

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-3-283-287>

Поступила 23.04.2023

Поступила после рецензирования 17.07.2023

Принята в печать 25.07.2023

© Фоменко О. Ю., 2023



<https://www.fsjour.com/jour>

Обзорная статья

Open access

СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕНОМА ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА: МИНИ-ОБЗОР

Фоменко О. Ю.

Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

лейкоз, Bovine

leukemia virus, геном,

провирусная ДНК,

ПЦР тест-система

Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота — это инфекционное заболевание с хроническим течением, вызываемое РНК-содержащим вирусом из рода *Deltaretrovirus*. Несмотря на внедрение различных программ по ликвидации лейкоза, заболевание остается широко распространенным на планете и продолжает наносить значительный экономический ущерб. Большинство инфицированных вирусом BLV животных остаются бессимптомными носителями вируса, что осложняет постановку диагноза и способствует распространению заболевания в стаде. Структура генома вируса BLV в целом типична для представителей ретровирусов. В его состав входят гены, кодирующие структурные белки, вирусные ферменты и регуляторные элементы, фланкированные с обеих сторон идентичными длинными концевыми повторами. Гены, кодирующие ферменты и структурные белки (*gag*, *pro*, *pol* и *env*), играют важнейшую роль в жизненном цикле вируса, оказывая влияние на его инфекционность и производство вирионов. Регуляторные гены *tax* и *rex* обеспечивают регуляцию вирусной транскрипции, экспорт транскриптов из ядра в цитоплазму и прогрессирование заболевания. При этом увеличение числа копий провирусной ДНК происходит в основном не за счёт функционирования обратной транскриптазы вируса, а посредством клонального размножения пораженных субпопуляций В-клеток, преимущественно CD5+ IgM+. Данная особенность обеспечивает повышенную генетическую стабильность вируса BLV. Эти свойства вирусного генома позволяют разрабатывать разнообразные ПЦР-тест системы, широкое внедрение которых позволяет выявлять носителей болезни на ранних стадиях, что должно способствовать эффективной реализации национальных программ искоренения лейкоза крупного рогатого скота.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию НИР № FNSS-2022-0006 Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности.

Received 23.04.2023

Accepted in revised 17.07.2023

Accepted for publication 25.07.2023

© Fomenko, O. Yu., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Review article

Open access

STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF THE BOVINE LEUKEMIA VIRUS GENOME: A MINI REVIEW

Oleg Yu. Fomenko

All-Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russia

KEY WORDS:

leukemia, bovine

leukemia virus,

genome, proviral DNA,

PCR assay

ABSTRACT

Enzootic bovine leukemia is an infectious disease with a chronic course caused by an RNA-containing virus of the genus *Deltaretrovirus*. Despite the implementation of various programs for the elimination of leukemia, the disease is still widespread on the planet and continues to cause significant economic damage. A large proportion of BLV-infected cattle remain to be asymptomatic carriers of the virus, which complicates diagnosis and contributes to the spread of the disease in the herd. The structure of the BLV genome is generally typical of retroviruses. It consists of genes encoding structural proteins, viral enzymes and regulatory elements flanked on both sides by identical long terminal repeats. The enzyme and structural protein coding genes (*gag*, *pro*, *pol*, and *env*) play a crucial role in the life cycle of the virus, influencing its infectivity and virion production. The *tax* and *rex* regulatory genes regulate viral transcription, export of transcripts from the nucleus to the cytoplasm, and disease progression. The increase in the number of copies of proviral DNA occurs mainly not due to the functioning of the virus reverse transcriptase, but because of clonal reproduction of the affected subpopulations of B-cells, mainly CD5+ IgM+. This feature provides increased genetic stability of the BLV virus. These properties of the viral genome allow the development of a variety of PCR test systems. The widespread implementation of such systems enables the detection of carriers of the disease at early stages, which should contribute to the effective implementation of national programs to eradicate bovine leukemia.

FUNDING: The article was prepared within the framework of research on the state task of Research and Development No. FNSS-2022-0006 of the All-Russian Research Institute of Dairy Industry.

1. Введение

Вирус лейкоза крупного рогатого скота представляет собой онкогенный ретровирус из рода *Deltaretrovirus*, являющийся причиной возникновения энзоотического лейкоза КРС. Данное лимфопролиферативное заболевание характеризуется возникновением дисбаланса в динамическом равновесии между пролиферацией клеток и их гибелью, приводящего к прогрессирующему накоплению клеток, несущих интегрированный в геном провирус [1]. Впервые вирусные частицы типа С из лейкоцитов больного лимфосаркомой крупного рогатого скота были выделены Miller с соавторами [2]. В дальнейшем вирус, полученный из краткосрочных культур лимфоцитов больных коров, был

охарактеризован с молекулярно-биологической точки зрения, и вирусная природа лейкоза КРС была подтверждена совокупностью эпидемиологических и биохимических данных [3]. Вирус интегрируется в геномную ДНК клеток периферической крови хозяина как провирус и, таким образом, поддерживает персистенцию вируса в организме [4]. Следует отметить, что род *Deltaretrovirus* включает в себя Т-лимфотропные вирусы человека I и II типов (HTLV-I и HTLV-II), а также Т-лимфотропный вирус обезьян [5]. Индуцированные вирусом BLV опухоли обычно берут свое начало из субпопуляции CD5+ IgM+ В-клеток [6]. При этом широкое распространение BLV-инфекции приводит к огромным экономическим потерям в животноводческой отрасли.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Фоменко, О. Ю. (2023). Структурные характеристики генома вируса лейкоза крупного рогатого скота: мини-обзор. *Пищевые системы*, 6(3), 283–287. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-3-283-287>

FOR CITATION: Fomenko, O. Yu. (2023). Structural characteristics of the bovine leukemia virus genome: A mini review. *Food Systems*, 6(3), 283–287. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-3-283-287>

Целью данной работы являлся анализ литературы о молекулярно-генетических характеристиках генома вируса лейкоза крупного рогатого скота и их использования для создания эффективных диагностических тест-систем.

2. Материалы и методы

Объектами изучения являлись научные публикации, посвященные различным аспектам строения и функционирования генома вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота. Поиск осуществлялся в базе PubMed и открытых интернет-источниках, период поиска охватывал временной интервал с 1969 по 2023 годы. Использовались следующие ключевые слова на английском языке (как по отдельности, так и в комбинациях): leukemia, Bovine leukemia virus, genome, proviral DNA, regulation, transcription, life cycle, PCR assay. Из поисковой выдачи были исключены результаты, не содержавшие полные тексты научных трудов, а также опубликованные не на языке поисковых запросов. Кроме того, из отобранных материалов дополнительно удалены работы, не относящиеся к теме данного исследования.

3. Организация генома вируса BLV

Полная нуклеотидная последовательность РНК-генома вируса лейкоза крупного рогатого скота была получена Sagata с соавторами [7]. С использованием метода Максама-Гилберта авторам удалось прочитать последовательность вирусного генома длиной 8714 пар оснований. Была предложена схема строения вирусного генома вида 5' LTR-gag-pol-env-rXBL-3' LTR, которая на сегодняшний день остается практически неизменной. Как и все ретровирусы, геном BLV кодирует структурные белки и ферменты (*gag*, *pro*, *pol* и *env*), играющие важнейшие и незаменимые роли в реализации жизненного цикла вируса, вирулентности и в производстве инфекционных вирионов [8].

Длинный 5'-концевой повтор (5'-LTR) размером 560 нуклеотидов очень консервативен: единственным существенным различием между изолятами вируса является нуклеотидная замена G→A в позиции 150 третьего энхансерного элемента TxRE данного участка генома [9]. Каждый из трех энхансерных элементов TxRE, расположенных в области U3 длинного 5'-концевого повтора, имеет длину в 21 нуклеотидный остаток и несет коровую восьминуклеотидную последовательность, соответствующую консервативному элементу ответа цАМФ (CRE), с которым могут связываться такие клеточные транскрипционные факторы, как белок, связывающий элемент ответа цАМФ (CREB), факторы активации транскрипции ATF-1 и ATF-2 и некоторые другие [10]. Помимо этого, каждый из указанных выше энхансеров содержит в себе последовательность E-box, перекрывающуюся с каждым из CRE-мотивов и связывающую различные транскрипционные факторы, такие как c-Myc, Max, USF и TFE3 [11]. Данный регион также содержит глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) [12] и сайт связывания PU.1/Spi-B [13].

Транскрипционный промотор вируса BLV расположен в пределах длинного 5'-концевого повтора и состоит из участков U3, R and U5. Экспрессия вирусных генов индуцируется на транскрипционном уровне при помощи трансактиватора Tax, кодируемого вирусом [14]. Белок Tax функционирует как трансактиватор транскрипции вирусных генов и модулирует экспрессию некоторых клеточных генов хозяина [15]. Таким образом, считается, что белок Tax играет критическую роль в процессе лейкемогенеза, вызываемого дельтавирусами [16]. Установлено, что продолжительность латентного периода у штаммов вируса BLV, кодирующих остаток пролина в положении 233 белка Tax (P233-Tax), приблизительно на два года длиннее, чем у вариантов вируса L233-Tax [17].

Как отмечалось выше, структурные и функциональные вирусные белки кодируются генами *gag*, *pro*, *pol* и *env*. Продукт гена *gag* представляет собой белок-предшественник, продуктами созревания которого являются матриксный (p15 — MA), капсидный (p24 — CA) и нуклеокапсидный (p12 — NC) белки. Известно, что нуклеокапсидные белки всех ретровирусов отличаются высоким содержанием основных аминокислотных остатков и наличием цинк-связывающих доменов, вовлеченных в упаковку РНК и оказывающих влияние на специфичность связывания между РНК и белком [18].

Кодируемая геном *pro* протеаза вируса BLV представляет собой аспартатную протеазу, чья активность необходима для процессирования продукта трансляции *gag* и правильного созревания вирионов. При этом, по сравнению с другими гомологичными ретровирусными ферментами, данная протеаза гораздо более чувствительна к возникающим мутациям, которые оказывают существенное влияние на формирование функциональной конформации молекулы

и ее каталитическую активность. В этом отношении она подобна протеазе Т-лимфотропного вируса человека I типа [19]. Вероятно, это является следствием того, что эти вирусы не используют чрезвычайно подверженную ошибкам обратную транскриптазу (вследствие отсутствия у нее экзонуклеазной активности [20]) для создания достаточного уровня генетического разнообразия, а поддерживают высокий уровень провирусной нагрузки главным образом за счет клональной экспансии инфицированных клеток. При изучении скорости возникновения мутаций и их типов, наблюдающихся в ходе одного цикла репликации, было установлено, что процесс обратной транскрипции у вируса BLV примерно в два с половиной раза более точен, чем аналогичный процесс у вируса некроза селезенки SNV (4.8×10^{-6} против 1.2×10^{-5} мутаций на основание за цикл соответственно) [21]. Подобный механизм обеспечивает удивительную генетическую стабильность вируса [22].

Обратная транскриптаза вируса BLV кодируется геном *pol*. Фермент обладает всеми видами активностей, присущих ревертазам: РНК- и ДНК-зависимой полимеразной активностью, а также проявляет рибонуклеазную Н-активность. В отличие от большинства обратных транскриптаз, обратная транскриптаза вируса BLV ферментативно активна в виде мономера даже после связывания субстрата ДНК. Для проявления как ДНК-полимеразной, так и РНК-азной активности фермент отдает предпочтение ионам Mg^{2+} по сравнению с Mn^{2+} . При этом BLV-RT относительно устойчива к действию аналогов нуклеозидтрифосфатов, являющихся мощными ингибиторами других обратных транскриптаз, таких как ревертаза ВИЧ [23].

Белковый комплекс Env образован двумя субъединицами: поверхностной субъединицей gp51 (SU, N-концевая часть) и трансмембранной gp30 (TM, C-концевая часть). Данный комплекс существует в виде функционального тримера, в котором три поверхностные субъединицы присоединены дисульфидными мостиками к шипам на поверхности трех трансмембранных субъединиц [9]. Белок gp51 распознает клеточные рецепторы и связывается с ними, вызывая тем самым конформационные изменения, приводящие к слиянию вирусной и клеточной мембран при участии олигомеров [24]. Было установлено, что алкилирование тиольной группы в мотиве Cys-X-X-Cys (CXXC) приводит к ингибированию изомеризации, слияния вируса и процесса инфицирования из-за разрушения дисульфидной связи между субъединицами SU и TM. Дальнейшие исследования, проведенные Wallin, Ekström и Garoff, показали, что процесс слияния вируса с клеткой-хозяином специфически ингибируется высокими и усиливается низкими концентрациями ионов Ca^{2+} . Эти результаты позволили авторам предположить, что комплекс Env стабилизируется двухвалентными катионами кальция и что связывание с рецептором запускает каскад реакций, включающих в себя удаление Ca^{2+} , экспозицию тиольной группы мотива CXXC и изомеризацию дисульфидной связи между субъединицами SU и TM с последующей диссоциацией поверхностного белка gp51, что приводит к активации процесса слияния [25].

Быстрое появление нейтрализующих антител к субъединице SU указывает на то, что она является основной мишенью противовирусного иммунитета. При анализе конкурентного связывания моноклональных антител было установлено, что gp51 содержит как минимум 8 эпитопов, обозначаемых от А до Н, причем три из них относятся к конформационным и нейтрализующим антигенным сайтам [26]. Моноклональные антитела против эпитопа Н способны полностью блокировать слияние клеток в культуре. Антитела против эпитопов F и G менее эффективно снижают способность вируса к формированию синцития [27]. Помимо гуморального иммунитета, поверхностная субъединица также стимулирует Т-клеточный ответ, что продемонстрировано наличием хелперов CD4+ и эпитопов для цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов (CTL). Было показано, что из 11 эпитопов данного типа только gp51N11 был способен индуцировать CD8(+) Т-клеточно опосредованную цитотоксичность, но при этом он не пригоден в качестве мишени для вакцины из-за высокого уровня полиморфизма в соответствии со значением индекса варибельности Vu-Кабата [28]. В противоположность SU, трансмембранная субъединица оболочки вируса BLV обладает крайне низкой иммуногенностью [29].

Роль региона rX (длиной 1800 оснований) первоначально оставалась неясной, было известно лишь то, что он содержит неидентифицированные открытые рамки считывания и соответствует участку rX вируса HTLV. Отсутствие ее гибридизации с ДНК хозяина (коровы) позволяло сделать предположение о том, что данная часть генома вируса не является недавно захваченным клеточным геном [7]. В дальнейшем было выяснено, что в состав rX-участка входит

несколько неструктурных генов (*R3*, *G4*, *tax*, *rex*, *AS* и *pre-miRs*), играющих важную роль в регуляции вирусной транскрипции, трансформации индуцированного BLV лейкомогенеза, экспорте вирусной РНК из ядра и синтезе микроРНК [30, 31].

Также, как в случае с HTLV-1, белки вируса BLV Tax и Rex, закодированные в участке генома *pX*, вовлечены в транскрипционную и посттранскрипционную регуляцию экспрессии вирусных генов соответственно. Методами обратной генетики было показано, что эти белки чрезвычайно важны для проявления вирусной инфекционности *in vivo* [32]. Белок Tax опосредованно связывается с CRE-элементами, находящимися в участке U3 5'-длинного концевой повтора. Tax активирует транскрипцию провируса через взаимодействие с членами семейства CREB/ATF, а также с гистонацетилазными ферментами (HATs), регулируемыми транскрипцию хроматина путем целевого ацетилирования нуклеосомальных гистонов [33].

При этом в период латентной фазы вирус придерживается стратегии «молчания», которая, по-видимому, позволяет ему эффективно избегать воздействия иммунной системы хозяина. В тоже время механизм подобного «молчания» остается неизвестным. Возможно, что регуляторный белок Rex, кодируемый участком *pX* генома вируса BLV, способен снижать уровень экспрессии вирусных протеинов, подавляя экспрессию не только гена *rex*, но и *tax*, который также кодируется участком *pX* и активирует управляемую длинным концевым повтором транскрипцию [34]. Считается, однако, что Rex сам по себе недостаточен для полной репрессии вирусной экспрессии, так как в продолжающихся клеточных культурах с интегрированным полноразмерным геномом BLV наблюдается значительное количество транскриптов вируса [35].

Развитие симптомокомплекса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота требует экспрессии *tax*, по крайней мере, на ранних стадиях инфекции. Активация вирусной экспрессии в латентно инфицированных клетках и избегание цитотоксического ответа лимфоцитов на нее являются важнейшим этапом патогенеза. В тоже время до сих пор остается неясным, каким образом экспрессия вируса повторно активируется в латентно инфицированных (характеризующихся низким уровнем экспрессии) лейкоцитах *in vivo* [32]. Внутри ядра белок Rex взаимодействует с элементами ответа на Rex (RexRE), располагающимися на 3' R-участках матричных РНК вируса, и переносит их в цитоплазму, ингибируя процессы сплайсинга и усиливая накопление в ней как сплайсированных, так и незрелых транскриптов. Это усиление в свою очередь приводит к синтезу структурных белков и к снижению уровня дважды сплайсированной *tax-rex* мРНК [36]. Однако некоторые вирусные молекулы РНК все же процессируются с образованием зрелой мРНК *env*, дважды сплайсированной мРНК *p30* и продукта альтернативного сплайсинга матричной РНК *tax/rex*. При этом *p30* способен взаимодействовать с Rex и ингибировать за счет этого экспорт из ядра прошедших двойной сплайсинг вирусных матричных РНК, включая и транскрипт гена *tax*, снижая уровень вирусной транскрипции из-за предотвращения синтеза белка Tax [37].

Вспомогательные белки R3 и G4 вносят вклад в поддержание высокого уровня вирусной нагрузки. Белок R3 состоит из 44 аминокислотных остатков с гидрофильной частью на N-конце и следующим за ней гидрофобным участком. Montero Machuca с соавторами [38] обнаружили 9 несинонимичных мутаций в 5 из 30 исследованных последовательностей вируса BLV генотипа 1, но не выявили их ассоциаций с какими-либо специфическими биологическими эффектами. Результаты опытов с использованием иммунофлуоресценции показали, что после трансляции накопление белка R3 наблюдается в ядре и клеточных мембранах, в то время как G4 локализуется в митохондриях и клеточном ядре. В этом отношении полипептиды R3 и G4 показывают сходство с белками Т-лимфоцитарного вируса человека I типа p12I и p13II соответственно, что может указывать на предположительное совпадение их функциональных свойств [39]. Было показано, что спонтанные мутации, такие, как, например, делеция размером в 12 пар нуклеотидов в гене G4 у штамма вируса BLV *pVAF967*, способны существенно снижать репликацию вируса и приводить к возникновению статической вирусной нагрузки [40].

При помощи технологии RNA-seq было обнаружено, что провирус BLV конститутивно экспрессирует два антисмысловых транскрипта, причем как у животных с клиническими признаками лейкоза, так и у бессимптомных носителей. Первый из транскриптов (AS1) может подвергаться альтернативному сплайсингу и образованию транскрипта AS1-S длиной ~600 оснований и менее представленного транскрипта размером ~2200 оснований (AS1-L). Результатом

альтернативного сплайсинга является появление второго транскрипта — AS2 — протяженностью около 400 нуклеотидных остатков [31]. Последовательная экспрессия этих транскриптов как в лейкоэмических, так и в незлокачественных клонах указывает на их существенную роль в жизненном цикле вируса и в процессе реализации его онкогенного потенциала [31].

Помимо описанных выше элементов, геном вируса BLV содержит гены вирусных микроРНК (*pre-miR-B*), расположенные между участками *env* и *pX*. С пяти различных генов *pre-miR-B* при помощи РНК-полимеразы III транскрибируется десять вирусных микроРНК (*miRs-B*), в больших количествах обнаруживаемых в инфицированных вирусом В-клетках как на бессимптомной, так и на лейкоэмической стадиях развития инфекции [41].

4. Молекулярно-генетическая диагностика вируса BLV

Вирус BLV интегрируется в клеточный геном хозяина и остается в нем даже при полном отсутствии детектируемых антител. Это делает провирусную ДНК привлекательной мишенью для диагностики заболеваний. Молекулярно-генетические анализы на основе ДНК-технологий существенно ускоряют выявление вируса, что позволяет эффективно предотвращать его распространение и снижать экономические потери животноводческой отрасли.

К настоящему времени разработано значительное количество ПЦР-методов, направленных на выявление провирусной ДНК в клетках крови животных. Как видно из приведенных выше данных об особенностях организации вирусного генома, наиболее привлекательными для диагностики являются 5'-длинные концевые повторы [42,43], гены *gag* [44], *pol* [45], *env* [46] и *tax* [47,48]. Важно отметить, что количество копий провируса в общем случае остается чрезвычайно малым по сравнению геномом хозяина, из-за чего большое количество тест-систем сконструировано с использованием гнездовой ПЦР. Например, Klintevall и соавторы [49] проводили изучение кинетики инфекционного процесса и тропизма вируса, а также пригодности различных методов ранней диагностики инфекции, амплифицируя участки провирусной ДНК в образцах, выделенных из крови и различных органов искусственно зараженных животных. Используя праймеры для гнездовой ПЦР, специфически амплифицирующие участок длинного концевого повтора генома вируса, Uera с соавторами [50] выполнили первый анализ распространения вируса лейкоза КРС на территории Филиппин с использованием молекулярно-биологических подходов. Эта работа была продолжена в исследованиях Polat и соавторы [51], путём изучения 1116 образцов крови КРС показавших циркулирование вируса BLV генотипов 1 и 6 на территории страны. Система специфических праймеров позволила D'Angelino с соавторами [52] идентифицировать фрагмент гена *env*, кодирующий поверхностную субъединицу gp51, в 4,8% исследованных образцов головного мозга коров с различного рода неврологических синдромами. Используя ту же мишень, исследователи Villalobos-Cortés и др. [53] провели сравнительное исследование использования иммунодиффузии в геле, ИФА и ПЦР для выявления больных животных. Однако гнездовая ПЦР, несмотря на свою высочайшую чувствительность, обычно является весьма продолжительной по времени выполнения анализа и обладает высоким риском получения ложноположительных результатов из-за перекрестной ДНК-контаминации образцов. В последние годы разработано несколько методик, позволяющих работать напрямую с образцами крови без необходимости выделения и очистки ДНК, что значительно сокращает время анализа и существенно уменьшает его стоимость. Nishimori с соавторами [54], исследовав 225 клинических образцов установили, что специфичность и чувствительность использованной ими системы для прямой ПЦР составили 100% и 75,51% по сравнению с гнездовой ПЦР. При разработке метода прямой ПЦР для выявления провирусной ДНК вируса BLV, Takeshima с соавторами [55] использовали праймеры, комплементарные длинному концевому повтору вируса. Их тест-система позволила выявлять носителей заболевания с вирусной нагрузкой выше 133 копий на 10⁵ клеток крови. Используя метод прямой амплификации ДНК из высушенных на фильтровальной бумаге пятен цельной крови, исследовательской группе El Daous [56] удалось достичь чувствительности и специфичности в 90,1% и 97,5% соответственно по сравнению с ИФА-анализом. Wu с соавторами [57] разработали высокоточный метод количественного определения вирусной нагрузки с использованием цифровой капельной ПЦР и неочищенной геномной ДНК. При этом коэффициент корреляции результатов между классической и прямой ПЦР составил 0,906, что делает предложенный авторами метод очень перспективным для количественного анализа крупных массивов образцов.

5. Выводы

Таким образом, проведенный краткий обзор показал, что геном вируса BLV имеет структуру, типичную для онкогенных ретровирусов рода *Deltaretrovirus*. Схема строения вирусного генома имеет вид 5'-LTR-gag-pol-env-rXBL-3'-LTR. Помимо структурных, функциональных и регуляторных белков, в геноме вируса закодировано 5 микроРНК (*pre-miR-B*), расположенных между участками *env* и *rX* и частично перекрывающихся со стабильно экспрессирующими антисмысловыми транскриптами AS1 и AS2, предположительно играю-

щими важную роль в реализации жизненного цикла вируса. Относительная стабильность генома вируса BLV, связанная со спецификой размножения вируса, позволяет разрабатывать ПЦР тест-системы для обнаружения провирусной ДНК на ранних стадиях развития заболевания. Дальнейшая разработка более чувствительных и менее трудозатратных методов ПЦР-анализа будет способствовать достижению целей программ по ликвидации вирусного лейкоза крупного рогатого скота, а также приведет к увеличению объема выпуска качественной и безопасной для потребителей молочной продукции.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

- Achachi, A., Florins, A., Gillet, N., Debacq, C., Urbain, P., Foutsop, G. M. et al. (2005). Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(29), 10309–10314. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504248102>
- Miller, J. M., Miller, L. D., Olson, C., Gillette, K. G. (1969). Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 43(6), 1297–1305. <https://doi.org/10.1093/jnci/43.6.1297>
- Kettmann, R., Portetelle, D., Mammerickx, M., Cleuter, Y., Dekegel, D., Galoux, M. et al. (1976). Bovine leukemia virus: An exogenous RNA oncogenic virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(4), 1014–1018. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.4.1014>
- Murakami, H., Yamada, T., Suzuki, M., Nakahara, Y., Suzuki, K., Sentsui, H. (2011). Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia. *Virus Research*, 156(1–2), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.01.004>
- Hron, T., Elleder, D., Gifford, R. J. (2019). Deltaretroviruses have circulated since at least the Paleogene and infected a broad range of mammalian species. *Retrovirology*, 16, Article 33. <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0495-9>
- Aida, Y., Okada, K., Amanuma, H. (1993). Phenotype and ontogeny of cells carrying a tumor-associated antigen that is expressed on bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma. *Cancer Research*, 53(2), 429–437.
- Sagata, N., Yasunaga, T., Tsuzuku-Kawamura, J., Ohishi, K., Ogawa, Y., Ikawa, Y. (1985). Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(3), 677–681. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.3.677>
- Polat, M., Takeshima, Sn., Aida, Y. (2017). Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virology Journal*, 14, Article 209. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0876-4>
- Moratorio, G., Fischer, S., Bianchi, S., Tomé, L., Rama, G., Obal, G. et al. (2013). A detailed molecular analysis of complete Bovine Leukemia Virus genomes isolated from B-cell lymphosarcomas. *Veterinary Research*, 44, Article 19. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-19>
- Nguyen, T. L., de Walque, S., Veithen, E., Dekoninck, A., Martinelli, V., de Launoit, Y. et al. (2007). Transcriptional regulation of the bovine leukemia virus promoter by the cyclic AMP-response element modulator tau isoform. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 20854–20867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703060200>
- Calomme, C., Dekoninck, A., Nizet, S., Adam, E., Nguyen, T.L., Van Den Broeke, A. et al. (2004). Overlapping CRE and E box motifs in the enhancer sequences of the bovine leukemia virus 5' long terminal repeat are critical for basal and acetylation-dependent transcriptional activity of the viral promoter: Implications for viral latency. *Journal of Virology*, 78(24), 13848–13864. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.13848-13864.2004>
- Xiao J., Buehring G. C. (1998). *In vivo* protein binding and functional analysis of cis-acting elements in the U3 region of the bovine leukemia virus long terminal repeat. *Journal of Virology*, 72(7), 5994–6003. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.7.5994-6003.1998>
- Dekoninck, A., Calomme, C., Nizet, S., de Launoit, Y., Burny, A., Ghysdael, J. et al. (2003). Identification and characterization of a PU.1/Spi-B binding site in the bovine leukemia virus long terminal repeat. *Oncogene*, 22(19), 2882–2896. <https://doi.org/doi:10.1038/sj.onc.1206592>
- Derse, D. (1987). Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus-encoded trans-acting factor and by cis-acting response elements. *Journal of Virology*, 61(8), 2462–2471. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.8.2462-2471.1987>
- Maewaza, M., Fujii, Y., Akagami, M., Kawakami, J., Inokuma, H. (2023). Phylogenetic analysis based on whole genome sequence of bovine leukemia virus in cattle under 3 years old with enzootic bovine leukosis. *PLOS ONE*, 18(1), Article e0279756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279756>
- Szynal, M., Cleuter, Y., Beskorwayne, T., Bagnis, C., Van Lint, C., Kerkhofs, P. et al. (2003). Disruption of B-cell homeostatic control mediated by the BLV-Tax oncoprotein: Association with the upregulation of Bcl-2 and signaling through NF- κ B. *Oncogene*, 22, 4531–4542. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206546>
- Inoue, E., Matsumura, K., Soma, N., Hirasawa, S., Wakimoto, M., Arakaki, Y. et al. (2013). L235P mutation of the Tax protein strongly correlated with leukemogenicity of bovine leukemia virus. *Veterinary Microbiology*, 167(3–4), 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.026>
- Wang, H., Norris, K. M., Mansky, L. M. (2003). Involvement of the matrix and nucleocapsid domains of the bovine leukemia virus Gag polyprotein precursor in viral RNA packaging. *Journal of Virology*, 77(17), 9431–9438. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.17.9431-9438.2003>
- Sperka, T., Miklóssy, G., Tie, Y., Bagossi, P., Zahuczky, G., Boross, P. et al. (2007). Bovine leukemia virus protease: Comparison with human T-lymphotropic virus and human immunodeficiency virus proteases. *Journal of General Virology*, 88(7), 2052–2065. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82704-0>
- Sebastián-Martín, A., Barrioluengo, V., Menéndez-Arias, L. (2018). Transcriptional inaccuracy threshold attenuates differences in RNA-dependent DNA synthesis fidelity between retroviral reverse transcriptases. *Scientific Reports*, 8, Article 627. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18974-8>
- Mansky, L. M., Temin, H. M. (1994). Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. *Journal of Virology*, 68(1), 494–499. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.1.494-499.1994>
- Wattel, E., Vartanian, J. P., Pannetier, C., Wain-Hobson, S. (1995). Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *Journal of Virology*, 69(5), 2863–2868. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.5.2863-2868.1995>
- Perach, M., Hizi, A. (1999). Catalytic features of the recombinant reverse transcriptase of bovine leukemia virus expressed in bacteria. *Virology*, 259(1), 176–189. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9761>
- Lamb, D., Schüttelkopf, A. W., van Aalten, D. M., Brighty, D. W. (2011). Charge-surronded pockets and electrostatic interactions with small ions modulate the activity of retroviral fusion proteins. *PLOS Pathogens*, 7(2), Article e1001268. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001268>
- Wallin, M., Ekström, M., Garoff, H. (2004). Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion. *The EMBO Journal*, 23(1), 54–65. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600012>
- Bruck, C., Mathot, S., Portetelle, D., Berte, C., Franssen, J. D., Herion, P. et al. (1982). Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51. *Virology*, 122(2), 342–352. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(82\)90234-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(82)90234-3)
- Zarkik, S., Defrise-Quertain, F., Portetelle, D., Burny, A., Ruyschaert, J. M. (1997). Fusion of bovine leukemia virus with target cells monitored by R18 fluorescence and PCR assays. *Journal of Virology*, 71(1), 738–740. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.1.738-740.1997>
- Bai, L., Takeshima, S. N., Isogai, E., Kohara, J., Aida, Y. (2015). Novel CD8(+) cytotoxic T cell epitopes in bovine leukemia virus with cattle. *Vaccine*, 33(51), 7194–7202. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.128>
- De Brogniez, A., Mast, J., Willems, L. (2016). Determinants of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoproteins Involved in Infectivity, Replication and Pathogenesis. *Viruses*, 8(4), Article 88. <https://doi.org/10.3390/v8040088>
- Barez, P. Y., de Brogniez, A., Carpentier, A., Gazon, H., Gillet, N., Gutiérrez, G. et al. (2015). Recent advances in BLV research. *Viruses*, 7(11), 6080–6088. <https://doi.org/10.3390/v7112929>
- Durkin, K., Rosewick, N., Artesi, M., Hahaut, V., Griebel, P., Arsic, N. et al. (2016). Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs. *Retrovirology*, 13(1), Article 33. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0267-8>
- Pluta, A., Jaworski, J. P., Douville, R. N. (2020). Regulation of Expression and Latency in BLV and HTLV. *Viruses*, 12(10), Article 1079. <https://doi.org/10.3390/v12101079>
- Araingma, M., Takeda, E., Aida, Y. (2012). Identification of bovine leukemia virus tax function associated with host cell transcription, signaling, stress response and immune response pathway by microarray-based gene expression analysis. *BMC Genomics*, 13, Article 121. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-121>
- Tajima, S., Aida, Y. (2005). Induction of expression of bovine leukemia virus (BLV) in blood taken from BLV-infected cows without removal of plasma. *Microbes and Infection*, 7(11–12), 1211–1216. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.010>
- Inabe, K., Ikuta, K., Aida, Y. (1998). Transmission and propagation in cell culture of virus produced by cells transfected with an infectious molecular clone of bovine leukemia virus. *Virology*, 245(1), 53–64. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9140>
- Derse, D. (1988). Trans-acting regulation of bovine leukemia virus mRNA processing. *Journal of Virology*, 62(4), 1115–1119. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.4.1115-1119.1988>
- Edwards, D., Fenizia, C., Gold, H., de Castro-Amarante, M. F., Buchmann, C., Pise-Masison, C.A. et al. (2011). Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses*, 3(6), 861–885. <https://doi.org/10.3390/v3060861>
- Montero Machuca, N., Tórtora Pérez, J. L., González Méndez, A. S., García-Camacho, A. L., Marín Flamand, E., Ramírez Álvarez, H. (2022). Genetic analysis of the pX region of bovine leukemia virus genotype 1 in Holstein Friesian cattle with different stages of infection. *Archives of Virology*, 167, 45–56. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05252-2>
- Lefebvre, L., Ciminale, V., Vanderplasschen, A., D'Agostino, D., Burny, A., Willems, L. et al. (2002). Subcellular localization of the bovine leukemia virus R5 and G4 accessory proteins. *Journal of Virology*, 76(15), 7843–7854. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.15.7843-7854.2002>
- Murakami, H., Uchiyama, J., Nikaido, S., Sato, R., Sakaguchi, M., Tsukamoto, K. (2016). Inefficient viral replication of bovine leukemia virus induced by spontaneous deletion mutation in the G4 gene. *Journal of General Virology*, 97(10), 2753–2762. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000583>

41. Zyrianova, I. M., Koval'chuk, S. N. (2018). Bovine leukemia virus *pre-miRNA* genes' polymorphism. *RNA Biology*, 15(12), 1440–1447. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1555406>
42. Jimba, M., Takeshima, Sn., Murakami, H., Kohara, J., Kobayashi, N., Matsushashi, T. et al. (2012). BLV–CoCoMo–qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC Veterinary Research*, 8, Article 167. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-167>
43. Borjigin, L., Yoneyama, S., Saito, S., Polat, M., Inokuma, M., Shinozaki, Y. et al. (2021). A novel real time PCR assay for bovine leukemia virus detection using mixed probes and degenerate primers targeting novel BLV strains. *Journal of Virological Methods*, 297, Article 114264. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114264>
44. Corredor-Figueroa, A. P., Salas, S., Olaya-Galán, N. N., Quintero, J. S., Fajardo, Á., Soñora, M. et al. (2020). Prevalence and molecular epidemiology of bovine leukemia virus in Colombian cattle. *Infection, Genetics and Evolution*, 80, Article 104171. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104171>
45. Dimitrov, P., Simeonov, K., Todorova, K., Ivanova, Z., Toshkova, R., Shikova, E. et al. (2012). Pathological features of experimental bovine leukaemia viral (BLV) infection in rats and rabbits. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 56, 115–120. <https://doi.org/10.2478/v10213-012-0021-5>
46. Fechner, H., Kurg, A., Geue, L., Blankenstein, P., Mewes, G., Ebner, D. et al. (1996). Evaluation of Polymerase Chain Reaction (PCR) application in diagnosis of Bovine Leukaemia Virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zoonoses and Public Health*, 43(1–10), 621–630. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1996.tb00361.x>
47. Choi, K. Y., Monke, D., Stott, J. L. (2002). Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bulls. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14(5), 403–406. <https://doi.org/10.1177/104063870201400507>
48. Alvarez, I., Porta, N. G., Trono, K. (2019). Detection of Bovine Leukemia Virus RNA in blood samples of naturally infected dairy cattle. *Veterinary Sciences*, 6(3), Article 66. <https://doi.org/10.3390/vetsci6030066>
49. Klintevall, K., Ballagi-Pordány, A., Näslund, K., Belák, S. (1994). Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Veterinary Microbiology*, 42(2–3), 191–204. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90018-3)
50. Uera, J. A., Lazaro, J. V., Mingala, C. (2012). Detection of Enzootic Bovine Leukosis in cattle using nested Polymerase Chain Reaction assay. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 42(3), 319–324. <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/tjvm/article/view/10988>
51. Polat, M., Ohno, A., Takeshima, Sn., Kim, J., Kikuya, M., Matsumoto, Y. et al. (2015). Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle. *Archives of Virology*, 160, 285–296. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2280-3>
52. D'Angelino, R. H. R., Pituco, E. M., Villalobos, E. M. C., Harakava, R., Gregori, F., Del Fava, C. (2013). Detection of Bovine Leukemia Virus in brains of cattle with a neurological syndrome: Pathological and molecular studies. *Bio Med Research International*, 2013, Article 425646. <https://doi.org/10.1155/2013/425646>
53. Villalobos-Cortés, A., Franco, S., González, R. G., Jaen, M. W. (2017). Nested polymerase chain reaction (nPCR) based diagnosis of bovine leukemia virus in Panama. *African Journal of Biotechnology*, 16, 528–535. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15849>
54. Nishimori, A., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Nakahara, A., Murata, S. et al. (2016). Direct polymerase chain reaction from blood and tissue samples for rapid diagnosis of bovine leukemia virus infection. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 78(5), 791–796. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0577>
55. Takeshima, Sn., Watanuki, S., Ishizaki, H., Matoba, K., Aida, Y. (2016). Development of a direct blood-based PCR system to detect BLV provirus using CoCoMo primers. *Archives of Virology*, 161, 1539–1546. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2806-y>
56. El Daous, H., Mitoma, S., Elhanafy, E., Thi Nguyen, H., Thi Mai, N., Hara, A. et al. (2020). Establishment of a novel diagnostic test for Bovine Leukaemia virus infection using direct filter PCR. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(4), 1671–1676. <https://doi.org/10.1111/tbed.13506>
57. Wu, X., Notsu, K., Matsuura, Y., Mitoma, S., El Daous, H., Norimine, J. et al. (2023). Development of droplet digital PCR for quantification of bovine leukemia virus proviral load using unpurified genomic DNA. *Journal of Virological Methods*, 315, Article 114706. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114706>



СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Фоменко Олег Юрьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Центральная лаборатория микробиологии, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности 115093, Москва, ул. Люсиновская, 35/7 Тел.: +7-904-211-01-75 E-mail: o_fomenko@vnimi.org ORCID: http://orcid.org/0000-0001-7852-3790	Oleg Yu. Fomenko , Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Central Laboratory of Microbiology, All-Russian Dairy Research Institute 35/7, Lyusinovskaya str., 115093, Moscow, Russia Tel.: +7-904-211-01-75 E-mail: o_fomenko@vnimi.org ORCID: http://orcid.org/0000-0001-7852-3790
Критерии авторства	Contribution
Автор имеет единоличное отношение к написанию рукописи и несет ответственность за плагиат	The author has the sole responsibility for writing the manuscript and is responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.	The author declare no conflict of interest.