

## Ассоциация однонуклеотидного полиморфизма rs110861313 в межгенном районе хромосомы 23 с развитием лейкоза у крупного рогатого скота черно-пестрой породы

Р.Б. Айтназаров<sup>1, 2</sup>, Е.В. Игнатьева<sup>1, 2</sup>, Т.А. Агаркова<sup>3</sup>, Н.Г. Двоглазов<sup>3</sup>, Н.А. Осипова<sup>3</sup>, В.В. Храмцов<sup>3</sup>, Н.С. Юдин<sup>1, 2</sup> 

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

 e-mail: yudin@bionet.nsc.ru

Недавно с помощью полногеномного анализа ассоциаций было идентифицировано несколько однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), связанных с чувствительностью крупного рогатого скота (КРС) к лейкозу. Однако все эти исследования были выполнены на животных голштинской породы и их гибридах. В связи с этим актуальна проверка информативности выявленных ранее генетических маркеров для российских пород КРС. Целью исследования была проверка ассоциации ОНП rs110861313 в межгенном участке хромосомы 23 с лейкозом у черно-пестрой породы КРС. При гематологическом исследовании крови животных, в сыворотке крови которых серологическими методами обнаружены специфические антитела к вирусу лейкоза КРС, были сформированы три группы: здоровые животные ( $n = 115$ ), бессимптомные вирусоносители ( $n = 145$ ) и больные лейкозом животные с персистентным лимфоцитозом ( $n = 107$ ). Генотипирование ОНП rs110861313 проводили с использованием полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Выявлено достоверное снижение частоты генотипа A/A (11.2 %) у животных с персистентным лимфоцитозом по сравнению с вирусоносителями (27.6 %) ( $p < 0.002$ ). Частота животных с генотипом C/C у животных с персистентным лимфоцитозом (41.1 %) была достоверно выше, чем у вирусоносителей (21.4 %) ( $p < 0.001$ ). При этом бессимптомных вирусоносителей можно считать более адекватным контролем, чем здоровых, но не контактировавших с вирусом животных. По данным биоинформатического анализа, устойчивость к инфекции вирусом лейкоза КРС может быть связана с наличием в районе ОНП rs110861313 сайта связывания транскрипционного фактора FOXM1, который экспрессируется в клетках иммунной системы и потенциально может влиять на экспрессию ближайших генов (*LY6G5B*, *GPANK1*, *ABHD16A*, *LY6G6F*, *LY6G6E*, *CSNK2B*, *ApoM*). Таким образом, нами установлено, что ОНП rs110861313 в межгенном участке хромосомы 23 ассоциирован с развитием лейкоза при инфицировании вирусом лейкоза у животных черно-пестрой породы КРС.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; черно-пестрая порода; лейкоз; вирусоноситель; персистентный лимфоцитоз; однонуклеотидный полиморфизм; rs110861313; ассоциация.

**Для цитирования:** Айтназаров Р.Б., Игнатьева Е.В., Агаркова Т.А., Двоглазов Н.Г., Осипова Н.А., Храмцов В.В., Юдин Н.С. Ассоциация однонуклеотидного полиморфизма rs110861313 в межгенном районе хромосомы 23 с развитием лейкоза у крупного рогатого скота черно-пестрой породы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(8):999-1005. DOI 10.18699/VJ19.576


## Single nucleotide polymorphism rs110861313 in the intergenic region of chromosome 23 is associated with the development of leukosis in the Russian Black Pied cattle

R.B. Aitnazarov<sup>1, 2</sup>, E.V. Ignatieva<sup>1, 2</sup>, T.A. Agarkova<sup>3</sup>, N.G. Dvoeglazov<sup>3</sup>, N.A. Osipova<sup>3</sup>, V.V. Khramtsov<sup>3</sup>, N.S. Yudin<sup>1, 2</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Siberian Federal Research Center for AgroBioTechnologies, RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

 e-mail: yudin@bionet.nsc.ru

In recent years, using a genome-wide association study (GWAS), a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been suggested to be associated with susceptibility to leukemia in cattle. However, all studies have been done with purebred Holstein cows and their hybrids. In this regard, it is important to confirm the functional role of polymorphisms previously identified in a GWAS study in Russian cattle breeds. The aim of this study was to verify the association between rs110861313 in the intergenic region of bovine chromosome 23 and leukemia in the Russian Black Pied cattle. Based on the levels of bovine leukemia virus (BLV)-specific antibodies detected in serum using serodiagnostic techniques, animals were divided into three groups: healthy animals ( $n = 115$ ), asymptomatic virus carriers ( $n = 145$ ) and animals with leukemia ( $n = 107$ ). Genotyping of rs110861313 was carried out using polymerase chain reaction followed by analysis of restriction fragment length polymorphisms. A significant decrease in the frequency of the A/A geno-

type (11.2 %) was revealed in animals with persistent lymphocytosis compared to virus carriers (27.6 %) ( $p < 0.002$ ). At the same time, the frequency of animals with the C/C genotype in animals with persistent lymphocytosis (41.1 %) was significantly higher than that of virus carriers (21.4 %) ( $p < 0.001$ ). In this case, asymptomatic virus carriers can be considered a more suitable control than healthy animals that have not been in contact with the virus. According to bioinformatics analysis, resistance to BLV can be due to the presence of the transcription factor FOXM1 binding site in the region of rs110861313. FOXM1 is expressed in immune cells and can potentially affect the expression of the neighboring genes (*LY6G5B*, *GPANK1*, *ABHD16A*, *LY6G6F*, *LY6G6E*, *CSNK2B*, *ApoM*). Thus, we found that SNP rs110861313 in the intergenic region of bovine chromosome 23 is associated with the development of leukemia following BLV infection in the Russian Black Pied cattle.

Key words: cattle; Russian Black Pied cattle; bovine leucosis; virus carrier; persistent lymphocytosis; single nucleotide polymorphism; rs110861313; association.

**For citation:** Aitnazarov R.B., Ignatieva E.V., Agarkova T.A., Dvoeglazov N.G., Osipova N.A., Khramtsov V.V., Yudin N.S. Single nucleotide polymorphism rs110861313 in the intergenic region of chromosome 23 is associated with the development of leukosis in the Russian Black Pied cattle. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(8):999-1005. DOI 10.18699/VJ19.576 (in Russian)

## Введение

Лейкоз крупного рогатого скота (КРС) – хроническая инфекционная болезнь, связанная со злокачественным разрастанием клеток кроветворных органов, в результате чего образуются отдельные опухолевые массы или диффузная инфильтрация различных тканей и органов. Возбудитель инфекции – онкогенный В-лимфоцитотропный вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), относящийся к семейству ретровирусов (Gillet et al., 2007). Близким родственником ВЛКРС является Т-лимфотропный вирус человека типа 1 (Т lymphotropic virus type 1, HTLV-I), вызывающий у человека Т-клеточный лейкоз и Т-клеточную лимфому. Большинство инфицированных животных – бессимптомные носители вируса. Приблизительно у одной трети инфицированных животных развивается доброкачественная поликлональная пролиферация В-клеток (персистентный лимфоцитоз), а у 5–10 % – летальные лимфоидные опухоли (Fetter, 1980; Burny et al., 1988).

В России ежегодно лейкоз КРС наносит многомиллиардный ущерб молочному животноводству (Stepanova, 2016). Поскольку коэффициент наследуемости чувствительности к ВЛКРС составляет не менее 0.08, эффективной мерой профилактики этого заболевания может стать геномная селекция (Abdalla et al., 2013). Устойчивость к лейкозу связана с большим количеством генетических маркеров, многие из которых специфичны для отдельных пород КРС (Юдин и др., 2018б). В частности, недавно с помощью полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) было идентифицировано несколько однонуклеотидных полиморфных маркеров (ОМП), связанных с чувствительностью КРС к инфекции ВЛКРС (Abdalla et al., 2016; Врум et al., 2016; Carignano et al., 2018). Но все эти исследования были выполнены на КРС голштинской породы и их гибридах. Ввиду этого для российских пород КРС актуальна проверка информативности генетических маркеров, ранее идентифицированных с помощью полногеномного анализа ассоциаций.

Целью исследования была проверка ассоциации ОМП rs110861313 в межгенном участке хромосомы 23 с лейкозом у крупного рогатого скота черно-пестрой породы. Ранее по результатам полногеномного анализа этот ОМП был ассоциирован с провирусной нагрузкой ВЛКРС и количеством лейкоцитов в крови у голштинов и гибридов голштинов с джерси в Аргентине (Carignano et al., 2018).

## Материалы и методы

**Животные.** Исследовано 367 коров черно-пестрой породы в возрасте 1.5–8 лет из хозяйств Новосибирской области и Алтайского края. Для забора венозной крови брали вакуумные пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА). Диагностические процедуры проводили по общепринятой методике. Инфицированных ВЛКРС животных выявляли с применением реакции иммунодиффузии в геле агара (РИД) с помощью набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота (производства Курской биофабрики) и методом иммуноферментного анализа (ИФА), при использовании тест-набора IDEXX Leucose Serum Screening Ab Test. Идентификацию больных животных, а также дифференциальную диагностику форм и стадий заболевания осуществляли путем гематологического анализа крови животных, в сыворотке крови которых серологическими методами (РИД, ИФА) были обнаружены специфические антитела к ВЛКРС. Количество лейкоцитов подсчитывали посредством гематологического анализатора Mindray BC-288-Vet в соответствии с инструкцией по его эксплуатации. При обнаружении в пробе крови повышенного количества лейкоцитов и лимфоцитов животное считали больным лейкозом (Методические указания по диагностике лейкоза..., 2000). В результате животных разделили на три группы: здоровые ( $n = 115$ ), бессимптомные вирусоносители ( $n = 145$ ) и больные лейкозом ( $n = 107$ ). Протокол экспериментов был одобрен комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

**Генотипирование однонуклеотидного полиморфизма rs110861313.** Геномную ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом протеолитической обработки с последующей экстракцией фенолом (Sambrook, Russell, 2006). Генотипирование аллельных вариантов ОМП rs110861313 в межгенном участке хромосомы 23 проводили с помощью полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Дизайн праймеров и подбор условий ПЦР осуществляли с использованием программы Vector NT версии 11.5.1. Нуклеотидные последовательности генома коровы (сборка Bos\_taurus\_UMD\_3.1.1/bosTau8) получали из геномного браузера UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>). Эндонуклеазу рестрикции для генотипирования ОМП подбирали с помощью программы dCAPS (Neff et al., 2002).

Для проведения ПЦР применяли прямой 5'-ТАСАА АААСССАТСТААААГГГТГС-3' и обратный 5'-ААГ ААГСАССАГГАСААГСА-3' (подчеркнута замена относительно референсной последовательности коровы) праймеры. Фрагмент 145 п. н. амплифицировали в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1х SE-буфер и 5 ед. активности Taq ДНК-полимеразы («СибЭнзим», Россия), 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 100 мкМ каждого dNTP, по 0.2 мкМ каждого праймера и 0.1–0.5 мкг ДНК. Режим амплификации: 35 циклов (95 °С – 30 с, 62 °С – 30 с, 72 °С – 30 с) с предварительной денатурацией при 95 °С – 3 мин. Продукт амплификации подвергали рестрикции ферментом AccB1 I («СибЭнзим», Россия) при условиях, рекомендуемых производителем. Ампликон размером 351 п. н. либо оставался неразрезанным (генотип АА), либо его разрезали на фрагменты 326 и 25 п. н. (генотип СС) или 351, 326 и 25 п. н. (генотип АС). Электрофоретический анализ продуктов рестрикции проводили в 4 % полиакриламидном геле с окрашиванием бромистым этидием.

#### Статистический и биоинформатический анализы.

Проверку отклонения распределения генотипов от равновесия Харди–Вайнберга выполняли с использованием программы Hardy–Weinberg equilibrium calculator (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). Сравнение частот генотипов и аллелей проводили с помощью критерия  $\chi^2$  для таблицы сопряженности 2 × 2. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимали равным 0.05. Результаты обрабатывали с помощью пакета Statistica версии 8.0.

Для оценки возможного функционального эффекта нуклеотидной замены в районе межгенного ОНП rs110861313 на потенциальные сайты связывания транскрипционных факторов использовали ресурс PERFECTOS-APR (<http://opera.autosome.ru/perfectosapr>). Анализ проводили с применением данных о позиционных весовых матрицах сайтов связывания транскрипционных факторов человека из базы HOСOMOCO (Kulakovskiy et al., 2018). Районы ДНК размером 25 п. н., фланкирующие ОНП rs110861313 с 5'- и 3'-концов, получали из сборки генома коровы *Bos taurus*\_UMD\_3.1.1/bosTau8 с помощью геномного браузера UCSC. Пороговое значение  $p$ -value, оценивающее достоверность сходства участка ДНК с весовой матрицей сайта, принимали равным  $5 \cdot 10^{-4}$ . Считали, что ОНП достоверно нарушает сайт связывания транскрипционного фактора, если отношение значений  $p$ -value для референсного и альтернативного аллелей было не менее 4. Официальные символы генов, кодирующих транскрипционные факторы (ТФ), соответствующие обнаруженным таким образом сайтам, идентифицировали по базе EntrezGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Поскольку информация по виду *Bos taurus* весьма ограниченная, в запросах к базам был выбран вид *Homo sapiens*. Данные о тканеспецифическом характере экспрессии генов получали из базы данных GeneCards (<http://www.genecards.org/>).

#### Результаты

Частоты генотипов и аллелей ОНП rs110861313 у больных лейкозом, здоровых животных и вирусоносителей приведены в табл. 1. Распределение частот генотипов во всех изученных выборках соответствовало равновесию

**Table 1.** Frequencies of genotypes and alleles of SNP rs110861313 in animals of the Black-Pied cattle breed with leukemia and in groups of healthy animals and asymptomatic virus carriers

Geno- type or allele	Genotype (allele) frequency, % (number) <sup>a</sup>			$p^c$
	(1) Healthy animals, (n = 115) <sup>b</sup>	(2) Virus carriers, (n = 145) <sup>b</sup>	(3) Animals with leukemia (n = 107) <sup>b</sup>	
A/A	17.4 (20)	27.6 (40) <sup>d</sup>	11.2 (12) <sup>e</sup>	$p_{1,2} = 0.053$ $p_{1,3} = 0.191$ $p_{2,3} = 0.002$
A/C	45.2 (52)	51.0 (74)	47.7 (51)	$p_{1,2} = 0.351$ $p_{1,3} = 0.715$ $p_{2,3} = 0.597$
C/C	37.4 (43)	21.4 (31) <sup>d</sup>	41.1 (44) <sup>e</sup>	$p_{1,2} = 0.005$ $p_{1,3} = 0.569$ $p_{2,3} = 0.001$
A	40.0 (92)	53.1 (154) <sup>d</sup>	35.0 (75) <sup>e</sup>	$p_{1,2} = 0.003$ $p_{1,3} = 0.282$ $p_{2,3} = 0.0001$
C	60.0 (138)	46.9 (136) <sup>d</sup>	65.0 (139) <sup>e</sup>	$p_{1,2} = 0.003$ $p_{1,3} = 0.282$ $p_{2,3} = 0.0001$
$p_{HW}^d$	$\chi^2 = 0.39,$ $p = 0.5$	$\chi^2 = 0.09,$ $p = 0.8$	$\chi^2 = 0.24,$ $p = 0.6$	

<sup>a</sup> Number of animals with a given genotype or chromosomes with a given allele; <sup>b</sup> number of animals; <sup>c</sup>  $p$ -values calculated for comparisons among groups of (1) healthy animals, (2) virus carriers, and (3) animals with leukemia; <sup>d</sup> conformity of the genotype and allele frequency distributions to the Hardy–Weinberg equilibrium assessed by the  $\chi^2$  test.

Харди–Вайнберга. Обнаружено статистически значимое повышение частоты животных с генотипом А/А по ОНП rs110861313 у вирусоносителей (27.6 %) по сравнению со здоровыми (17.4 %) ( $p = 0.053$ ), а также достоверное снижение частоты животных с генотипом С/С у вирусоносителей (21.4 %) по сравнению со здоровыми (37.4 %) ( $p = 0.005$ ). Соответственно, у вирусоносителей была существенно повышена частота аллеля А (53.1 %) и снижена частота аллеля С (46.9 %) по сравнению со здоровыми животными (40.0 и 60.0 % соответственно) ( $p < 0.01$ ).

Выявлено достоверное снижение частоты генотипа А/А по ОНП rs110861313 у животных с персистентным лимфоцитозом (11.2 %) по сравнению с вирусоносителями (27.6 %) ( $p < 0.01$ ). При этом частота особей с генотипом С/С у животных с персистентным лимфоцитозом (41.1 %) была достоверно выше, чем у вирусоносителей (21.4 %) ( $p < 0.001$ ). В результате у животных с персистентным лимфоцитозом была существенно снижена частота аллеля А (35.0 %) и увеличена частота аллеля С (65.0 %) по сравнению с вирусоносителями (53.1 и 46.9 % соответственно) ( $p = 0.003$ ). Не найдено статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей ОНП rs110861313 между группами больных и здоровых животных.

С применением программы PERFECTOS-APR проведен поиск потенциальных сайтов связывания транскрип-

**Table 2.** Characterization of transcription factors expressed in the immune system cells whose putative binding sites were closely similar\* to the weight matrix for allele A (rs110861313), associated with leukemia

Designation of the predicted TFBS	Agreed designation of the TF-encoding gene	Agreed name of the TF-encoding gene	Site sequence for allele A/DNA strand	Ratio of <i>p</i> -values for the reference and alternative alleles	Expression in the immune system**
TBR1	<i>TBR1</i>	T-box, brain 1	aaaagtgtgcAaa/+	5.03	Bone marrow, leukocytes, lymph gland, thymus
FOXM1	<i>FOXM1</i>	Forkhead box M1	tggtTgcacact/-	11.5	Bone marrow, leukocytes, lymph gland, thymus
FOXG1	<i>FOXG1</i>	Forkhead box G1	gttggtTgcacactttt/-	5.22	Bone marrow, lymph gland, thymus
FOXD3	<i>FOXD3</i>	Forkhead box D3	gttggtTgcacact/-	9.11	Bone marrow, lymph gland, thymus
ZSCA4	<i>ZSCAN4</i>	Zinc finger and SCAN domain containing 4	aaagtgtgcAaa/+	6.39	Bone marrow, lymph gland, thymus
MTF1	<i>MTF1</i>	Metal regulatory transcription factor 1	ctaaaagtgtgcAaaca/+	12.8	Bone marrow, leukocytes, lymph gland, thymus

\* The similarity was assessed from *p*-values with PERFECTOS-APE software.

\*\* According to the GeneCards database.

ционных факторов (ССТФ), сходство которых с весовой матрицей могло измениться в результате нуклеотидной замены в районе rs110861313. Благодаря программе было выявлено шесть ССТФ, сходство которых с весовой матрицей оценивалось значением  $p$ -value  $< 5 \cdot 10^{-4}$  и было выше для альтернативного аллеля А, связанного с устойчивостью к лейкозу. Оказалось, что все шесть сайтов соответствовали транскрипционным факторам, экспрессирующимся в клетках иммунной системы (TBR1, FOXM1, FOXG1, ZSCA4, FOXD3, MTF1) (табл. 2).

## Обсуждение

С помощью метода ПЦР-ПДРФ была исследована частота генотипов и аллелей ОНП rs110861313 в межгенном участке хромосомы 23 в выборках здоровых и больных лейкозом животных, а также бессимптомных вирусоносителей черно-пестрой породы крупного рогатого скота. Наблюдаемое распределение генотипов ОНП rs110861313 существенно не отличалось от ожидаемого по распределению Харди–Вайнберга (см. табл. 1). Хотя популяции сельскохозяйственных животных и человека не отвечают условиям действия закона Харди–Вайнберга (популяция бесконечно большого размера, в которой не действует естественный отбор, не идет мутационный процесс, отсутствует обмен особями с другими популяциями, не происходит дрейф генов, все скрещивания случайны), этот факт косвенно может свидетельствовать об отсутствии ошибок генотипирования в нашем исследовании (Hosking et al., 2004).

В литературе неоднократно обсуждался вопрос об адекватном контроле при поиске генетических вариантов, ассоциированных с развитием инфекционных заболеваний (Loeb, 2013; Юдин и др., 2018a). Популяционную выборку здоровых животных нельзя считать оптимальным контролем, поскольку она состоит из животных как с

устойчивым, так и чувствительным генотипами, которые просто не успели контактировать с инфекционным агентом. Поэтому считается, что контрольную группу целесообразно формировать из животных с клинически доказанным событием инфицирования, у которых заболевание протекало в бессимптомной форме. В нашем случае это животные-вирусоносители.

Нами обнаружено достоверное снижение частоты генотипа А/А по ОНП rs110861313 у больных лейкозом животных по сравнению с вирусоносителями (см. табл. 1). Частота животных с генотипом С/С, наоборот, у больных животных была достоверно выше, чем у вирусоносителей. При этом у больных животных была существенно снижена частота аллеля А и увеличена частота аллеля С по сравнению с вирусоносителями. Эти результаты хорошо соответствуют данным Н.А. Carignano с коллегами (2018), которые с помощью полногеномного анализа ассоциаций показали ассоциацию аллеля С ОНП rs110861313 с величиной провирусной нагрузки и числом лейкоцитов у животных, инфицированных ВЛКРС.

ОНП rs110861313 локализован в межгенном участке хромосомы 23 крупного рогатого скота. На расстоянии 30 тыс. п. н. от него находятся девять генов (табл. 3). Из них пять генов – *LY6G5B*, *GPANK1*, *ABHD16A*, *LY6G6F*, *LY6G6E* – кодируют белки иммунной системы. Ген *CSNK2B* кодирует бета-субъединицу киназы 2 (СК2) – высококонсервативной полифункциональной серин/треониновой протеинкиназы, экспрессирующейся во всех тканях. Повышение уровня и активности СК2 характерно для опухолевых клеток. Для онкогенеза особенно важны антиапоптотические функции СК2: эта протеинкиназа способствует репарации ДНК, влияет на сигнальные каскады NF- $\kappa$ B, Wnt, PI3K/Akt и JAK-STAT, взаимодействует с шаперонами, активирует антиапоптотические и инактивирует проапоптотические белки, в том



**Table 3.** Functional characterization of genes located within 30 kb from SNP rs110861313 in the intergenic region of bovine chromosome

The agreed symbol of the gene	The agreed name of the gene	Distance from SNP rs110861313 in bp/gene region	Function
<i>LY6G5B</i>	Lymphocyte antigen 6 family member G5B	899/3' region	The ortholog of this protein in humans is involved in the immune response and cell recognition
<i>CSNK2B</i>	Casein kinase 2 beta	3447/3' region	The housekeeping gene encodes the beta subunit of casein kinase II, a ubiquitous protein kinase that regulates metabolic pathways, signal transduction, transcription, translation, and replication
<i>GPANK1</i>	G-patch domain and ankyrin repeats 1	7753/5' region	The ortholog of this gene in humans is located in the major histocompatibility complex III region. It encodes a protein involved in immune responses
<i>ABHD16A</i>	Abhydrolase domain containing 16A	8346/3' region	»
<i>C23H6orf47</i>	Chromosome 23 C6orf47 homolog	13442/5' region	Function unknown
<i>APOM</i>	Apolipoprotein M	15211/3' region	The protein encoded by this gene is an apolipoprotein and a member of the lipocalin family. It is linked to high-density lipoprotein and, to a lesser extent, to low-density lipoproteins and triglyceride-rich lipoproteins
<i>BAG6</i>	BAG cochaperone 6	19374/5' region	The ortholog of this gene in humans is located in the major histocompatibility complex III region. It encodes a nuclear protein that is cleaved by caspase 3 and is implicated in the control of apoptosis
<i>LY6G6F</i>	Lymphocyte antigen 6 family member G6F	23454/5' region	The ortholog of this protein in humans is involved in the immune response and cell recognition
<i>LY6G6E</i>	Lymphocyte antigen 6 family member G6E	27718/3' region	»

числе каспазы (Володина, Штиль, 2012). Аполипопротеин М (АроМ) – переносчик липидного медиатора сфингозин-1-фосфата (S1P). Сигнальные пути, включающие сфингозинкиназы (SphKs) и рецепторы S1P (S1PR), играют важную роль в онкогенезе множественных опухолей, включая немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). Показано, что сверхэкспрессия АроМ может стимулировать пролиферацию и инвазию клеток NSCLC *in vitro* и рост опухоли *in vivo*, вероятно, через активацию S1PR1 и сигнальных путей ERK1/2 и PI3K/AKT (Zhu et al., 2018).

В литературе нами не встречено упоминания о каком-либо из вышеперечисленных генов в связи с инфекцией ВЛКРС. Тем не менее у людей, больных Т-клеточным лейкозом взрослых (Adult T cell leukemia/lymphoma) и инфицированных вирусом HTLV-I, была обнаружена повышенная частота соматических мутаций в гене *CSNK2B* (Kataoka et al., 2015). Интересно, что мутации в этом гене у человека ассоциированы с развитием шизофрении (Yang et al., 2018; Niu et al., 2019), судорожных припадков (Nakashima et al., 2019) и эпилепсии (Poigier et al., 2017; Sakaguchi et al., 2017). В связи с этим представляется перспективным исследовать изменение поведения животных после инфицирования ВЛКРС.

С помощью биоинформатического анализа нами установлено, что замена нуклеотида С→А rs110861313 может быть связана с образованием сайтов связывания транскрипционных факторов TBR1, FOXM1, FOXG1, ZSCAN4, FOXD3, и MTF1 (см. табл. 2). Все эти транскрипционные

факторы экспрессируются в клетках иммунной системы. Наибольший интерес представляет фактор FOXM1, служащий активатором транскрипции (Wang et al., 2008). Известно, что этот фактор регулирует экспрессию генов клеточного цикла, важных для репликации ДНК и митоза, контролирует пролиферацию клеток и репарацию ДНК (Nandi et al., 2018). Так, FOXM1 опосредует пролиферацию, выживание, миграцию/инвазию, прогрессию и онкогенез клеток «трижды негативного» рака молочной железы (Namurcu et al., 2016). Этот же белок посредством регуляции экспрессии экзонуклеазы I может модулировать чувствительность клеток рака яичников к химиотерапии дисплатином (Zhou et al., 2014). Уровень экспрессии FOXM1 коррелирует с прогнозом при раке желудка (Li et al., 2018) и почки (Liang et al., 2018). Наконец, мета-анализ паттернов экспрессии 18000 образцов опухолей человека, относившихся к 39 типам злокачественных новообразований, идентифицировал регуляторную сеть FOXM1 как основной предиктор неблагоприятного прогноза заболевания (Gentles et al., 2015).

Мы предполагаем, что у животных с генотипом А/А ОНП rs110861313 образуется сайт на ДНК, с которым может связываться транскрипционный фактор FOXM1 и, таким образом, активировать транскрипцию близлежащих генов. В конечном счете это может привести к подавлению инфекции ВЛКРС и отсутствию персистентного лимфоцитоза у вирусносителей. Однако для проверки гипотезы о наличии взаимодействия ДНК с факторами

транскрипции необходимо провести эксперименты *in vivo* и *in vitro* (Merkulova et al., 2007). Экспериментальное подтверждение связывания транскрипционных факторов с полиморфным участком ДНК, а также влияния нуклеотидной замены на интенсивность связывания будет свидетельствовать о возможном влиянии ОНП rs110861313 на экспрессию близлежащих генов и, вследствие этого, на устойчивость к лейкозу.

## Заключение

Нами установлено, что однонуклеотидный полиморфизм rs110861313 в межгенном участке хромосомы 23 ассоциирован с развитием лейкоза при инфицировании ВЛКРС у животных черно-пестрой породы крупного рогатого скота. По данным биоинформатического анализа, устойчивость к инфекции ВЛКРС может быть ассоциирована с наличием в районе ОНП rs110861313 сайта связывания транскрипционного фактора FOXM1, который потенциально может влиять на экспрессию ближайших генов. Наши результаты указывают на возможность использования этого генетического маркера для маркер-ориентированной и геномной селекции (Юдин, Воевода, 2015).

## Список литературы / References

- Володина Ю.Л., Штиль А.А. Казеинкиназа 2 – универсальный регулятор выживаемости клеток. Молекуляр. биология. 2012; 46(3):423-433.  
[Volodina Y.L., Shtil A.A. Casein kinase 2, a versatile regulator of cell survival. Mol. Biol. 2012;46(3):381-390.]
- Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота (утв. Минсельхозом РФ 23.08.2000 № 13-7-2/2130). Доступно по адресу: <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=EXP&n=371364#08727407013115032>. Проверено 18 сентября 2019 г.  
[Guidelines on the Diagnosis of Bovine Leukemia (approved by the RF Ministry of Agriculture on Aug. 23, 2000, No. 13-7-2/2130). Available from <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=EXP&n=371364#08727407013115032> (18.09.2019). (in Russian)]
- Юдин Н.С., Бархаш А.В., Максимов В.Н., Игнатиева Е.В., Ромашенко А.Г. Генетическая предрасположенность человека к заболеваниям, вызываемым флавивирусами. Молекуляр. биология. 2018a;52(2):190-209. DOI 10.7868/S0026898418020039.  
[Yudin N.S., Barkhash A.V., Maksimov V.N., Ignatieva E.V., Romaschenko A.G. Human genetic predisposition to diseases caused by viruses from flaviviridae family. Mol. Biol. 2018a;52(2):165-181. DOI 10.1134/S0026893317050223.]
- Юдин Н.С., Воевода М.И. Молекулярно-генетические маркеры экономически важных признаков у молочного скота. Генетика. 2015;51(5):600-612. DOI 10.7868/S0016675815050082.  
[Yudin N.S., Voevoda M.I. Molecular genetic markers of economically important traits in dairy cattle. Russ. J. Genet. 2015;51(5):506-517. DOI 10.1134/S1022795415050087.]
- Юдин Н.С., Подколodный Н.Л., Агаркова Т.А., Игнатиева Е.В. Приоритизация генов, ассоциированных с патогенезом лейкоза у крупного рогатого скота. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018b;22(8):1063-1069. DOI 10.18699/VJ18.451.  
[Yudin N.S., Podkolodny N.L., Agarkova T.A., Ignatieva E.V. Prioritization of genes associated with the pathogenesis of leukosis in cattle. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018b;22(8):1063-1069. DOI 10.18699/VJ18.451. (in Russian)]
- Abdalla E.A., Rosa G.J., Weigel K.A., Byrem T. Genetic analysis of leukosis incidence in United States Holstein and Jersey populations. J. Dairy Sci. 2013;96(9):6022-6029. DOI 10.3168/jds.2013-6732.
- Brym P., Bojarojć-Nosowicz B., Oleński K., Hering D.M., Ruś A., Kaczmarczyk E., Kamiński S. Genome-wide association study for host response to bovine leukemia virus in Holstein cows. Vet. Immunol. Immunopathol. 2016;175:24-35. DOI 10.1016/j.vetimm.2016.04.012.
- Burny A., Cleuter Y., Kettmann R., Mammerickx M., Marbaix G., Portetelle D., Broeke A., Willems L., Thomas R. Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. Vet. Microbiol. 1988;17:197-218.
- Carignano H.A., Roldan D.L., Beribe M.J., Raschia M.A., Amadio A., Nani J.P., Gutierrez G., Alvarez I., Trono K., Poli M.A., Miretti M.M. Genome-wide scan for common SNPs affecting bovine leukemia virus infection level in dairy cattle. BMC Genomics. 2018; 19(1):142. DOI 10.1186/s12864-018-4523-2.
- Ferrer J.F. Bovine lymphosarcoma. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 1980; 24:1-68.
- Gentles A.J., Newman A.M., Liu C.L., Bratman S.V., Feng W., Kim D., Nair V.S., Xu Y., Khuong A., Hoang C.D., Diehn M., West R.B., Plevritis S.K., Alizadeh A.A. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. Nat. Med. 2015; 21(8):938-945. DOI 10.1038/nm.3909.
- Gillet N., Florins A., Boxus M., BurtEAU C., Nigro A., Vandermeers F., Balon H., Bouzar A.B., Defoiche J., Burny A., Reichert M., Kettmann R., Willems L. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. Retrovirology. 2007;4:18.
- Hamurcu Z., Ashour A., Kahraman N., Ozpolat B. FOXM1 regulates expression of eukaryotic elongation factor 2 kinase and promotes proliferation, invasion and tumorigenesis of human triple negative breast cancer cells. Oncotarget. 2016;7(13):16619-16635. DOI 10.18632/oncotarget.7672.
- Hosking L., Lumsden S., Lewis K., Yeo A., McCarthy L., Bansal A., Riley J., Purvis I., Xu C.F. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. Eur. J. Hum. Genet. 2004;12(5): 395-399.
- Kataoka K., Nagata Y., Kitanaka A., Shiraishi Y., Shimamura T., Yasunaga J., Totoki Y., Chiba K., Sato-Otsubo A., Nagae G., Ishii R., Muto S., Kotani S., Watatani Y., Takeda J., Sanada M., Tanaka H., Suzuki H., Sato Y., Shiozawa Y., Yoshizato T., Yoshida K., Makishima H., Iwanaga M., Ma G., Nosaka K., Hishizawa M., Itonaga H., Imaizumi Y., Munakata W., Ogasawara H., Sato T., Sasai K., Muramoto K., Penova M., Kawaguchi T., Nakamura H., Hama N., Shide K., Kubuki Y., Hidaka T., Kameda T., Nakamaki T., Ishiyama K., Miyawaki S., Yoon S.S., Tobinai K., Miyazaki Y., Takaori-Kondo A., Matsuda F., Takeuchi K., Nureki O., Aburatani H., Watanabe T., Shibata T., Matsuoka M., Miyano S., Shimoda K., Ogawa S. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. Nat. Genet. 2015;47(11):1304-1315. DOI 10.1038/ng.3415.
- Kulakovskiy I.V., Vorontsov I.E., Yevshin I.S., Sharipov R.N., Fedorova A.D., Rumynskiy E.I., Medvedeva Y.A., Magana-Mora A., Bajic V.B., Papatsenko D.A., Kolpakov F.A., Makeev V.J. HOCOMOCO: towards a complete collection of transcription factor binding models for human and mouse via large-scale ChIP-Seq analysis. Nucleic Acids Res. 2018;46(D1):D252-D259. DOI 10.1093/nar/gkx1106.
- Li X., Ma K., Song S., Shen F., Kuang T., Zhu Y., Liu Z. Tight correlation between FoxM1 and FoxP3+ Tregs in gastric cancer and their clinical significance. Clin. Exp. Med. 2018;18(3):413-420. DOI 10.1007/s10238-018-0505-6.
- Liang J., Liu Z., Zou Z., Tang Y., Zhou C., Yang J., Wei X., Lu Y. The correlation between the immune and epithelial-mesenchymal transition signatures suggests potential therapeutic targets and prognosis prediction approaches in kidney cancer. Sci. Rep. 2018;8(1): 6570. DOI 10.1038/s41598-018-25002-w.
- Loeb M. Host genomics in infectious diseases. Infect. Chemother. 2013;45(3):253-259. DOI 10.3947/ic.2013.45.3.253.
- Merkulova T.I., Oshchepkov D.Y., Ignatieva E.V., Ananko E.A., Levitsky V.G., Vasiliev G.V., Klimova N.V., Merkulov V.M., Kol-

- chanov N.A. Bioinformatical and experimental approaches to investigation of transcription factor binding sites in vertebrate genes. *Biochemistry (Mosc)*. 2007;72(11):1187-1193.
- Nakashima M., Tohyama J., Nakagawa E., Watanabe Y., Siew C.G., Kwong C.S., Yamoto K., Hiraide T., Fukuda T., Kaname T., Nakabayashi K., Hata K., Ogata T., Saitu H., Matsumoto N. Identification of de novo CSNK2A1 and CSNK2B variants in cases of global developmental delay with seizures. *J. Hum. Genet.* 2019;64(4):313-322. DOI 10.1038/s10038-018-0559-z.
- Nandi D., Cheema P.S., Jaiswal N., Nag A. FoxM1: Repurposing an oncogene as a biomarker. *Semin. Cancer Biol.* 2018;52(Pt. 1):74-84. DOI 10.1016/j.semcancer.2017.08.009.
- Neff M.M., Turk E., Kalishman M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet.* 2002;18(12):613-615.
- Niu H.M., Yang P., Chen H.H., Hao R.H., Dong S.S., Yao S., Chen X.F., Yan H., Zhang Y.J., Chen Y.X., Jiang F., Yang T.L., Guo Y. Comprehensive functional annotation of susceptibility SNPs prioritized 10 genes for schizophrenia. *Transl. Psychiatry.* 2019;9(1):56. DOI 10.1038/s41398-019-0398-5.
- Poirier K., Hubert L., Viot G., Rio M., Billuart P., Besmond C., Bienvenu T. CSNK2B splice site mutations in patients cause intellectual disability with or without myoclonic epilepsy. *Hum. Mutat.* 2017;38(8):932-941. DOI 10.1002/humu.23270.
- Sakaguchi Y., Uehara T., Suzuki H., Kosaki K., Takenouchi T. Truncating mutation in CSNK2B and myoclonic epilepsy. *Hum. Mutat.* 2017;38(11):1611-1612. DOI 10.1002/humu.23307.
- Sambrook J., Russell D.W. *The Condensed Protocols from Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.
- Stepanova T.V. Analysis of the economic damage caused by bovine leukemia from 2010 to 2014 in the Russian Federation. *Russ. J. Agric. Socio-Economic Sci.* 2016;8(56):49-56. DOI 10.18551/rjoas.2016-08.08.
- Wang I.C., Chen Y.J., Hughes D.E., Ackerson T., Major M.L., Kalinichenko V.V., Costa R.H., Raychaudhuri P., Tyner A.L., Lau L.F. FoxM1 regulates transcription of JNK1 to promote the G1/S transition and tumor cell invasiveness. *J. Biol. Chem.* 2008;283(30):20770-20778. DOI 10.1074/jbc.M709892200.
- Yang C.P., Li X., Wu Y., Shen Q., Zeng Y., Xiong Q., Wei M., Chen C., Liu J., Huo Y., Li K., Xue G., Yao Y.G., Zhang C., Li M., Chen Y., Luo X.J. Comprehensive integrative analyses identify GLT8D1 and CSNK2B as schizophrenia risk genes. *Nat. Commun.* 2018;9(1):838. DOI 10.1038/s41467-018-03247-3.
- Zhou J., Wang Y., Wang Y., Yin X., He Y., Chen L., Wang W., Liu T., Di W. FOXM1 modulates cisplatin sensitivity by regulating EXO1 in ovarian cancer. *PLoS One.* 2014;9(5):e96989. DOI 10.1371/journal.pone.0096989.
- Zhu Y., Luo G., Jiang B., Yu M., Feng Y., Wang M., Xu N., Zhang X. Apolipoprotein M promotes proliferation and invasion in non-small cell lung cancers via upregulating S1PR1 and activating the ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018;501(2):520-526. DOI 10.1016/j.bbrc.2018.05.029.

---

#### ORCID ID

E.V. Ignatieva [orcid.org/0000-0002-8588-6511](https://orcid.org/0000-0002-8588-6511)  
N.S. Yudin [orcid.org/0000-0002-1947-5554](https://orcid.org/0000-0002-1947-5554)

**Acknowledgements.** This work was supported by the Integrated Program of Basic Research, SB RAS.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received October 3, 2019. Revised November 14, 2019. Accepted November 15, 2019.