



ДОСТИЖЕНИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ НАУКИ И ПРАКТИКИ

ACHIEVEMENTS OF VETERINARY SCIENCE AND PRACTICES

УДК 578.23

DOI:10.31677/2311-0651-2024-46-4-60-73

АНАЛИЗ ВАРИАЦИЙ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН И МИКРОРНК ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

¹Н.В. Блажко, кандидат биологических наук, директор

²С.Х. Вышегуров, доктор сельскохозяйственных наук, профессор

²Ч.А. Нгирандэ, магистрант

³А.Т. Плюта, доктор ветеринарных наук, профессор (ассистент)

³Я.М. Кузьмак, доктор ветеринарных наук, профессор

¹Научно-исследовательский центр «Инновации»

²Новосибирский государственный аграрный университет

³Государственный ветеринарный институт, г. Пулавы. Польша

E-mail: bnv@nic-innovations.ru

Ключевые слова: вирус лейкоза крупного рогатого скота, лейкемия, лимфоцитоз, однонуклеотидные замены, SNP, миссенс-мутации, изоляты вируса лейкоза.

Реферат. Был проведен ряд исследований по изучению изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории Новосибирской области. В рамках данных исследований изучены миссенс-мутации, SNP-замены и их влияние на тип течения инфекции. Проанализированы более 700 образцов, из них проведено полногеномное секвенирование 48 образцов. Была выявлена статистически значимая взаимосвязь между полиморфизмом A(+187)C в области последовательности активатора (DAS) в LTR (значение $p = 0,00737$) и высоким уровнем лимфоцитоза. Установлено, что мутация (-4)G в сайте CAP может определять тип течения инфекционного процесса при вирус-индуцированном лейкозе крупного рогатого скота. Установлено, что мутации G(-133)A/C в CRE2 (46,7 %), C(+160)T в DAS (30 %) и A(310)del в BLV-mir-B4-5p, A(357)G в BLV-mir-B4-3p, A(462)G в BLV-mir-B5-5p и GA(497-498)AG в BLV-mir-B5-3p (26,5 %) могут оказывать влияние на тип течения инфекционного процесса при вирус-индуцированном лейкозе крупного рогатого скота. Выявлено несколько полиморфизмов в геномных последовательностях BLV изолятов, которые открывают понимание механизмов реализации вирулентных свойств вируса лейкоза крупного рогатого скота.

ANALYSIS OF VARIATIONS IN AMINO ACID SUBSTITUTIONS AND MICRORNA ISOLATES OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS

¹N.V. Blazhko, PhD in Biological Sciences, Research Director

²S.H. Vyshegurov, Doctor of Agricultural Sciences, Professor

²Ch.A. Ngirande, Master's student

³A.T. Pluta, Doctor of Veterinary Medicine, Professor (Assistant)

³J.M. Kuzmak, Doctor of Veterinary Medicine, Professor

¹Research center Innovations

²Novosibirsk State Agrarian University

³State National Veterinary Institute, Pulawy, Poland

Keywords: bovine leukemia virus, leukemia, lymphocytosis, single nucleotide substitutions, SNP, missense mutations, leukemia virus isolates.

Abstracts. *A number of studies have been carried out to investigate isolates of bovine leukosis virus in the Novosibirsk region. Within the framework of these studies, missense mutations, SNP substitutions and their influence on the type of infection course were studied. More than 700 samples were analyzed, of which full genomic sequencing of 48 samples was performed. A statistically significant relationship was found between the A(+187)C polymorphism in the activator sequence (DAS) region of the LTR (p value = 0.00737) and a high level of lymphocytosis. It was found that the (-4)G mutation in the CAP site can determine the type of course of the infectious process in virus-induced bovine leukemia. We found that G(-133)A/C mutations 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 %) may influence the type of course of the infectious process in virus-induced bovine leukemia. Several polymorphisms in the genomic sequences of BLV isolates were identified, which open the understanding of the mechanisms of realization of virulent properties of bovine leukosis virus.*

Уже в XIX в. в серии сообщений описывалось появление клинических признаков вирус-индуцированного лейкоза крупного рогатого скота. Одни из первых полученных данных появились в 1871 г. в исследованиях, которые были посвящены изучению образований в селезенке коровы. [13, 20]. Три года спустя Боллинджер описал лейкоз как проявления лимфоцитоза, а в 1876 г. Siedamgrotzky и Hofmeister зафиксировали первые случаи лимфоцитарных злокачественных опухолей у крупного рогатого скота [12]. Таким образом, Европу, а точнее Литву, можно считать страной, в которой впервые выявили вирус [13]. Широкое распространение болезни произошло в результате масштабного импортирования европейского крупного рогатого скота в страны, свободные от данной инфекции. Несмотря на все эти доказательства, этиологический агент EBL был обнаружен только спустя много десятилетий на основании эпидемиологических данных. Наконец возбудитель этого злокачественного заболевания был выделен в виде культуры клеток в 1969 г. и получил название вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС) или вирус бычьей лейкемии (BLV).

BLV является онкогенным В-лимфотропным ретровирусом, который инфицирует крупный рогатый скот, вызывая хроническую инфекцию [14, 17]. Подавляющее большинство инфицированных BLV животных (около 70 %) являются бессимптомными носителями вируса. У этих животных не обнаружены ни клинические симптомы, ни изменение общего количества лимфоцитов. Таким образом, их можно идентифицировать только при наличии антител против BLV и/или провирусной ДНК, вирусной РНК. Примерно у одной трети BLV-инфицированных коров развивается доброкачественная поликлональная пролиферация В-клеток, называемая лимфоцитозом (PL). Это клиническое состояние характеризуется увеличением абсолютного числа лимфоцитов, циркулирующих в периферической крови, связанным с инверсией отношения В/Т-лимфоцитов [8, 16]. Несмотря на эти гематологические изменения, у животных с PL не развиваются никакие другие клинические признаки. Лимфоцитоз обычно стабилен в течение нескольких лет, но также может прогрессировать до фазы опухоли [8, 15].

Клиническим проявлением инфекции BLV является развитие лимфоидных опухолей. Фатальная лимфома, или лимфосаркома (ЛС), встречается у менее чем у 5–10 % инфицированных животных, и преимущественно у взрослого крупного рогатого скота старше 4–5 лет [10]. Не всегда инфекция развивается поэтапно, так, в одной трети случаев развитие опухолей происходит без PL [10, 11, 18]. Локальная пролиферация В-клеток, называемая лимфосаркомой, может возникать в разных органах и тканях, приводя к ряду нарушений, которые несовместимы с жизнью животного. Кроме того, инфицированные В-клетки также могут индуцировать

увеличение лимфатических узлов и вызывать лимфому. Кроме всех перечисленных патологий, BLV-инфекция также нарушает нормальное функционирование иммунной системы, что приводит к развитию условно-патогенных инфекций [8].

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС, BLV) относится к роду *Deltaretrovirus*, семейству ретровирусов (*Retroviridae*) и является этиологическим агентом энзоотического лейкоза крупного рогатого скота. Большинство инфицированных животных остаются бессимптомными носителями вирусной инфекции, однако у трети из них развивается устойчивый лимфоцитоз, а у 5–10% – лимфоидные опухоли [10–20].

Геном BLV, как и геномы всех ретровирусов, состоит из структурных генов *gag*, *pro*, *pol* и *env*. Кроме того, он содержит X-регион, имеющий открытые рамки считывания (ORF) регуляторных белков Tax, Rex, R3, и G4 [4, 6, 7, 9].

BLV-инфекция распространена по всему миру. В последнее десятилетие лейкоз крупного рогатого скота в РФ занимает одно из ведущих мест в инфекционной патологии. Болезнь наносит значительный экономический ущерб из-за нарушения воспроизводства стад, вынужденного убоя и выбраковки высокопродуктивных больных животных, ограничений хозяйственной деятельности (продажи молока, племенного молодняка), а также затрат на оздоровительные мероприятия. Большую тревогу вызывает качество используемой в пищу продукции от больных животных [12].

Плановые мероприятия по серологическому тестированию на лейкоз поголовья крупного рогатого скота показывают, что число неблагополучных пунктов по лейкозу в нашей стране увеличивалось до 2020 г., далее незначительно снизилось [1, 2, 9]. Методы оздоровления стад от лейкоза при недостаточности мер специфической профилактики сводятся к единственному действенному методу – убою больных и инфицированных BLV животных и замене их здоровыми особями. Данные о качестве продукции, получаемой от убойных животных, крайне ограничены и неоднозначны [1].

Важным условием продовольственной безопасности нашей страны является производство достаточных по объему, доброкачественных, экологически безвредных и полноценных продуктов питания животного происхождения [8, 14]. Особого внимания заслуживает оценка молока, а также мяса и других продуктов убоя, получаемых от животных, пораженных различными болезнями, в частности таким заболеванием, как лейкоз, встречающийся во всех субъектах Российской Федерации и многих странах мира.

Основными методами прижизненной диагностики лейкоза являются реакции иммунодиффузии в агаровом геле (РИД), иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР), которые позволяют выявить животных, инфицированных BLV, до начала развития болезни при отсутствии других признаков [5, 6, 13, 19].

Классические методы контроля стад в отношении инфекции BLV хотя и являются обязательными, однако не дают желаемого эффекта: сроки оздоровления затягиваются из-за случаев скрытого носительства вируса, что значительно повышает актуальность проблемы. По всей вероятности, суть ее кроется в нераскрытых до конца особенностях механизма взаимодействия в системе «вирус – клетка – среда» [4–6].

Многие механизмы взаимодействия «вирус – клетка – среда» хотя и изучаются учеными во всем мире, но остаются не до конца выясненными [1–20].

Так, при экспериментальном инфицировании телят в 50 % случаев BLV элиминируется из организма, в то время как у остальных 50 % животных он вызывает лейкоз, который со временем из гематологической стадии течения (PL-лимфоцитоз) переходит в клиническую [8].

Как упоминалось выше, примерно 60–70 % инфицированного BLV крупного рогатого скота являются бессимптомными носителями – AL¹. Однако бессимптомный период, продолжительность которого может быть от нескольких месяцев до нескольких лет, заканчивается, и у 30 % инфицированного крупного рогатого скота развивается стойкий лимфоцитоз (ЛП), который более чем в 5 % случаев с течением времени переходит в лимфому, являющуюся одной из летальных форм этого заболевания [15]. Клиническое состояние коров, инфицированных BLV, характеризуется увеличением числа циркулирующих В-лимфоцитов (более 10 000 клеток/мкл в периферической крови). Было обнаружено, что лимфома встречается преимущественно у взрослого крупного рогатого скота от 3 до 5 лет [17].

SBL² подразделяется на ювенильную³, тимусную и кожную формы в зависимости от возраста и места развития опухоли [8]. Ювенильная форма, встречаемая у молодняка моложе двух лет (обычно в 6 месяцев), проявляется в виде системной лимфомы. Тимусный лейкоз развивается у телят с 6 месяцев до 2 лет и характеризуется увеличением тимуса, сильной лимфопролиферацией ткани. Кожная форма встречалась у крупного рогатого скота в возрасте от 1 года до 3 лет, проявлялась как узелковая лейкемическая инфильтрация кожи. Тем не менее имеются сообщения об атипичных случаях SBL, в частности сочетающих форму, которая проявляется у молодняка, и форму, характерную для взрослого крупного рогатого скота, который является отрицательным относительно BLV-инфекции [11]. Поэтому вопрос о классификации лейкоза крупного рогатого скота остается открытым.

Вирус-индуцированный EBL⁴ характеризуется системной В-клеточной лимфомой, тогда как SBL включает опухоли как В-клеток, так и Т-клеток [13]. Происхождение клеток в опухолях определяется иммуногистохимическим анализом, подтверждение экспрессии производится маркерами клеток, а наличие BLV в организме, как правило, диагностируют с применением реакции иммунной диффузии, иммуноферментного анализа или путем обнаружения вирусного (провирусного) генома с помощью ПЦР. Количественные анализы, такие как проточная цитометрия и ПЦР в реальном времени, полезны для количественной оценки уровней экспрессии клеточных маркеров и нагрузок вируса BLV, но эти методы чаще используются в научных целях. Обнаружение моноклональности в пролиферации В-клеток является эффективным способом диагностики В-клеточной лимфомы у крупного рогатого скота [3]. Для оценки количества инфицированных клеток в бляшках Пейера применяют анализ IgH на основе ПЦР [4, 6, 7].

При энзоотической форме развивается контагиозная болезнь с длительным латентным периодом, во время которого можно диагностировать инфекцию по наличию вируса и/или антител. Болезнь характеризуется пролиферацией неопластических элементов, в результате чего образуются опухолевые массы [8].

Хотя EBL не встречается в большинстве европейских стран, данная форма лейкоза распространена во всем мире, в том числе в России. В некоторых докладах зарубежных ученых сообщается о выявлении EBL у телят [12], хотя это нетипично для молодняка. В Японии были обнаружены не только случаи раннего развития EBL, но и его нетипичные проявления, которые ранее не были зарегистрированы. В частности, была обнаружена поликлональная В-клеточная лимфома с высокими провирусными нагрузками и отсутствием лимфоцитоза у коров с EBL.

1 Алейкемия (от греч. а – отриц. част., leukos – белый и paima – кровь), или псевдолейкемия – термин, употребляющийся для обозначения такого рода лейкемических заболеваний, в которых отсутствует симптом лейкемии, т. е. бессимптомное, латентное вирусоносительство.

2 Sporadic bovine leukosis, спорадический лейкоз крупного рогатого скота – поражает молодняк до трех лет.

3 Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз – агрессивное миелопролиферативное заболевание, характеризующееся пролиферацией главным образом гранулоцитарного и моноцитарного звеньев.

4 Enzootic bovine leucosis, энзоотический лейкоз крупного рогатого скота – контагиозная болезнь с длительным латентным периодом, во время которого в крови выявляют вирус лейкоза КРС (ВЛКРС) и АТ к нему. В основном встречается у крупных животных, наиболее часто в возрасте 5–8 лет.

Полученные данные позволяют более глубоко понять иммунофенотипические особенности лейкоза крупного рогатого скота, а также механизмы развития опухолей у инфицированных животных [9, 18].

В клетках, инфицированных BLV, длинный терминальный повтор (LTR), вирусный белок Тах и микроРНК способствуют пролиферации вируса и клеток опухоли. Несмотря на важную роль данных последовательностей, мало что известно о генетической вариации последовательности этих частей генома BLV и их влиянии на исход заболевания.

Учитывая актуальность темы, целью наших исследований стало изучение особенностей реализации вирулентных свойств вируса лейкоза крупного рогатого скота у животных-носителей.

Работа проводилась в лаборатории энзимного анализа и ДНК-технологий испытательного лабораторного комплекса Новосибирского государственного аграрного университета, а также в Государственном институте ветеринарии в Пулавах (Польша).

Объектом исследований являлся крупный рогатый скот хозяйств Новосибирской области – 3954 головы, в том числе 780 голов, положительно реагирующих в ПЦР. Порода крупного рогатого скота черно-пестрая голштинизированная разных долей кровности, меньшую часть исследованных животных (28 %) составили чистопородные голштины. В работе использовали ДНК, выделенную из крови коров дойного стада. Предметом исследования являлись пробы крови животных, пробы ДНК, последовательности геномов rBLV. Отбор проб крови осуществляли из подхвостовой вены животных в стерильные одноразовые вакуумные пробирки с ЭДТА. Полученный материал (15–25 мл крови каждой пробы), исследовали с использованием автоматического гематологического анализатора в соответствии с ГОСТ 25382. Гематологические исследования и выделение ДНК производили в день поступления материала в лабораторию. В дальнейшем пробы крови хранили при температуре –20 °С.

Показатели крови определяли при помощи автоматического ветеринарного гематологического анализатора PCE-90 Vet, который производит измерения кондуктометрическим методом или методом Культера. На сегодняшний день это наиболее распространенный метод регистрации клеток крови, основанный на изменении электрического сопротивления при протекании суспензии клеток крови через измерительный капилляр.

Гематологический анализатор позволил произвести подсчет 18 параметров: концентрации тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов в единице объема, общее содержание гемоглобина, объемы регистрируемых клеток, гематокрит, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците. Кроме того, была возможность разделить лейкоциты на 3 популяции: лимфоциты, гранулоциты, нейтрофилы.

Гемоглобин подсчитывался традиционным фотометрическим методом.

Выделение ДНК проводилось в ламинаре с использованием разработанного нами метода. На основании полученных данных сформирована заявка на патент «Способ выделения нуклеиновых кислот».

Изобретение относится к молекулярной биологии, вирусологии и медицине, является способом выделения нуклеиновых кислот из крови, ткани и мазков человека и животных. Выделенная данным способом НК может быть использована при постановке полимеразной цепной реакции, а также в практической медицине для диагностики наследственных заболеваний человека, судебной медицине, генной дактилоскопии, диагностике возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных, в том числе заболеваний, передающихся половым путем.

В зависимости от намеченных задач было поставлено несколько групп ПЦР-реакций. Каждая реакция предполагала перед началом работы подобрать олигонуклеотидные прайме-

ры, синтезировать их, адаптировать реакцию по компонентам смеси и температурные режимы реакции, апробировать полученные праймеры в адаптированных условиях.

С целью количественной оценки провирусных нагрузок уровень провирусной ДНК в циркулирующей крови коров определяли с помощью полуколичественной ПЦР. Геномная ДНК была выделена из образцов крови инфицированных животных. Определение провирусной нагрузки производили в два этапа. На первом амплифицировали участок гена *pol* провируса BLV. Количество циклов ПЦР было адаптировано для наиболее качественного сравнения относительного количества провирусных последовательностей в образцах крови. Анализировали результаты реакции с помощью Саузерн-блоттинга. Амплификацию участка гена *GAPDH* (2974 п. н.) использовали в качестве внутреннего контроля целостности хромосомной ДНК. В качестве положительного контроля использовали культуру клеток FLK. Более слабый сигнал был сгенерирован путем амплификации геномной ДНК, выделенной от животных, инфицированных мутантными провирусами. Количественная оценка сигналов гибридизации показала, что мутантные формы вируса IG4, CRX3 и KPP реплицируются при более низких провирусных нагрузках по сравнению с диким типом или GP30. Использовали ПЦР в реальном времени [16], провирусные нагрузки оценивались количеством инфицированных клеток на 1 000 определённых.

Инкубационная смесь объемом 20 мкл содержала 2 мкл 10-кратного буфера и 1 мкл (5 ед.) Taq-полимеразы, 2 мкл раствора dNTP (10 мМ каждого), 1 мкл праймера (AGC)6G (20 пмоль), 2 мкл (0,5–1 мкг) ДНК, 12 мкл деионизованной воды. ПЦР проводили при следующих условиях: начальная денатурация в течение 1 мин. При 94 °C; 35 циклов (30 с при 94 °C, 30 с при 55 °C, 2 мин при 72 °C); финальная элонгация при 72 °C в течение 10 мин. Электрофорез продуктов амплификации проводили в 1 % агарозном геле. В качестве маркеров использовали M25 DNA Ladder и M11 DNA Ladder. На секвенирование были взяты фрагменты ДНК, выделенные из агарозных гелей. Получение библиотеки фрагментов ДНК проводили по протоколу подготовки быстрых библиотек, клональную эмульсионную ПЦР и секвенирование – с использованием наборов реактивов NucleoSpin Extract II kit согласно рекомендациям. Продукты ПЦР 15 образцов очищали с помощью набора NucleoSpin Extract II kit. Очищенные ампликоны были секвенированы на анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) с использованием Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Данные последовательности были проанализированы и впоследствии выравнены с помощью программного обеспечения Ugene.

В дополнение к 15 последовательностям BLV, представленным в работе, в выравнивание были включены дополнительные общедоступные последовательности, представляющие восемь известных генотипов.

Филогенетические деревья были построены с использованием Байеса с моделью замещения GTR и методом соседнего соединения (NJ) с моделью нуклеотидного замещения Tamura-Nei с надежностью кластеров, оцененной при загрузке 1 000 повторов. Средние нуклеотидные расстояния внутри (внутри генотипа) и среди (межгенотипические) генотипов BLV оценивались путем применения модели Tamura Nei в Ugene.

Усредненная парная идентичность последовательностей составила 97,1 %. Изменения наблюдались в вариантах, полученных из одних стад, а также между стадами и породами. Наиболее частые изменения последовательностей наблюдали в эпитопах T(52)I в домене Zn; и в многофункциональном домене Y(257)C; в эпитопе В-клеточной клетки L(278)I; T(167)I, L(173)P, R(183)K в эпитопе CD8⁺ CTL, в домене активации и домене транскрипционной активации в данном эпитопе соответственно. Все последовательности были сгруппированы в пятнадцать вариантов, названных последовательно от Tax_A до Tax_O, представляющих различные мутационные шаблоны по отношению к известным функциональным доменам и эпи-

топам. Филогенетический анализ показал, что варианты Tax_A–K и Tax_O принадлежат к генотипу 4, а остальные варианты, Tax_L–N, относятся к генотипу 7.

Для показателей крови крупного рогатого скота разных групп была рассчитана описательная статистика с использованием пакетного анализа данных.

Чувствительность определялась как доля животных с высоким PVL, которые были классифицированы согласно лейкозному ключу, тогда как специфичность определялась как доля животных с неопределяемым/низким PVL, типичным для алейкемической стадии развития инфекции.

Так как соответствие или несоответствие нормальности распределения влияет на выбор статистических методов обработки данных, перед проведением дисперсионного анализа оценивали нормальность распределения выборки для непрерывных переменных или форму вековой функции для дискретных переменных. Результаты представлены в виде эмпирических гистограмм, показывающих, с какой частотой значения переменной попадают в определенные интервалы или принимают определенные значения.

Для выявления и оценки тесноты связи между двумя рядами сопоставляемых количественных показателей, в частности показателей крови и вирусной нагрузки, использовали факторный дисперсионный анализ.

Для качественного описания кластеров применен дискриминантный анализ. Результаты пошагового варианта дискриминантного анализа анализировали, все переменные достигали значимых показателей λ Уилкса. Уровень значимости определяли по критерию Фишера.

Опровержение гипотезы о влиянии категориального фактора на непрерывные переменные и дискриминацию выборки по данному признаку, оценку когезивности каждого класса проводили с использованием λ Уилкса и применением критерия Фишера.

Сигма-ограниченную модель применяли для получения ограниченного сигма-кодирования, что позволило оценить воздействие категориальных предикторных переменных в общих линейных и нелинейных моделях.

Дискриминантный анализ использовали для оценки точности классификации данных на группы.

Статистический анализ проведен с помощью пакета программ Statistica 10.

Для анализа использовали последовательности 34 ампликона гена Tax гена, которые в дальнейшем были секвенированы. Мутации Mis-sense⁵ (миссенс-мутация) были обнаружены в 33 вариантах. Те же изменения наблюдались в вариантах, полученных внутри стад, внутри пород и между стадами и породами. Наиболее частые изменения в функциональных доменах Tax и эпитопах включали T(52)I в цинк-пальцевом домене; Y(257)C в многофункциональном домене; L(278)I в В-клеточном эпитопе; и T(167)I, L(173)P, R(183)K в эпитопе CD8+ CTL, которые захватывают богатый лейцином домен активации и домен транскрипционной активации в этом эпитопе соответственно. Субпоследовательно все последовательности гена Tax были сгруппированы в пятнадцать вариантов, которым присвоили наименования от Tax_A до Tax_O, представляющих различные мутационные шаблоны по отношению к известным функциональным доменам и эпитопам. Миссенс-мутации в Tax показаны в таблице 1. Филогенетический анализ показал, что вариации Tax_A–K и Tax_O принадлежат к генотипу 4, а остальные варианты, Tax_L–N, относятся к генотипу 7.

5 Миссенс-мутация относится к изменению одной аминокислоты в белке, возникающему в результате точечной мутации в одном нуклеотиде. Миссенс-мутация – это тип несинонимичной замены в последовательности ДНК.

Таблица 1

Вариации изолятов вируса лейкемии крупного рогатого скота (BLV), сравнивали с консенсусной последовательностью
Variations in bovine leukemia virus (BLV) isolates, were compared to consensus sequence

Наименование вариации	Позиция (сайт)	Аминокислотные замены ⁶	Домен	Генотип
1	2	3	4	5
Tax_A	40	Q → L	Цинк-пальцевый белок ⁷	4
	142	V → A	Т-клеточный эпитоп	
	233, 281	L → P, S → P	- ⁸	
Tax_B	42	E → K	Цинк-пальцевый белок	4
	140	N → I	Т-клеточный эпитоп	
	142	V → A	Т-клеточный эпитоп	
	233, 281	L → P, S → P	-	
Tax_C	51	E → K	Цинк-пальцевый белок	4
	131	I → V	Т-клеточный эпитоп	
	186	I → V	Эпитоп CTL ⁹ , богатый лейцином домен	
	69, 102, 214, 221, 228	T → M, V → I, I → T, T → P, E → A	-	
Tax_D	52	T → I	Цинк-пальцевый белок	4
	183	R → K	Эпитоп CTL, богатый лейцином домен	
	278	L → I	В-клеточный эпитоп	
Tax_E	52	T → I	Цинк-пальцевый белок	4
	140	N → K	Т-клеточный эпитоп	
	183	R → K	Эпитоп CTL, богатый лейцином домен	
	278	L → I	В-клеточный эпитоп	
	69	T → M	-	
Tax_F	52	T → I	Цинк-пальцевый белок	4
	124	S → F	Т-клеточный эпитоп	
	183	R → K	Эпитоп CTL, богатый лейцином домен	
	278	L → I	В-клеточный эпитоп	
	2, 22, 73	S → A, N → S, R → Q	-	
Tax_G	52	T → I	Цинк-пальцевый белок	4
	183	R → K	Эпитоп CTL, богатый лейцином домен	
	245	A → T	Мультифункциональный эпитоп	
	278	L → I	В-клеточный эпитоп	
	235	Q → R	-	
Tax_H	178	F → Y	Эпитоп CTL, богатый лейцином домен	4
	246	I → T	Мультифункциональный эпитоп	
	249	F → L	Мультифункциональный эпитоп	
Tax_I	245	A → T	Мультифункциональный эпитоп	4
	102, 214, 221	V → I, I → T, T → P	-	
Tax_J	117	Q → R	Т-клеточный эпитоп	4
	102	V → I	-	

6 Однобуквенные коды 20 аминокислот в соответствии с IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry – это Международный союз теоретической и прикладной химии).

7 Цинк-пальцевые (Zn-finger) белки – группа транскрипционных факторов.

8 Сайт, не определенный функциональным доменом.

9 CTL – цитотоксичные Т-лимфоциты

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5
Tax_K	141	$L \rightarrow S$	Т-клеточный эпитоп	4
	186	$I \rightarrow V$	Эпитоп CTL, богатый лейцином домен	
Tax_L	167	$T \rightarrow I$	Эпитоп CTL, богатый лейцином домен	7
	173	$L \rightarrow P$	Эпитоп CTL, богатый лейцином домен	
	257	$Y \rightarrow C$	Мультифункциональный эпитоп	
	2, 69, 95, 214, 221, 233, 281	$S \rightarrow A^{5/9}g^*$, $T \rightarrow A$, $A \rightarrow T$, $I \rightarrow T^{8/9}$, $T \rightarrow S$, $L \rightarrow P$, $S \rightarrow P$	-	
Tax_M	167	$T \rightarrow I$	Эпитоп CTL, богатый лейцином домен	7
	173	$L \rightarrow P$	Эпитоп CTL, богатый лейцином домен	
	198	$A \rightarrow T$	Эпитоп CTL	
	257	$Y \rightarrow C$	Мультифункциональный эпитоп	
	69, 95, 198, 214, 221, 227, 233, 281	$T \rightarrow A$, $A \rightarrow T$, $A \rightarrow T$, $I \rightarrow V$, $T \rightarrow S$, $S \rightarrow T$, $L \rightarrow P$, $S \rightarrow P$	-	
Tax_N	43	$R \rightarrow K$	Цинк-пальцевый белок	7
	173	$L \rightarrow P$	Эпитоп CTL, богатый лейцином домен	
	257	$Y \rightarrow C$	Мультифункциональный эпитоп	
	2, 69, 95, 212, 221, 233, 281	$S \rightarrow A$, $T \rightarrow A$, $A \rightarrow T$, $V \rightarrow I$, $T \rightarrow S$, $L \rightarrow P$, $S \rightarrow P$	-	
Tax_O	102, 214, 221	$V \rightarrow I^{7/9}$, $I \rightarrow T^{6/9}$, $T \rightarrow P^{6/9}$	-	4

* §, Пять из девяти штаммов имеют $S \rightarrow$ Замена в варианте Tax_L

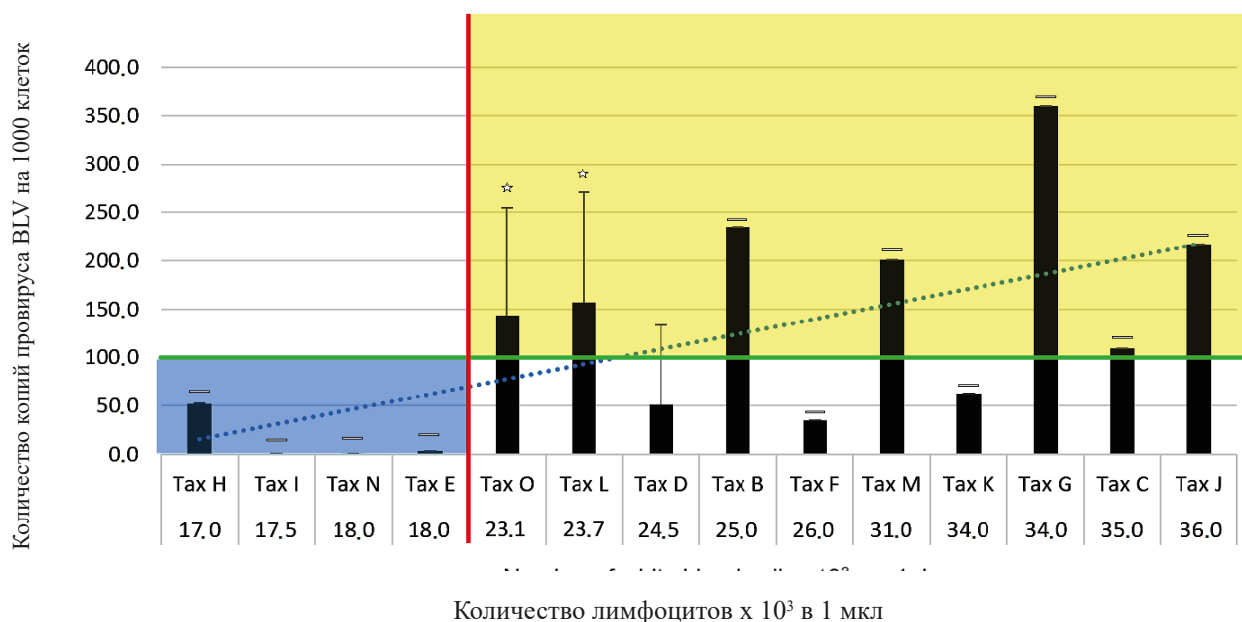


Рис. 1. Корреляция между провирусной нагрузкой провируса BLV и абсолютным содержанием лейкоцитов в 1 мкл, между группами с разным профилем Tax

Fig. 1. Correlation between BLV proviral load and absolute leukocyte count in 1 μL, between groups with different Tax profiles

По результатам графического анализа можно разделить большинство вариантов на две группы (рис. 1). Четыре варианта Tax (Tax_E, _H, _I, _N), были отнесены к группе I (Вирусная нагрузка < 100 копий на 1 000 клеток и абсолютное содержание лейкоцитов < 22 000 лейкоцитов/мкл). Семь вариантов Tax (Tax_B, _C, _G, _J, _L, _M, _O), были отнесены ко второй группе (вирусная нагрузка > 100 копий на 1 000 клеток и абсолютное содержание лейкоцитов

$\geq 22\ 000$ /мкл). Остальные варианты, т. е. Tax_D, _F, _K, составляющие 13 % от общей выборки, не могли быть отнесены ни к какой группе, поскольку у них количество лейкоцитов не коррелировало с количеством копий провируса. Вариант А был связан с лейкозом и характеризовался как внутриклеточный эпитоп Q(40)L и V(142)A.

Последовательности области микроРНК показали среднюю парную идентичность 98,4 %. Консенсусная последовательность, построенная для множественного выравнивания, была использована для определения нуклеотидных вариаций в генах pre-miRNA-B и их промоторных элементов. В дополнение к pre-miРНК-B1 однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) были идентифицированы на участках всех генов pre-miRNA-B. Наиболее частые изменения содержали A(154)G в BLV-mir-B2-3p, C(249)G в BLV-mir-B3-5p, A(310)del в BLV-mir-B4-5p, A(357)G в BLV-mir-B4-3p, A(462)G в BLV-mir-B5-5p и GA(497–498)AG в BLV-mir-B5-3p. Кроме того, было выявлено 18 A-box-1, -2, -3 последовательностей, шесть – в B-box и семь – в терминаторных последовательностях (рис. 2).

B-Box чаще всего располагались за 3p arm или между микроRNA последовательностями: (1) GTTCGAAC, (2) RGTTCGCG, (3) RGWTAAGAC, (4) RGTTCGAATC, (5) GTTGCRAC и (6) RGGTTGTG.

Усредненные парные значения идентичности между элементами промотора и терминатора (98,2 %) между последовательностями pre-miRNA (98,9 %) были сопоставимыми. Кроме того, ключевые последовательности (seedsequence) (нуклеотиды 2–7), которые отвечают за направление микроРНК на мишени транскриптов мРНК, были в значительной степени сохранены, за исключением ранее выявленных SNP в BLV-miR-B5-3p (ref BLV FLK штамм). Впоследствии все полученные последовательности были разделены на 11 вариантов, основанных на их полиморфизмах в генах и промоторах pre-miRNA-B, и были названы от miRNA_A до miRNA_K. Характеристики SNP для каждого варианта микроРНК приведены в таблице 2. Филогенетический анализ показал, что варианты miRNA_B–F и miRNA_H–K относятся к генотипу 4, а остальные варианты, miRNA_A, G, относятся к генотипу 7.

Таблица 2

Вариации микроРНК, полученных из изолятов BLV крупного рогатого скота
Variations in microRNAs derived from bovine BLV isolates

Наименование вариации	Позиция (сайт)	Аминокислотные замены	микроРНК	N	Генотип
1	2	3	4	5	6
микроРНК_A	84, 171, 195, 210, 212	A → G, A → G, G → A, G → A, T → A	_Q	9	7
	310	A → del	BLV-mir-B4-5p		
	342	G → A	B4 pre-miRNA, putative A-box		
	357	A → G	BLV-mir-B4-3p		
	373, 392, 453	G → A, G → A, C → T	-		
	462	A → G	BLV-mir-B4-5p		
	497–498	GA → AG	BLV-mir-B4-3p		
микроРНК_B	168	T → del ^{14/15}	-	15	4
микроРНК_C	106	G → A ^{4/5}	-	5	4
	154	A → G	BLV-mir-B4-3p		
микроРНК_D	249	C → G	BLV-mir-B3-5p, putative A-box	4	4
микроРНК_E	141	G → A	B2 pre-miRNA	1	4
	168	T → del	-		

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5	6
микроРНК_F	141	G → A	B2 pre-miRNA	1	4
	168	T → del	-		
	171	A → G	putative A-box		
	91, 300	A → G, A → G	-		
микроРНК_G	64, 67, 84, 171, 195, 210, 212	G → A, A → T, A → G, A → G, G → A, G → A, T → A	-	1	4
	310	A → del	BLV-mir-B4-5p		
	341	C → T	putative A-box		
	342	G → A	B4 pre-miRNA, putative A-box		
	357	A → G	BLV-mir-B4-3p		
	373, 392, 453	G → A, G → A, C → T	-		
	462	A → G	BLV-mir-B4-5p		
	497-498	GA → AG	BLV-mir-B4-5p		
микроРНК_H	97, 168	A → G, T → del	-	1	4
	420	A → G	putative B-box		
микроРНК_I	168	T → del	-	1	4
	420	A → G	putative B-box BLV-mir-B5-5p,		
	467	A → G	putative B-box		
микроРНК_J	107	A → G	-		4
	239	C → T	BLV-mir-B3-5p BLV-mir-B3-5p,		
	249	C → G	putative A-box		
микроРНК_K	181	G → A	putative B-box BLV-mir-B3-5p,	1	4
	249	C → G	putative A-box		

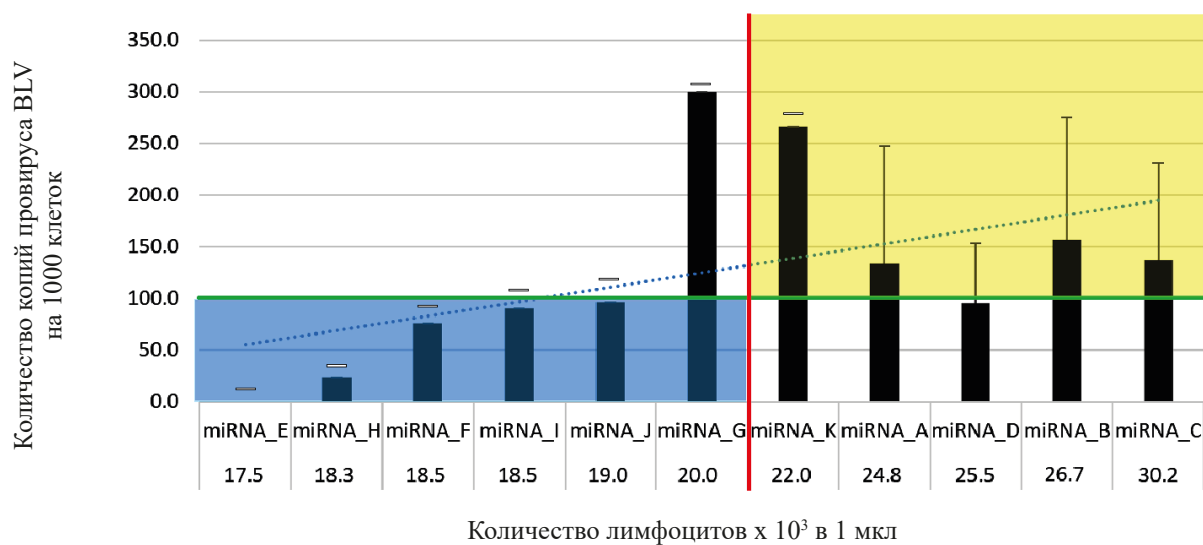


Рис. 2. Корреляция между провирусной нагрузкой провируса BLV и абсолютным содержанием лимфоцитов в 1 мкл, между группами с разными вариациями микроРНК

Fig. 2. Correlation between BLV proviral load and absolute lymphocyte count in 1 µL, between groups with different microRNA variations

Была установлена взаимосвязь между группами животных разных вариаций МикроРНК и LTR у инфицированных животных с разным уровнем персистирующего лимфоцитоза (ПЛ). Была выявлена статистически значимая взаимосвязь между полиморфизмом A(+187)C в области последовательности активатора (DAS) в LTR ($p = 0,00737$) и высоким уровнем лимфоцитоза. Результаты исследования показали, что мутация (-4)G в сайте CAP встречалась у 70 % изолятов с низким уровнем ПЛ и не была выявлена в группе с высоким ПЛ. Что может быть использовано в прикладных исследованиях с целью CRISPR/Cas-селекции. И наоборот, мутации G(-133)A/C в CRE2 (46,7 %), C(+160)T в DAS (30 %) и A(310)del в BLV-mir-B4-5p, A(357)G в BLV-mir-B4-3p, A(462)G в BLV-mir-B5-5p и GA(497-498)AG в BLV-mir-B5-3p (26,5 %) часто наблюдались у изолятов с высоким уровнем ПЛ и не были выявлены в группе с низким уровнем ПЛ. Таким образом, было выявлено несколько полиморфизмов в геномных последовательностях BLV изолятов, которые открывают понимание механизмов реализации вирулентных свойств вируса лейкоза крупного рогатого скота. При этом между изолятами, относящимися к разным генотипам, статистически значимых различий в уровне лимфоцитоза не было установлено.

Из проведенных исследований следует ряд выводов.

Установлена статистически значимая взаимосвязь между полиморфизмом A(+187)C в области последовательности активатора (DAS) в LTR ($p = 0,00737$) и высоким уровнем лимфоцитоза.

Выявлено, что мутация (-4)G в сайте CAP встречалась у 70 % изолятов с низким уровнем лимфоцитоза и не была выявлена в группе с высоким.

Установлено, мутации G(-133)A/C в CRE2 (46,7 %), C(+160)T в DAS (30 %) и A(310)del в BLV-mir-B4-5p, A(357)G в BLV-mir-B4-3p, A(462)G в BLV-mir-B5-5p и GA(497-498)AG в BLV-mir-B5-3p (26,5 %) часто наблюдались у изолятов с высоким уровнем лимфоцитоза и не были выявлены в группе с низким.

Было выявлено несколько полиморфизмов в геномных последовательностях BLV изолятов, которые открывают понимание механизмов реализации вирулентных свойств вируса лейкоза крупного рогатого скота.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Обзор эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в субъектах Российской Федерации за 2008 год / М.И. Гулюкин, И.И. Барабанов, А.В. Шишкин [и др.] // Информ.-аналит. бюл. – М.: ВИЭВ, 2009. – 29 с.
2. Джупина С.И. Эпизоотический процесс лейкоза КРС и перспективы девакации возбудителя этой инфекции // Ветеринарная патология. – 2014. – № 1. – С. 98–103.
3. Влияние экологических факторов на организм животных / И.М. Донник, И.А. Шкуратова, А.Д. Шушарин [и др.] // Ветеринария. – 2007. – № 6. – С. 38–42.
4. Донник И.М., Петропавловский М.В. Региональная молекулярно-генетическая структура вируса лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринария Кубани. – 2010. – № 3. – С. 12–13.
5. Донченко А.С., Димов С.К., Юшков Ю.Г. Эпизоотическая диагностика – научно-методическая основа контроля эпизоотических процессов: метод. рекомендации. – Новосибирск, 2010. – С. 31–33.
6. Дробот Е.В. Результаты изучения генотипического разнообразия вируса лейкоза крупного рогатого скота и особенности эпизоотологического и гематологического проявления: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2007. – 18 с.
7. Смирнов П.Н., Батенёва Н.В., Белявская В.А. Генотипическое разнообразие вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории Новосибирской области и Краснодарского края // Вестник (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2011. – № 2 (18). – С. 81–83.
8. Смирнов П.Н. Болезнь века – лейкоз крупного рогатого скота / П.Н. Смирнов. – Новосибирск: [б. и.], 2007. – 297 с.

9. Чичина С.В. Роль аллельной вариабельности генов цитокинов в формировании резистентности крупного рогатого скота к лейкозу: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2005. – 24 с.
10. Use of synthetic peptides to map sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukemia virus external glycoprotein / I. Callebaut, A. Burny, V. Krechnák [et al.] // *Virology*. – 1991. – Vol. 185, No. 1. – DOI: 10.1016/0042-6822(91)90752-W.
11. Peripheral blood B-cell death compensates for excessive proliferation in lymphoid tissues and maintains homeostasis in bovine leukemia virus-infected sheep / C. Debaq, N. Gillet, B. Asquith [et al.] // *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80. – P. 9710–9719. – DOI: 10.1128/JVI.01022-06.
12. The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain / S. Dube, L. Abbott, D.K. Dube [et al.] // *J. Virol.* – 2009. – Vol. 6. – P. 120. – DOI: 10.1186/1743-422X-6-120.
13. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle / H. Fechner, P. Blankenstein, A.C. Looman [et al.] // *Virology*. – 1997. – Vol. 237. – P. 261–269.
14. Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates / A.J. Lee, E.J. Kim, H.K. Joung [et al.] // *J. Virol.* – 2015. – Vol. 12. – article 64. – DOI: 10.1186/s12985-015-0286-4.
15. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle / E. Lee, E.J. Kim, J. Ratthanophart [et al.] // *Infect Genet Evol.* – 2016. – Vol. 41. – P. 245–254. – DOI: 10.1016/j.meegid.2016.04.010.
16. Lewin H.A. Host genetic mechanism of resistance and susceptibility to a bovine retroviral infection // *Anim. Biotech.* – 1994. – Vol. 5. – P. 183–191.
17. The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny / M. Rola-Luszczak, A. Pluta, M. Olech [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, No. 3. – e58705. – DOI: 10.1371/journal.pone.0058705.
18. Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral micrnas in b-cell leukemia/lymphoma / N. Rosewick, M. Momont, K. Durkin [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2013. – Vol. 110. – P. 2306–2311. – DOI: 10.1073/pnas.1213842110.
19. Willems L. Bovine leukemia virus as a model for studying human leukemias // *Bull Mem Acad R Med Belg.* – 2004. – Vol. 159. – P. 473–478.
20. Bovine leukemia virus, an animal model for the study of intrastrain variability / L. Willems, E. Thienpont, P. Kerkhofs [et al.] // *J. Virol.* – 1993. – Vol. 67. – P. 1086–1089.

REFERENCES

1. Gulyukin M.I., Barabanov I.I., Shishkin A.V. [i dr.], *Inform.-analit. byul.*, Moscow: VIE`V, 2009, 29 p.
2. Dzhupina S.I. *Veterinarnaya patologiya*, 2014, No. 1, pp. 98–103. (In Russ.)
3. Donnik I.M., Shkuratova I.A., Shusharin A.D. [i dr.], *Veterinariya*, 2007, No. 6, pp. 38–42. (In Russ.)
4. Donnik I.M., Petropavlovskij M.V., *Veterinariya Kubani*, 2010, No. 3, pp. 12–13. (In Russ.)
5. Donchenko A.S., Dimov S.K., Yushkov Yu.G. *E`pizooticheskaya diagnostika – nauchno-metodicheskaya osnova kontrolya e`pizooticheskix processov* (Epizootic diagnostics - scientific and methodological basis for control of epizootic processes), Novosibirsk, 2010, pp. 31–33.
6. Drobot E.V. *Rezultaty izucheniya genotipicheskogo raznoobraziya virusa lejkoza krupnogo rogatogo skota i osobennosti e`pizootologicheskogo i gematologicheskogo proyavleniya* (Results of the study of genotypic diversity of bovine leukosis virus and peculiarities of epizootologic and hematologic manifestation), Extended abstract oft candidate`s thesis Biological Sciences, Novosibirsk, 2007, 18 p. (In Russ.)
7. Smirnov P.N., Batenyova N.V., Belyavskaya V.A., *Vestnik NGAU*, 2011, No. 2 (18), pp. 81–83. (In Russ.)
8. Smirnov P.N. *Bolezn` veka – lejkoz krupnogo rogatogo skota* (Disease of the century - bovine leukemia), Novosibirsk, 2007, 297 p.
9. Chichina S.V. *Rol` allel`noj variabel`nosti genov citokinov v formirovanii rezistentnosti krupnogo rogatogo skota k lejkozu* (Role of allelic variability of cytokine genes in the formation of resistance of cattle to leukosis), Extended abstract oft candidate`s thesis Biological Sciences, Novosibirsk, 2005, 24 p. (In Russ.)

10. Callebaut I., Burny A., Krchnák V. [et al.], Use of synthetic peptides to map sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukemia virus external glycoprotein, *Virology*, 1991, Vol. 185, No. 1, DOI: 10.1016/0042-6822(91)90752-W.
11. Debacq C., Gillet N., Asquith B. [et al.], Peripheral blood B-cell death compensates for excessive proliferation in lymphoid tissues and maintains homeostasis in bovine leukemia virus-infected sheep, *J. Virol*, 2006, Vol. 80, P. 9710–9719, DOI: 10.1128/JVI.01022-06.
12. Dube S., Abbott L., Dube D.K. [et al.], The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain, *J. Virol*, 2009, Vol. 6, P. 120, DOI: 10.1186/1743-422X-6-120.
13. Fechner H., Blankenstein P., Looman A.C. [et al.], Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle, *Virology*, 1997, Vol. 237, P. 261–269.
14. Lee A.J., Kim E.J., Joung H.K. [et al.], Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates, *J. Virol*, 2015, Vol. 12, art. 64, DOI: 10.1186/s12985-015-0286-4.
15. Lee E., Kim E.J., Ratthanophart J. [et al.], Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle, *Infect Genet Evol*, 2016, Vol. 41, P. 245–254, DOI: 10.1016/j.meegid.2016.04.010.
16. Lewin H.A. Host genetic mechanism of resistance and susceptibility to a bovine retroviral infection, *Anim. Biotech*, 1994, Vol. 5, P. 183–191.
17. Rola-Luszczak M., Pluta A., Olech M. [et al.], The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny, *PLoS One*, 2013, Vol. 8, No. 3, e58705, DOI: 10.1371/journal.pone.0058705.
18. Rosewick N., Momont M., Durkin K. [et al.], Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral micrnas in b-cell leukemia/lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, Vol. 110, P. 2306–2311, DOI: 10.1073/pnas.1213842110.
19. Willems L. Bovine leukemia virus as a model for studying human leukemias, *Bull Mem Acad R Med Belg*, 2004, Vol. 159, P. 473–478.
20. Willems L., Thienpont E., Kerkhofs P. [et al.], Bovine leukemia virus, an animal model for the study of intrastrain variability, *J. Virol*, 1993, Vol. 67, P. 1086–1089.