

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 guzowatą 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.

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.