentów zaobserwowano różnice ekspresji genu reporterowego w zależności od wariantu sekwencyjnego LTR, Tax lub współdziałania obu wariantów jednocześnie. Warianty zawierające mutacje A(-137)G, A(-135)G, A(-134)G, C(-83)T, C(-53)A, G(-43)T, CT(+191/2)ins, i T(+113)G w sekwencji LTR oraz C(257)Y/G, D(258)N, T(69)M/A, L141V i S(281)P w sekwencji aminokwasowej Tax powodowały od 1.3 do 3.7 razy wyższą aktywność lucyferazy w porównaniu z typem referencyjnym BLV 344. Ostatecznie wykazano, iż warianty prezentujące podwyższony poziom ekspresji białka (lucyferazy) pochodziły z próbek genomowego DNA, w których określono wysokie wartości PVL. Przeprowadzone badania funkcjonalne wskazały, że polimorfizmy w regionie LTR i genie *tax* mają wpływ na poziom ekspresji genu reporterowego, tym samym mogą wpływać na ekspresję genomu prowirusa w komórkach leukocytów krwi zwierząt zakażonych BLV. W moich badaniach nie zaobserwowałam wariantów generujących niższą ekspresję białka reporterowego

w stosunku do wariantu referencyjnego. Na podstawie otrzymanych wyników oszacowałam, że większość badanych izolatów BLV uzyskanych od krów ze stad w Polsce posiadało aktywność promotora wyższą od aktywności szczepu referencyjnego BLV 344 w badaniach *in vitro*, co może wskazywać na jeszcze lepsze przystosowanie BLV do transmisji wśród osobników w stadzie.

Prowadzone badania obejmowały także 48 próbek krwi pochodzących od zakażonych BLV krów z Rosji i wykazujących przewlekłą limfocytozę (PL). Celem tej pracy była ocena zmienności sekwencji regionów BLV *tax*, miRNA i LTR u zakażonych zwierząt wykazujących niski lub wysoki poziom PL. W pracy zastosowano dwa kluczowe wskaźniki charakteryzujące fazę przewlekłej limfocytozy: liczbę leukocytów w krwi obwodowej i liczbę kopii prowirusowego DNA. W moich badaniach zidentyfikowałam kilka znaczących polimorfizmów we wszystkich rodzajach sekwencji, które były specyficzne tylko dla określonej grupy – z niską bądź wysoką limfocytozą - charakteryzującą się wysoką liczbą leukocytów (powyżej 22 000 na μ l) i wysoką liczbą kopii prowirusowego DNA (powyżej 100 kopii na 1 000 komórek). Około 70% izolatów BLV pochodzących od krów z niską PL posiadało substytucję A(-4)G w sekwencji CAP, która nie występowała u krów z wysoką limfocytozą. Inne substytucje takie jak: G(-133)A/C w CRE2 (46.7%), C(+160)T w DAS (30%) i A(310)del w BLV-mir-B4-5p, A(357)G w BLV-mir-B4-3p, A(462)G w BLV-mir-B5-5p i GA(497-498)AG w BLV-mir-B5-3p (26.5%) były często spotykane w grupie izolatów z wysoką limfocytozą i jednocześnie nie występowały w grupie izolatów z niską limfocytozą. Zaobserwowano statystycznie istotny związek między polimorfizmem A(+187)C w regionie DAS w LTR a wysoką limfocytozą. Wydaje się, że polimorfizm A(+187)C oraz niektóre inne zmiany zidentyfikowane w genie *tax*, miRNA i regionie LTR mogą mieć znaczenie prognostyczne odnoszące się do stopnia rozwoju przewlekłej limfocytozy.

Podsumowując, wyniki badań pozwoliły ocenić czy w populacji bydła naturalnie zakażonego BLV występują warianty genetyczne wirusa o odmiennym potencjale transkrypcyjnym, co związane jest z występowaniem mutacji w regionach regulatorowych genomu wirusa. Wyniki będą pomocne w określeniu roli i znaczenia zmienności genetycznej BLV na występowanie zakażeń charakteryzujących się niską oraz wysoką liczbą kopii prowirusa. Elementy te są krytyczne dla powodzenia diagnostyki zakażeń BLV, opartej na wykrywaniu swoistych przeciwciał w surowicy krwi i prowirusowego DNA.

6. Summary

The Bovine Leukemia Virus (BLV) together with the Human T-cell leukaemia virus (HTLV) belongs to the family of *Retroviridae*, is classified in the genus of *Deltaretrovirus* and is the etiological factor of the enzootic bovine leucosis (EBL). Although this disease is characterized by a long incubation period, within a few hours after infection, the genetic material of the virus is integrated in the form of a provirus with the host's genome. In the course of infection, most of the animals remain clinically healthy (aleukaemic state), however, in approximately 30-70% of infected animals there occur proliferative changes in the lymphoreticular system leading to persistent lymphocytosis (leukemic state), which is mainly related to proliferation of B CD5+ lymphocytes. In 5% of infected animals tumor changes in the lymph nodes and internal organs can be observed, which is defined as tumorous form of EBL. Due to lack of available vaccines the eradication of EBL based on detection of infected animals and their elimination from herds. This in turn contributes to huge economic losses caused by slaughter of infected animals, restrictions on their exports and restrictions on the sale of milk. Therefore the diagnosis of infections, by the use of serological (ELISA) and molecular methods (detection of proviral DNA by PCR), plays a crucial role.

At present, several dozens of confirmed cases of BLV infections are recorded in Poland every year. The growing interest in the subject of BLV resulting from arising new cases of BLV infections in already released herds prompted the authors to investigate the prevalence and the character of mutations in LTR regulatory regions and the *tax* gene of the BLV, and to determine the relationship between these mutations and the transcriptional activity of the virus and the proviral DNA level. The performance of this task required formulating specific objectives: to perform molecular and phylogenetic analysis of the LTR sequences of BLV isolates causing the so-called new emerging infections in herds previously given a BLV-free status and infections endemic in Poland and neighboring countries; to prove a correlation between specific mutations in LTR and Tax, and the BLV transcriptional activity *in vitro*; to show whether specific mutations in LTR and Tax are correlated with the proviral DNA level in the peripheral blood leukocytes.

In the first part, the study involved 123 BLV isolates in total, obtained in the years 2009-2018 from cows from herds in Poland, Moldavia, Croatia, Ukraine, and Russia. Molecular analyses of the isolates proved that they belong to three genotypes G4, G7, and G8, and at least 8 separate subtypes G4 I- IV, G7 I-II, G8 I-II. A relationship was observed between a given isolate's classification to a subtype and its geographic origin. Moreover, it was concluded that the

obtained classification of BLV isolates to specific groups based on LTR sequences reflected the original classification of the BLV that had been carried out based on a fragment of an *env* gene. In the analysis of the LTR sequence, particular focus was put on polymorphisms within promoter regions and regulatory regions serving an important role in regulating expression of the genetic material of the provirus. One of the most commonly occurring polymorphisms include A(-137)G and A(-135)G in κ B-like site, C(-65)T in GRE; G(-43)T and T(-41)A in TATA box, A(-37)T and C(-36)T in TATA box binding protein (TBP); and in R subregion: T(-11)del in CAP, A(+150)G in A box of DAS, TC(+188/9)CT, CT(+191/2)del and T(+190)C in C box of DAS. Furthermore, the analysis of amino acid sequences of the Tax protein, serving as a trans-activator of viral gene expression showed occurrence of mutations in regulatory regions related to the transcription process, that is, E(42)K in the zinc domain, T(152)I, L(161)S, L(173)P, R(183)K and I(186)T in the leucine-rich activation domain, C(257)G, C(257)Y, C(257)F, D(258)N and S(265)G in the multifunctional domain. The LTR and Tax variants with the described changes in the regulatory regions suspected of affecting the viral transcription and replication were intended for further research. In the next step of the study, functional analysis was conducted in *in vitro* conditions to determine whether the presence of a number of polymorphisms in LTR and the Tax protein affects the expression of the proviral genome. To this aim, 15 LTR vectors and corresponding 15 Tax expression vectors carrying most commonly occurring sequence variants and the reference variant without polymorphism were constructed. In most of the conducted experiments differences in the expression of the reporter gene were observed depending on the sequence variants of LTR, Tax or both variants cooperating simultaneously. The variants involving mutations A(-137)G, A(-135)G, A(-134)G, C(-83)T, C(-53)A, G(-43)T, CT(+191/2)ins, and T(+113)G in the LTR sequence and C(257)Y/G, D(258)N, T(69)M/A, L141V and S(281)P in the Tax amino acid sequence caused from 1.3 up to 3.7 times higher luciferase activity compared to the reference type BLV 344. Ultimately, it was proven that the variants showing increased protein (luciferase) expression level came from samples of genomic DNA, for which high PVL values were specified. The conducted functional studies showed that polymorphisms in the LTR and the *tax* gene affect the reporter gene expression level and thus may influence the expression of the proviral genome in leukocyte cells in the blood of BLV-infected animals. In my research, I have not observed variants generating lower expression of the reporter protein in relation to the reference strain. Based on the obtained results I have estimated that in most of the examined BLV isolates obtained from cows from herds in Poland promoter activity was higher than the

BLV 344 reference strain activity in *in vitro* studies, which may be indicative of an even better adaptation of the BLV to transmission in individuals in the herd.

The conducted studies also covered 48 blood samples taken from BLV-infected cows from Russia that showed persistent lymphocytosis (PL). The aim of this study was to assess variability of BLV *tax* gene, miRNA, and LTR region sequences in infected animals showing low or high PL. In the study, two key indicators typical of the PL stage of were applied, namely, the peripheral blood leukocyte count and the count of proviral DNA copies. In my research, I have identified several significant polymorphisms in all types of sequences specific only for particular group – with low or high PL – characterized by a high leukocyte count (over 22 000 per μ l) and a high number of proviral DNA copies (over 100 copies per 1,000 cells). About 70% of the BLV isolates obtained from cows with low PL had A(-4)G substitution in CAP sequence that did not occur in cows with high PL. Other substitutions, such as G(-133)A/C in CRE2 (46.7%), C(+160)T in DAS (30%) and A(310)del in BLV-mir-B4-5p, A(357)G in BLV-mir-B4-3p, A(462)G in BLV-mir-B5-5p and GA(497-498)AG in BLV-mir-B5-3p (26.5%) were common in the group of high PL isolates and, at the same time, did not occur in the group of low PL isolates. A statistically significant relationship was observed between A(+187)C polymorphism in DAS region in LTR and high PL. It seems that the A(+187)C polymorphism and some other changes identified in the *tax* gene, miRNA, and the LTR region may be prognostic of the stage of persistent lymphocytosis.

In summary, results of the study allowed to determine whether in a population of cattle naturally infected with BLV genetic variants of the virus with a different transcriptional potential occur, which is related to the occurrence of mutations in the regulatory regions of the viral genome. These findings will help determine the role and the meaning of the genetic variability of BLV on the occurrence of infections characterized by a low and a high count of proviral copies. These elements are critical for successful diagnosing of BLV infections based on detection of specific antibodies in serum and proviral DNA.

7. Piśmiennictwo

- Aida, Y., K. Okada, H. Amanuma. 1993. 'Phenotype and ontogeny of cells carrying a tumor-associated antigen that is expressed on bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma', *Cancer Res*, 53: 429-37.
- Alvarez, I., G. Gutiérrez, M. Gammella, C. Martínez, R. Politzki, C. González, L. Caviglia, H. Carignano, N. Fondevila, M. Poli, K. Trono. 2013. 'Evaluation of total white blood cell count as a marker for proviral load of bovine leukemia virus in dairy cattle from herds with a high seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus', *Am J Vet Res*, 74: 744-9.
- Arainga, M., E. Takeda, Y. Aida. 2012. 'Identification of bovine leukemia virus tax function associated with host cell transcription, signaling, stress response and immune response pathway by microarray-based gene expression analysis', *BMC Genomics*, 13: 121-21.
- Avidan, O., M. E. Meer, I. Oz, A. Hizi. 2002. 'The processivity and fidelity of DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptase of bovine leukemia virus', *Eur J Biochem*, 269: 859-67.
- Bai, L., H. Sato, Y. Kubo, S. Wada, Y. Aida. 2019. 'CAT1/SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection', *Faseb j*, 33: 14516-27.
- Barez, P. Y., A. Brogniez, A. Carpentier, H. Gazon, N. Gillet, G. Gutiérrez, M. Hamaidia, J. R. Jacques, S. Perike, S. N. Sriramareddy, N. Renotte, B. Staumont, M. Reichert, K. Trono, L. Willems. 2015. 'Recent Advances in BLV Research', *Viruses*, 7: 6080-88.
- Bartlett P. C., K. R. Sporer, C. J. Droscha, T. M. Byrem. 2019. 'BLV super-shedders: insights into a longitudinal field trial'. In: Proceedings of the 100th Conference of Research Workers in Animal Disease; Nov 2-5; Chicago, IL. Abstract nr 153.
- Brooks, P. A., G. L. Cockerell, J. K. Nyborg. 1998. 'Activation of BLV transcription by NF-kappa B and Tax', *Virology*, 243: 94-8.
- Bruck, C., S. Mathot, D. Portetelle, C. Berte, J. D. Franssen, P. Herion, A. Burny. 1982. 'Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51', *Virology*, 122: 342-52.
- Bruck, C., N. Rensonnet, D. Portetelle, Y. Cleuter, M. Mammerickx, A. Burny, R. Mamoun, B. Guillemain, M. J. van der Maaten, J. Ghysdael. 1984. 'Biologically active epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51: their dependence on protein glycosylation and genetic variability', *Virology*, 136: 20-31.
- Buehring, G. C., P. M. Kramme, R. D. Schultz. 1994. 'Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows', *Lab Invest*, 71: 359-65.
- Buehring, G. C., H. M. Shen, H. M. Jensen, K. Y. Choi, D. Sun, G. Nuovo. 2014. 'Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue', *Emerging infectious diseases*, 20: 772-82.
- Callebaut, I., V. Vonèche, A. Mager, O. Fumière, V. Krchnak, M. Merza, J. Zavada, M. Mammerickx, A. Burny, D. Portetelle. 1993. 'Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51', *J Virol*, 67: 5321-7.
- Calomme, C., T. L. Nguyen, Y. de Launoit, V. Kiermer, L. Droogmans, A. Burny, C. Van Lint. 2002. 'Upstream stimulatory factors binding to an E box motif in the R region of the bovine leukemia virus long terminal repeat stimulates viral gene expression', *J Biol Chem*, 277: 8775-89.
- Chi, J., J. A. VanLeeuwen, A. Weersink, G. P. Keefe. 2002. 'Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum', *Preventive Veterinary Medicine*, 55: 137-53.
- Choi, E. A., T. J. Hope. 2005. 'Mutational analysis of bovine leukemia virus Rex: identification of a dominant-negative inhibitor', *J Virol*, 79: 7172-81.
- Corredor, A. P., J. González, L. A. Baquero, H. Curtidor, N. N. Olaya-Galán, M. A. Patarroyo, M. F. Gutiérrez. 2018. 'In silico and in vitro analysis of boAP3d1 protein interaction with bovine leukaemia virus gp51', *PLoS One*, 13: e0199397.

- Debacq, Ch., M. T. Sanchez Alcaraz, F. Mortreux, P. Kerkhofs, R. Kettmann, and L. Willems. 2004. 'Reduced proviral loads during primo-infection of sheep by Bovine Leukemia virus attenuated mutants', *Retrovirology*, 1: 31-31.
- Dekoninck, A., C. Calomme, S. Nizet, Y. Launoit, A. Burny, J. Ghysdael, C. Van Lint. 2003. 'Identification and characterization of a PU.1/Spi-B binding site in the bovine leukemia virus long terminal repeat', *Oncogene*, 22: 2882-96.
- Derse, D. 1987. 'Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus-encoded trans-acting factor and by cis-acting response elements', *J Virol*, 61: 2462-71.
- Derse, D., L. Martarano. 1990. 'Construction of a recombinant bovine leukemia virus vector for analysis of virus infectivity', *Journal of Virology*, 64: 401-05.
- Domingo, E.. 2020. 'Quasispecies dynamics in disease prevention and control', *Virus as Populations*: 263-99.
- Durkin, K., N. Rosewick, M. Artesi, V. Hahaut, P. Griebel, N. Arsic, A. Burny, M. Georges, A. Van den Broeke. 2016. 'Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs', *Retrovirology*, 13: 33.
- Efsa Panel on Animal Health, Welfare. S. More, A. Botner, A. Butterworth, P. Calistri, K. Depner, S. Edwards, B. Garin-Bastuji, M. Good, C. Gortazar Schmidt, V. Michel, M. A. Miranda, S. S. Nielsen, M. Raj, L. Sihvonen, H. Spoolder, J. A. Stegeman, H. H. Thulke, A. Velarde, P. Willeberg, C. Winckler, F. Baldinelli, A. Broglia, B. Beltran-Beck, L. Kohnle, D. Bicout. 2017. 'Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): enzootic bovine leukosis (EBL)', *EFSA J*, 15: e04956.
- Florins, A., A. de Brogniez, M. Elemans, A. B. Bouzar, C. François, M. Reichert, B. Asquith, L. Willems. 2012. 'Viral expression directs the fate of B cells in bovine leukemia virus-infected sheep', *J Virol*, 86: 621-4.
- Florins, A., N. Gillet, B. Asquith, M. Boxus, C. Burteau, J. C. Twizere, P. Urbain, F. Vandermeers, C. Debacq, M. T. Sanchez-Alcaraz, I. Schwartz-Cornil, P. Kerkhofs, G. Jean, A. Théwis, J. Hay, F. Mortreux, E. Wattel, M. Reichert, A. Burny, R. Kettmann, C. Bangham, L. Willems. 2007. 'Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model', *Front Biosci*, 12: 1520-31.
- Forletti, A., M. A. Juliarena, C. Ceriani, A. F. Amadio, E. Esteban, S. E. Gutiérrez. 2013. 'Identification of cattle carrying alleles associated with resistance and susceptibility to the Bovine Leukemia Virus progression by real-time PCR', *Res Vet Sci*, 95: 991-5.
- Forletti, A., C. M. Lützelshwab, R. Cepeda, E. N. Esteban, S. E. Gutiérrez. 2020. 'Early events following bovine leukaemia virus infection in calves with different alleles of the major histocompatibility complex DRB3 gene', *Veterinary Research*, 51: 4.
- Frie, M. C., C. J. Droscha, A. E. Greenlick, P. M. Coussens. 2018. 'MicroRNAs Encoded by Bovine Leukemia Virus (BLV) Are Associated with Reduced Expression of B Cell Transcriptional Regulators in Dairy Cattle Naturally Infected with BLV', *Frontiers in Veterinary Science*, 4.
- Gillet, N. A., G. Gutiérrez, S. M. Rodriguez, A. de Brogniez, N. Renotte, I. Alvarez, K. Trono, L. Willems. 2013. 'Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection', *PLoS Pathog*, 9: e1003687.
- Gillet, N. A., M. Hamaidia, A. de Brogniez, G. Gutierrez, N. Renotte, M. Reichert, K. Trono, L. Willems. 2016. 'Bovine Leukemia Virus Small Noncoding RNAs Are Functional Elements That Regulate Replication and Contribute to Oncogenesis In Vivo', *PLoS Pathog*, 12: e1005588.
- Gillet, N., A. Florins, M. Boxus, C. Burteau, A. Nigro, F. Vandermeers, H. Balon, A. B. Bouzar, J. Defoiche, A. Burny, M. Reichert, R. Kettmann, L. Willems. 2007. 'Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human', *Retrovirology*, 4: 18.
- Graves, D. C., J. F. Ferrer. 1976. 'In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures', *Cancer Res*, 36: 4152-9.

- Green, J. R., I. A. Herbst, D. J. Schneider. 1988. 'An outbreak of lymphosarcoma in merino sheep in the South Western Cape', *J S Afr Vet Assoc*, 59: 27-9.
- Gutiérrez, G., S. M. Rodríguez, A. de Brogniez, N. Gillet, R. Golime, A. Burny, J. P. Jaworski, I. Alvarez, L. Vagnoni, K. Trono, L. Willems. 2014. 'Vaccination against δ -retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm', *Viruses*, 6: 2416-27.
- Hayashi, T., H. Mekata, S. Sekiguchi, Y. Kirino, S. Mitoma, K. Honkawa, Y. Horii, and J. Norimine. 2017. 'Cattle with the BoLA class II DRB3*0902 allele have significantly lower bovine leukemia proviral loads', *J Vet Med Sci*, 79: 1552-55.
- Hirsch, C., M. F. Camargos, E. F. Barbosa-Stancioli, A. A. Fonseca Júnior, D. S. Rajão, M. B. Heinemann, J. K. Reis, R. C. Leite. 2015. 'Genetic variability and phylogeny of the 5' long terminal repeat from Brazilian bovine leukemia virus', *Genet Mol Res*, 14: 14530-8.
- Inabe, K., K. Ikuta, Y. Aida. 1998. 'Transmission and propagation in cell culture of virus produced by cells transfected with an infectious molecular clone of bovine leukemia virus', *Virology*, 245: 53-64.
- Jeeninga, R. E., M. Hoogenkamp, M. Armand-Ugon, M. de Baar, K. Verhoef, B. Berkhout. 2000. 'Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G', *Journal of Virology*, 74: 3740-51.
- Johnson, P. R., T. E. Hamm, S. Goldstein, S. Kitov, V. M. Hirsch. 1991. 'The genetic fate of molecularly cloned simian immunodeficiency virus in experimentally infected macaques', *Virology*, 185: 217-28.
- Juliarena, M. A., S. E. Gutierrez, C. Ceriani. 2007. 'Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis', *Am J Vet Res*, 68: 1220-5.
- Kato K., H. Sato, Y. Takebe. 1999. 'Role of naturally occurring basic amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 subtype E envelope V3 loop on viral coreceptor usage and cell tropism' *J Virol.*; 73(7): 5520-5526.
- Katoh, I., H. Kyushiki, Y. Sakamoto, Y. Ikawa, Y. Yoshinaka. 1991. 'Bovine leukemia virus matrix-associated protein MA(p15): further processing and formation of a specific complex with the dimer of the 5'-terminal genomic RNA fragment', *J Virol*, 65: 6845-55.
- Kiermer, V., C. Van Lint, D. Briclet, C. Vanhulle, R. Kettmann, E. Verdin, A. Burny, L. Droogmans. 1998. 'An interferon regulatory factor binding site in the U5 region of the bovine leukemia virus long terminal repeat stimulates Tax-independent gene expression', *J Virol*, 72: 5526-34.
- Kincaid, R. P., J. M. Burke, C. S. Sullivan. 2012. 'RNA virus microRNA that mimics a B-cell oncomiR', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 3077-82.
- Kiss-Tóth, E., I. Unk. 1994. 'A downstream regulatory element activates the bovine leukemia virus promoter', *Biochem Biophys Res Commun*, 202: 1553-61.
- Klener, P., M. Szynal, Y. Cleuter, M. Merimi, H. Duvillier, F. Lallemand, C. Bagnis, P. Griebel, C. Sotiriou, A. Burny, P. Martiat, A. Van den Broeke. 2006. 'Insights into gene expression changes impacting B-cell transformation: cross-species microarray analysis of bovine leukemia virus tax-responsive genes in ovine B cells', *J Virol*, 80: 1922-38.
- Klintevall, K., K. Näslund, G. Svedlund, L. Hajdu, N. Linde, B. Klingeborn. 1991. 'Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum', *J Virol Methods*, 33: 319-33.
- Kobayashi, T., Y. Inagaki, N. Ohnuki, R. Sato, S. Murakami, K. Imakawa. 2019. 'Increasing Bovine leukemia virus (BLV) proviral load is a risk factor for progression of Enzootic bovine leucosis: A prospective study in Japan', *Prev Vet Med*.
- Lassauzet, M. L., M. C. Thurmond, W. O. Johnson, F. Stevens, J. P. Picanso. 1991. 'Factors associated with transmission of bovine leukemia virus by contact in cows on a California dairy', *Am J Epidemiol*, 133: 164-76.
- Lee, L. C., W. K. Scarratt, G. C. Buehring, G. K. Saunders. 2012. 'Bovine leukemia virus infection in a juvenile alpaca with multicentric lymphoma', *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 53: 283-86.

- Llames, L., J. Goyache, A. Domenech, A. V. Montaña, G. Suarez, E. Gomez-Lucia. 2001. 'Cellular distribution of bovine leukemia virus proteins gp51SU, Pr72(env), and Pr66(gag-pro) in persistently infected cells', *Virus Res*, 79: 47-57.
- Lucas, M. H., M. Dawson, D. Chasey, G. Wibberley, D. H. Roberts, R. Saunders. 1980. 'Enzootic bovine leucosis virus in semen', *Vet Rec*, 106: 128.
- Ma, J. G., W. B. Zheng, D. H. Zhou, S. Y. Qin, M. Y. Yin, X. Q. Zhu, G. X. Hu. 2016. 'First Report of Bovine Leukemia Virus Infection in Yaks (*Bos mutus*) in China', *Biomed Res Int*, 2016: 9170167.
- Mansky, L. M., H. M. Temin. 1994. 'Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus', *J Virol*, 68: 494-9.
- Meirom, R., S. Moss, J. Brenner. 1997. 'Bovine leukemia virus-gp51 antigen expression is associated with CD5 and IgM markers on infected lymphocytes', *Vet Immunol Immunopathol*, 59: 113-9.
- Merezak, C., C. Pierreux, E. Adam, F. Lemaigre, G. G. Rousseau, C. Calomme, C. Van Lint, D. Christophe, P. Kerkhofs, A. Burny, R. Kettmann, L. Willems. 2001. 'Suboptimal enhancer sequences are required for efficient bovine leukemia virus propagation in vivo: implications for viral latency', *J Virol*, 75: 6977-88.
- Miller, J. M., M. J. Van der Maaten. 1976. 'Serologic detection of bovine leukemia virus infection', *Veterinary Microbiology*, 1: 195-202.
- Mirsky, M. L., C. Olmstead, Y. Da, H. A. Lewin. 1998. 'Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle', *Anim Genet*, 29: 245-52.
- Moe, K. K., M. Polat, L. Borjigin, R. Matsuura, S. T. Hein, H. H. Moe, Y. Aida. 2020. 'New evidence of bovine leukemia virus circulating in Myanmar cattle through epidemiological and molecular characterization', *PLoS One*, 15: e0229126.
- Murakami, H., H. Todaka, J. Uchiyama, R. Sato, K. Sogawa, M. Sakaguchi, K. Tsukamoto. 2019. 'A point mutation to the long terminal repeat of bovine leukemia virus related to viral productivity and transmissibility', *Virology*, 537: 45-52.
- Nakada, S., J. Kohara, K. Makita. 2018. 'Estimation of circulating bovine leukemia virus levels using conventional blood cell counts', *Journal of Dairy Science*, 101: 11229-36.
- Nei, M., T. Gojobori. 1986. 'Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions', *Mol Biol Evol*, 3: 418-26.
- Neto, W. K., A. C. Da-Costa, A. C. de Oliveira, V. P. Martinez, Y. Nukui, E. C. Sabino, S. S. Sanabani. 2011. 'Correlation between LTR point mutations and proviral load levels among human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) asymptomatic carriers', *Viol J*, 8: 535.
- Niermann, G. L., G. C. Buehring. 1997. 'Hormone Regulation of Bovine Leukemia Virus via the Long Terminal Repeat', *Virology*, 239: 249-58.
- Ohno, A., S. N. Takeshima, Y. Matsumoto, Y. Aida. 2015. 'Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014', *Virus Res*, 210: 283-90.
- Ohshima, K., K. Okada, S. Numakunai, Y. Yoneyama, S. Sato, K. Takahashi. 1981. 'Evidence on horizontal transmission of bovine leukemia virus due to blood-sucking tabanid flies', *Nihon Juigaku Zasshi*, 43: 79-81.
- OIE, Manual. 2018. "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. ." In, edited by OIE Manual. OIE 2018.
- Ott, S. L., R. Johnson, S. J. Wells. 2003. 'Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms', *Preventive Veterinary Medicine*, 61: 249-62.
- Panei, C. J., M. S. Serena, G. E. Metz, M. E. Bravi, E. T. González, M. G. Echeverría. 2013. 'Analysis of the pX region of bovine leukemia virus in different clinical stages of Enzootic Bovine Leukemia in Argentine Holstein cattle', *Virus Res*, 171: 97-102.
- Piper, C. E., J. F. Ferrer, D. A. Abt, R. R. Marshak. 1979. 'Postnatal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions', *J Natl Cancer Inst*, 62: 165-8.
- Pluta, A., M. Rola-Luszczak, P. Kubiś, S. Balov, R. Moskalik, B. Choudhury, and J. Kuźmak. 2017. 'Molecular characterization of bovine leukemia virus from Moldovan dairy cattle', *Arch Virol*, 162: 1563-76.

- Pluta, A., L. M. Albritton, M. Rola-Łuszczak, J. Kuźmak. 2018. 'Computational analysis of envelope glycoproteins from diverse geographical isolates of bovine leukemia virus identifies highly conserved peptide motifs', *Retrovirology*, 15: 2.
- Pluta, A., M. Rola-Łuszczak, M. Olech, J. Kuźmak. 2015. 'Genetic diversity of the long terminal repeat of bovine leukaemia virus field isolates' *Bulletin. Vet. Inst. Pulawy*, 59, 4.
- Polat, M., S. N. Takeshima, K. Hosomichi, J. Kim, T. Miyasaka, K. Yamada, M. Arainga, T. Murakami, Y. Matsumoto, V. de la Barra Diaz, C. J. Panei, E. T. González, M. Kanemaki, M. Onuma, G. Giovambattista, Y. Aida. 2016. 'A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis', *Retrovirology*, 13: 4.
- Preston, B. D., B. J. Poiesz, L. A. Loeb. 1988. 'Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase', *Science*, 242: 1168-71.
- Radke, K., T. J. Sigala, D. Grossman. 1992. 'Transcription of bovine leukemia virus in peripheral blood cells obtained during early infection in vivo', *Microb Pathog*, 12: 319-31.
- Radke, K. 1999. 'Bovine Leukemia Virus (Retroviridae).' in Allan Granoff and Robert G. Webster (eds.), *Encyclopedia of Virology (Second Edition)* (Elsevier: Oxford).
- Roberts, D. H., M. H. Lucas, G. Wibberley, D. Chasey. 1981. 'Survival of bovine leukosis virus in bovine whole blood, serum and plasma', *J Biol Stand*, 9: 469-73.
- Roberts, J. D., K. Bebenek, T. A. Kunkel. 1988. 'The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1', *Science*, 242: 1171-3.
- Rola-Łuszczak, M., A. Pluta, M. Olech, I. Donnik, M. Petropavlovskiy, A. Gerilovych, I. Vinogradova, B. Choudhury, J. Kuźmak. 2013a. 'The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny', *PLoS One*, 8: e58705.
- Rola-Łuszczak, M., C. Finnegan, M. Olech, B. Choudhury, J. Kuźmak. 2013b. 'Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results' *J. Virol. Methods*, 189, 258–264.
- Rosewick, N., M. Momont, K. Durkin, H. Takeda, F. Caiment, Y. Cleuter, C. Vernin, F. Mortreux, E. Wattel, A. Burny, M. Georges, A. Van den Broeke. 2013. 'Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral microRNAs in B-cell leukemia/lymphoma', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 2306-11.
- Rovnak, J., J. W. Casey, A. L. Boyd, M. A. Gonda, G. L. Cockerell. 1991. 'Isolation of bovine leukemia virus infected endothelial cells from cattle with persistent lymphocytosis', *Lab Invest*, 65: 192-202.
- Ruggiero, V. J., B. Norby, O. J. Benitez, H. Hutchinson, K. R. B. Sporer, C. Droscha, C. L. Swenson, P. C. Bartlett. 2019. 'Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts', *J Dairy Sci*, 102: 9165-75.
- Sagata, N., J. Tsuzuku-Kawamura, M. Nagayoshi-Aida, F. Shimizu, K. Imagawa, Y. Ikawa. 1985. 'Identification and some biochemical properties of the major XBL gene product of bovine leukemia virus', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 7879.
- Sagata, N., T. Yasunaga, Y. Ogawa, J. Tsuzuku-Kawamura, Y. Ikawa. 1984. 'Bovine leukemia virus: unique structural features of its long terminal repeats and its evolutionary relationship to human T-cell leukemia virus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81: 4741-5.
- Sagata, N., T. Yasunaga, J. Tsuzuku-Kawamura, K. Ohishi, Y. Ogawa, Y. Ikawa. 1985. 'Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 677-81.
- Schwartz, I., A. Bensaïd, B. Polack, B. Perrin, M. Berthelemy, D. Levy. 1994a. 'In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle', *J Virol*, 68: 4589-96.
- Schwartz, I., D. Levy. 1994b. 'Pathobiology of bovine leukemia virus', *Vet Res*, 25: 521-36.
- Stone, D. M., L. K. Norton, J. C. Chambers, W. J. Meek. 2000. 'CD4 T lymphocyte activation in BLV-induced persistent B lymphocytosis in cattle', *Clin Immunol*, 96: 280-8.
- Stott, M. L., M. C. Thurmond, S. J. Dunn, B. I. Osburn, J. L. Stott. 1991. 'Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes', *J Gen Virol*, 72 (Pt 2): 307-15.

- Tajima, S., Y. Aida. 2000. 'The region between amino acids 245 and 265 of the bovine leukemia virus (BLV) tax protein restricts transactivation not only via the BLV enhancer but also via other retrovirus enhancers', *J Virol*, 74: 10939-49.
- Tajima, S., Y. Aida. 2002. 'Mutant tax protein from bovine leukemia virus with enhanced ability to activate the expression of c-fos', *Journal of Virology*, 76: 2557-62.
- Unk, I., E. Kiss-Toth, I. Boros. 1994. 'Transcription factor AP-4 participates in activation of bovine leukemia virus long terminal repeat by p34 Tax', *Nucleic Acids Res*, 22: 4872-5.
- Willems, L, P Kerkhofs, L Attenelle, A Burny, D Portetelle, R Kettmann. 1997. 'The major homology region of bovine leukaemia virus p24gag is required for virus infectivity in vivo', *Journal of General Virology*, 78: 637-40.
- Willems, L., C. Bruck, D. Portetelle, A. Burny, R. Kettmann. 1987a. 'Expression of a cDNA clone corresponding to the long open reading frame (XBL-I) of the bovine leukemia virus', *Virology*, 160: 55-9.
- Willems, L., A. Gegonne, G. Chen, A. Burny, R. Kettmann, J. Ghysdael. 1987b. 'The bovine leukemia virus p34 is a transactivator protein', *The EMBO journal*, 6: 3385-89.
- Willems, L., P. Kerkhofs, A. Burny, M. Mammerickx, R. Kettmann. 1995. 'Lack of LTR and ENV genetic variation during bovine leukemia virus-induced leukemogenesis', *Virology*, 206: 769-72.
- Willems, L., R. Kettmann, A. Burny. 1991. 'The amino acid (157-197) peptide segment of bovine leukemia virus p34tax encompass a leucine-rich globally neutral activation domain', *Oncogene*, 6: 159-63.
- Willems, L., R. Kettmann, G. Chen, D. Portetelle, A. Burny, D. Derse. 1992. 'A cyclic AMP-responsive DNA-binding protein (CREB2) is a cellular transactivator of the bovine leukemia virus long terminal repeat', *Journal of Virology*, 66: 766-72.
- Willems, L., E. Thienpont, P. Kerkhofs, A. Burny, M. Mammerickx, R. Kettmann. 1993. 'Bovine leukemia virus, an animal model for the study of intrastrain variability', *J Virol*, 67: 1086-9.
- VandeWoude S., C. Apetrei. 2006. 'Going wild: lessons from naturally occurring T-lymphotropic lentiviruses', *Clin Microbiol Rev*. 19(4):728-762.
- Xiao, J., G. C. Buehring. 1998. 'In vivo protein binding and functional analysis of cis-acting elements in the U3 region of the bovine leukemia virus long terminal repeat', *J Virol*, 72: 5994-6003.
- Zhao, X., C. Jimenez, H. Sentsui, G. C. Buehring. 2007. 'Sequence polymorphisms in the long terminal repeat of bovine leukemia virus: evidence for selection pressures in regulatory sequences', *Virus Res*, 124: 113-24.
- Zyrianova, I. M., S. N. Koval'chuk. 2018. 'Bovine leukemia virus pre-miRNA genes' polymorphism', *RNA Biol*, 15: 1440-47.
- Zyrianova, I. M., S. N. Kovalchuk. 2020. 'Bovine leukemia virus tax gene/Tax protein polymorphism and its relation to Enzootic Bovine Leukosis', *Virulence*, 11: 80-87.