



Wykorzystanie biotechnologii w diagnostyce i zwalczaniu zakażeń wirusem białaczki bydła

Jacek Kuźmak

Zakład Biochemii, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Puławy

The application of biotechnological achievements in the diagnosis and control of infection with bovine leukemia virus (BLV)

Summary

Bovine leukemia virus (BLV) is the causative agent for enzootic bovine leukosis (EBL). The article concerns the applications of some biotechnological achievements in the development of modern diagnostic methods, new approaches to specific prophylaxis against BLV as well as the selection of naturally resistant animals.

Key words:

bovine leukemia virus – BLV, diagnosis, specific vaccines, natural resistance.

1. Wprowadzenie

Enzootyczna białaczka bydła (EBB) jest chorobą nowotworową o wybitnie przewlekłym przebiegu, którą cechuje rozwój zmian proliferacyjnych układu limforetikularnego, prowadzący do przewlekłej limfocytozy tzw. forma leukemiczna i do zmian guzowatych w węzłach chłonnych i narządach wewnętrznych, co określa się jako formę guzowatą (EBB). Czynnikiem etiologicznym jest wirus białaczki bydła (*Bovine leukemia virus*-BLV) zaliczany do rodziny *Retroviridae*, klasyfikowany razem z wirusem HTLV (*Human T-Cell Leukemia Virus*) w tzw. grupie HTLV-BLV. Walka z chorobą polega na możliwie wczesnym wykryciu zakażonych zwierząt i wyeliminowaniu ich z hodowli. Stąd straty spowodowane

Adres do korespondencji

Jacek Kuźmak,
Zakład Biochemii,
Państwowy Instytut
Weterynaryjny,
Al. Partyzantów 57,
24-100 Puławy;
e-mail:
jkuzmak@piwet.pulawy.pl

biotechnologia

1 (60) 74–83 2003

wane ebb są ogromne zważywszy, że zakażenia dotyczą często krów najbardziej cennych pod względem użytkowym i genetycznym. Stosowanie programów zwalczania EBB spowodowało, że jej występowanie, głównie w krajach europejskich jest minimalne, jakkolwiek problemem jest likwidacja istniejących zakażeń wirusem BLV. Badania nad występowaniem EBB w Polsce wskazują na nadal znaczne rozprzestrzenienie zakażeń, obejmujące 10-70% pogłównia, zwłaszcza na terenach zachodniej i północnej Polski.

W pracy omówiono niektóre zastosowania biotechnologii wykorzystywane w diagnostyce zakażeń BLV i próbach profilaktyki swoistej oraz związane z możliwościami uzyskania zwierząt opornych na zakażenie tym wirusem. Jednak przedstawienie tych zagadnień wymaga omówienia niektórych elementów budowy i funkcjonowania genomu BLV oraz patogenezę wywoływanych przez niego zakażeń.

2. Budowa i funkcjonowanie genomu BLV

W połowie lat osiemdziesiątych wyizolowano kilka izolatów terenowych, a następnie uzyskano infekcyjne klony molekularne BLV, co zapoczątkowało rozwój badań nad tym wirusem (1). Genom BLV, wielkości około 8,7 kb, podobnie jak genom wszystkich retrowirusów koduje strukturalne i enzymatyczne białka z genów *gag*, *pro*, *pol* i *env*. Gen *gag* koduje trzy białka p15, p24 i p12 biorące udział w budowie kapsydu wirusa. Białka te powstają w wyniku ekspresji genomowego RNA i tworzą tzw. antygen grupowoswoisty. Gen *pol* koduje dwa białka o swoistej aktywności enzymatycznej: zależną od RNA polimerazę DNA (odwrotną transkryptazę), która bierze udział w transkrypcji wirusowego RNA na DNA, który w formie tzw. prowirusa zostaje zintegrowany z genomem komórki gospodarza. Enzymem, który bierze udział w tej integracji jest drugie białko, integraza. Gen *pro* koduje proteazę, biorącą udział w obróbce potranslacyjnej białkowych prekursorów (p45 i p175) produktów ekspresji genów *gag* i *pol*. Produktem ekspresji genu *env*, który syntetyzowany jest na bazie subgenomowego RNA, są dwa białka: glikoproteiny gp51 i gp30. Pierwsze z nich jest podstawowym białkiem otoczki wirusa odpowiedzialnym za rozpoznanie receptorów na powierzchni komórki i wspólnie z gp30 tworzy kompleks warunkujący infekcyjność wirusa *in vivo*. Genom BLV koduje ponadto co najmniej cztery białka regulacyjne: Tax, Rex, RIII i GIV z których najważniejsze dla replikacji wirusa są Tax i Rex, odpowiedzialne za wzmaganie ekspresji genów BLV kierowanej przez promotor zlokalizowany w LTR 5' oraz za potranskrypcyjną kontrolę ekspresji BLV. W zakażonych komórkach, w krótkim okresie po zakażeniu obserwuje się obniżoną aktywność transkrypcyjną dotyczącą przede wszystkim mRNA genów *Tax* i *Rex* i jej całkowity zanik w odniesieniu do mRNA genów strukturalnych. Niemożliwe jest również wykazanie obecności kompletnych wirionów czy syntezy białek wirusowych. Jest to stan latencji, któremu towarzyszy permanentne blokowanie syntezy mRNA genów strukturalnych wirusa przy stałej obecności prowirusowego DNA,

zintegrowanego z genomem komórki. Wykazano, że proces blokowania transkrypcji prowirusa zależny jest od konstytutywnych czynników obecnych w osoczu krwi zakażonych zwierząt. Czynniki te, określane jako PBB (*plasma BLV blocking factor*) obecne są w osoczu krwi zwierząt zakażonych BLV (2). Pomimo badań w tym kierunku ciągle nieznana jest natura czynników blokujących. Niektóre dane mogą wskazywać, że są to związki podobne do interleukin lub są nimi produkty ekspresji genów kodujących zespół antygenów zgodności tkankowej (BoLA).

Do niedawna sądzono, że wirus BLV po zintegrowaniu z genomem gospodarza jest całkowicie uśpiony. Argumentem dla tego rodzaju wniosków była m.in. niemożność stwierdzenia obecności białek wirusowych w zakażonych komórkach. Zastosowanie bardzo czułych metod, jak np. RT-PCR w połączeniu z sondami molekularnymi umożliwiło jednak wykazanie *in vivo* obecności transkryptu BLV w bardzo niewielkiej liczbie limfocytów krwi. Przy zastosowaniu metod immunocytochemicznych i przeciwciał monoklonalnych wykazano także ograniczoną ekspresję białek BLV w limfocytach B krwi obwodowej oraz w monocytach z obwodowych węzłów chłonnych. Wykazanie ograniczonej replikacji wirusa BLV *in vivo* było potwierdzeniem wcześniejszych przypuszczeń, gdyż w przeciwnym przypadku trudno byłoby wyjaśnić fenomen stałej obecności przeciwciał dla BLV w przebiegu zakażenia. Według Heeney i wsp. (3) ekspresja BLV w komórkach obwodowych tkanek limfatycznych ma charakter okresowych epizodów, co tłumaczyłoby zjawisko okresowego zanikania przeciwciał w surowicy krwi w przebiegu zakażenia. Ekspresja taka, z restrykcją do określonej populacji komórek, jest jednak wystarczająca do stymulowania produkcji przeciwciał, a monocyty są populacją komórek, które funkcjonują jako komórki prezentujące antygen i odpowiedzialne są za utrzymywanie replikacji wirusa na niskim poziomie.

Spektrum zakaźności BLV w odniesieniu do różnych typów komórek jest dosyć szerokie i uwzględnia monocyty, makrofagi, komórki epitelialne, jakkolwiek w przebiegu choroby obserwuje się głównie proliferację limfocytów B o fenotypie CD5+. Zmiany nowotworowe o charakterze guzowatym dotyczą tylko niewielkiego odsetka zakażonego bydła (około 10%), jednak większość wykazuje objawy wysokiej limfocytozy. Dotychczas mało poznane są mechanizmy molekularne i komórkowe doprowadzające do niekontrolowanego rozplemu limfocytów B. Ostatnio w uzyskanych danych wskazuje się na udział białek regulacyjnych BLV rozregulowujących mechanizmy kontrolujące podział komórki oraz znaczącą rolę niektórych cytokin (IFN, IL-10, IL-6), zwłaszcza w rozwoju przewlekłej limfocytozy.

3. Opracowanie i doskonalenie testów diagnostycznych

Przełomem w badaniach nad opracowaniem nowych testów w diagnostyce EBB było wyizolowanie w 1969 r. wirusa białaczki bydła i otrzymanie na początku lat siedemdziesiątych linii komórek nerki płodu owczego, kokulturowanych limfocytami

krowy białaczkowej (komórki FLK-BLV) (4). Linia ta jest obecnie najczęściej wykorzystywana do uzyskiwania wirusa korpuskularnego jak i jego białek. Konsekwencją użycia wirusa BLV jako antygeny było opracowanie szeregu testów diagnostycznych, głównie typu ELISA, powszechnie akceptowanych i stosowanych w diagnostyce serologicznej EBB. Mankamentem takich testów było częste występowanie reakcji nieswoistych, generowanych przez białka surowicy cielęcej dodawane jako składnik podłoża hodowlanego w hodowli komórek FLK-BLV. Użycie monoklonalnych przeciwciał (Mabs) skierowanych przeciw epitopom na białku gp51 znacznie ograniczyło występowanie tego typu reakcji. Pośród ośmiu obecnych epitopów, trzy określane jako F, G, H mają zdolność neutralizowania wirusa i są najczęściej wykorzystywane do immobilizacji antygenów BLV w tzw. *immuncapture* ELISA (5). Drugą możliwością wykorzystania Mabs jest ich bezpośrednie znakowanie enzymem, zwykle peroksydazą i użycie w testach określanym jako *competition* ELISA. Testy te, bez konieczności stosowania gatunkowo swoistych koniugatów, cechuje duża czułość i wyjątkowo wysoka swoistość. Ostatnia generacja testów ELISA uwzględnia wykorzystanie podwójnych Mabs, skierowanych przeciw epitopom białka gp51 oraz przeciw bydłęcym immunoglobulinom klasy IgG1. Te ostatnie po znakowaniu enzymem stanowią wyjątkowo swoisty koniugat.

Częste kłopoty z prowadzeniem linii FLK oraz potrzeba uzyskiwania dużych ilości czystych białek antygenowych zmusiły niektórych badaczy do badań nad uzyskaniem białek rekombinowanych BLV. Zwykle były to białka rdzenia lub otoczki wirusa, będące produktami ekspresji genów *env* i *gag*, mające charakter białek fuzyjnych, syntetyzowanych przez komórki *E. coli* (6-8). Nie znalazły one jednak szerszego zastosowania, nie licząc kilku prac potwierdzających ich przydatność w metodzie *Western blot*, proponowanej przez niektórych autorów jako potwierdzający test serologiczny dla EBB. Wiąże się to z faktem, że w warunkach denaturujących towarzyszących SDS-PAGE epitopy F, G, H na białku gp51, będące epitopami konformacyjnymi, ulegają destrukcji.

Stosowanie metod serologicznych nie wyczerpuje możliwości diagnostyki EBB. Biorąc pod uwagę wybitnie latentny przebieg zakażenia BLV podstawowego znaczenia nabiera wykrywanie prowirusowego DNA. W pierwszym okresie przydatne w tym zakresie okazały się metody hybrydyzacji DNA wykorzystujące różne fragmenty prowirusowego DNA-BLV służące, po znakowaniu izotopem fosforu P^{32} , jako sonda do hybrydyzacji typu *Southern* (9). Jednak długotrwała procedura i konieczność pracy z izotopami wyeliminowały te metody jako możliwe do zaakceptowania w diagnostyce. Nowe możliwości stworzyła natomiast metoda PCR. Do tej pory opisano liczne modyfikacje tej metody w odniesieniu do wykrywania DNA-BLV uwzględniające pojedynczą amplifikację, *nested* PCR, *semi-nested* PCR oraz RT-PCR (10). Stosowano primery pozwalające na amplifikację fragmentów zlokalizowanych w różnych regionach genomu BLV, jednak najczęściej wybierano te z obszaru genu *env*. Wiąże się to z faktem wysokiej konserwatywności genu *env* wynikającej z lokalizacji sekwencji kodujących epitopy na białku otoczki, istotne dla replikacji i infekcyjności wirusa.

Ciekawą modyfikacją jest możliwość ilościowej oceny produktów amplifikacji prowirusowego DNA, możliwa przez zastosowanie metody PCR-ELISA (11). W celu podwyższenia swoistości i czułości amplifikacji, co jest pewnym mankamentem techniki PCR, zwłaszcza w odniesieniu do badania materiału terenowego, stosowane są różne sondy molekularne, w których najczęściej stosuje się znakowanie digoksygeniną lub biotyną (12).

Z diagnostycznego punktu widzenia istotna jest ocena czułości techniki PCR. Z badań Kettmanna i wsp. (13) wynika, że w limfocytach krwi obwodowej BLV-DNA pozostaje zintegrowany w niewielkiej liczbie kopii, od 1-4 na diploidalny genom, i że można wykazać go w 25-40% komórek. Wykazano również, że u zwierząt z aleukemiczną formą białaczki jedynie w 0,01% limfocytów możliwe jest wykazanie obecności prowirusa. Zrozumiałe jest, że przy tak niskiej częstotliwości występowania prowirusa, możliwość jego wykrywania w pojedynczych komórkach musi być brana pod uwagę jako kryterium wykorzystania PCR w diagnostyce zakażeń wirusem BLV. Taka możliwość metody PCR została wykazana przez licznych badaczy, którzy potwierdzili obecność DNA-BLV już przy amplifikacji 1 pg genomowego DNA (14,15). Jacobs i wsp. (16) oraz Eaves i wsp. (17) w badaniach przeprowadzonych na materiale izolowanym od bydła naturalnie zakażonego BLV wykazali, że metodą PCR można wykryć od 7,2-15,4% więcej zakażonych zwierząt niż byłoby to możliwe przy zastosowaniu metod serologicznych, co określać może zasięg występowania zakażeń latentnych. Nie zawsze jednak występowanie odczynów serologicznych koreluje z obecnością prowirusowego DNA. Cockerell i wsp. (18) oraz Miller i wsp. (19) wykazali, że pula limfocytów krwi bydła w których występuje ekspresja białek wirusowych zwierza milion razy więcej prowirusa, niż limfocyty w których brak jest ekspresji białek BLV. Dlatego niepowodzenie w wykrywaniu prowirusa u zwierząt serologicznie dodatnich można odnieść do niewystarczającej liczby kopii DNA-BLV, dostępnych w metodzie PCR. Według Jacobsa i wsp. (16), co najmniej dwie inne przyczyny mogą być brane pod uwagę przy interpretacji różnic pomiędzy występowaniem swoistych przeciwciał i brakiem prowirusowego DNA. Jedną z nich może być brak prowirusa w limfocytach krwi obwodowej, a jego obecność ograniczająca się do narządów limfatycznych. Heeney i wsp. (3) wykazali częste występowanie prowirusa w komórkach węzłów chłonnych zakażonych zwierząt oraz ograniczoną ekspresję białek wirusowych. Komórki te mogłyby funkcjonować jako komórki prezentujące antygen, dzięki czemu możliwa jest ciągła synteza przeciwciał. Klintevall i wsp. (20) badając występowanie prowirusowego DNA w narządach zakażonych BLV cieląt wykazali obecność prowirusa w śledzionie, podczas gdy nie było to możliwe w limfocytach krwi obwodowej. Jako drugą przyczynę uwzględnia się występowanie defektywnych prowirusów. Według Willemsa i wsp. (21) stanowią one około 30% wszystkich form DNA-BLV izolowanych od zakażonych zwierząt, przy czym delecja, podobnie jak w przypadku wirusa HTLV-1 dotyczy najczęściej końca 5' genomu. Ponieważ w tym końcu zlokalizowane są także sekwencje regulacyjne dla genów strukturalnych wirusa, trudno jest ocenić na ile możliwa jest synteza białek BLV i indukcja odpowiedzi immunologicznej.

4. Próby immunoprofilaktyki swoistej przeciw BLV

Podjęcie badań nad opracowaniem swoistej szczepionki przeciw BLV wynikało z potrzeby zastosowania jej na terenach, gdzie zakażenia BLV występują u znacznej liczby zwierząt w celu ograniczenia siewstwa wirusa, a także z potrzeby rozwinięcia modelu biologicznego przydatnego do analogicznych badań nad wirusem HTLV-I u ludzi. Podkreślić należy, że większość tych badań wykonano przy użyciu owiec, które ze względu na wysoką wrażliwość na zakażenie BLV i możliwość długotrwałych obserwacji są dogodnym modelem biologicznym.

Pierwsze próby uzyskania szczepionki miały na celu indukcję syntezy przeciwciał neutralizujących wirus, skierowanych głównie przeciw glikoproteinie gp51. Jako immunogen wykorzystano inaktywowane formaliną lub promieniami UV wiriony uzyskane z linii komórkowej FLK, zakażonej BLV oraz wiriony poddane lizie detergentem Triton X-100, podawane z kompletnym adiuwantem Freund'a lub adiuwantem olejowym (22,23). We wszystkich tych przypadkach uzyskano odpowiednio wysokie miano przeciwciał, wystarczające do zapewnienia trwającej przez kilka miesięcy odporności, po czelendżu infekcyjnymi cząstkami wirusa. Na podkreślenie zasługują analogiczne prace prowadzone w Polsce w których wykazano, że czelendź dawką wirusa w postaci $2,5 \times 10^6$ komórek FLK powodował przełamanie odporności po immunizacji owiec przy użyciu wirusa atenuowanego promieniami UV (24). Nie wykluczało to jednak faktu, że w warunkach terenowych szczepionka taka może zapobiegać siewstwu wirusa.

Próby zastosowania immunogenów nie wirusowych polegające na inokulacji zakażonych komórek miały na celu pobudzenie mechanizmów odporności komórkowej, głównie cytotoksycznych limfocytów T, skierowanych przeciw antygenom na powierzchni zakażonych komórek. Wymienić tu należy zastosowanie fibroblastów owczych transformowanych BLV (linia SF-28) (25), uodparnianie za pomocą komórek owczych NP-2 transfekowanych materiałem genetycznym BLV (26), czy też użycie fibroblastów mysich (komórki 3T3) transfekowanych plazmidem zawierającym gen *env* wirusa BLV (27). We wszystkich tych przypadkach komórki użyte do immunizacji powodowały długotrwałą obecność przeciwciał neutralizujących i okresową odporność komórkową, jednak mankamentem był brak możliwości odróżnienia zwierząt szczepionych od naturalnie zakażonych na podstawie testów wykrywających przeciwciała przeciw glikoproteinie gp51. Dlatego na uwagę zasługuje zastosowanie komórek limfoblastoidalnych BL-3 pochodzących od krwi chorej na białaczkę sporadyczną, w przypadku której wykluczono wirusową etiologię. Jednak odporność uzyskana u cieląt immunizowanych komórkami BL-3 z dodatkiem wodorotlenku glinu, jako adiuwantu, była słaba i krótkotrwała (28). Użycie adiuwantów może w istotny sposób modulować immunogenne właściwości wirusa BLV. Przykładem jest zastosowanie ISCOM, preparatu zawierającego glikozyd Quail A, który za pomocą regionów dostępnych dla hydrofobowych domen białek wirusowych ułatwia tworzenie kompleksów z tymi białkami. Zastosowanie ISCOM do prezentacji antygeny gp51 wyka-

zało istotnie większą odpowiedź immunologiczną niż podawanie samego białka (29).

Rozwój metod inżynierii genetycznej umożliwił rozwój nowych strategii w opracowywaniu szczepionek przeciw zakażeniom wirusem BLV. Przede wszystkim pojawiła się możliwość operowania poszczególnymi białkami wirusa, a nie kompletnymi wirionami czy zakażonymi komórkami, co wiązało się z niebezpieczeństwem wprowadzenia do organizmu genów czy też produktów białkowych odpowiedzialnych za proces leukemogenezy. W badaniach tych, ze zrozumiałych względów, koncentrowano się na genie *env* BLV i produktach jego ekspresji, tj. glikoproteidach gp 51 i gp 30. Największe znaczenie miały tu próby z klonowaniem genu *env* do wektora wirusa krowianki i wykorzystania takiego konstruktów w postaci rekombinowanego wirusa (30). Po podaniu immunizowanym owcom wirusa BLV w postaci krwi zakażonych zwierząt jedynie osobniki immunizowane kompletnym produktem ekspresji genu *env*, a nie jego podjednostkami (gp 51 lub gp30) uzyskały odporność. Badania z wykorzystaniem rekombinantów użytych do immunizacji oraz syntetycznych peptydów pozwoliły na precyzyjne zlokalizowanie epitopów warunkujących działanie limfocytów CD4 i CD8. Potwierdzono w nich możliwość całkowitej eliminacji wirusa niezależnie od obecności przeciwciał neutralizujących (30). Celem kolejnych doświadczeń było uzyskanie szczepionki w oparciu na mutantach całego wirusa, które będąc infekcyjne i immunogenne, pozbawione były patogennego potencjału. Przykładem może być skonstruowanie zdolnego do replikacji *in vivo* mutantu BLV pozbawionego genów regulatorowych (*Tax i Rex*), w którym ekspresja genów kodujących białka immunogenne jest pod kontrolą promotora mysiego wirusa martwicy nerek (31). Wielce obiecujące są wyniki stosowania szczepionki skonstruowanej na bazie infekcyjnego klonu molekularnego w którym, poprzez mutacje w regionie R3 i R4 bądź mutacje polegające na zmianie sekwencji kodującej motyw prolinowy białka gp30, unieczynniono patogenne działanie prowirusowego DNA przy zachowanej infekcyjności (32,33). Na wspomnienie zasługuje koncepcja zastosowania szczepionki „terapeutycznej” polegająca na immunizacji zwierząt wirusem krowianki, zawierającym gen *tax* (34). Proces taki powodowałby aktywację replikacji wirusa w zakażonych komórkach. W efekcie prowadziłoby to do zwiększonej ekspresji białek wirusowych na powierzchni komórek i ich lepszej prezentacji dla komórek układu immunologicznego.

5. Selekcja zwierząt naturalnie opornych na zakażenie BLV

W wieloletnich obserwacjach różnych ras bydła wykazano, że pomimo faktu endemicznego występowania białaczki w stadzie część osobników pozostaje oporna na zakażenie i rozwój choroby, co może mieć związek z genetycznie uwarunkowaną opornością. Wysiłki w tym zakresie koncentrowały się na określeniu związku pomiędzy wrażliwością na zakażenie wirusem, a także skłonnością do występowania

przewlekłej limfocytozy z występowaniem genów kodujących antygeny głównego układu zgodności tkankowej (MHC), określonych u bydła jako układ BoLA. Podobnie jak MHC, układ BoLA dzieli się na dwa regiony, BoLA-A i BoLA-D, kodujące białka antygenowe klasy I i II. Region BoLA-D obejmuje pojedyncze geny DOB i DRA, trzy lub więcej genów DRB i zmienną liczbę genów DQC (35). Geny regionu BoLA-D wykazują duży polimorfizm, stąd komórki jednego osobnika mogą wytwarzać, zależnie od dziedziczenia alleli, dużą liczbę antygenów klasy II.

Badania nad występowaniem alleli związanych z większą opornością na zakażenie BLV wykazały, że obecność allelu kodującego antygen W8.1 była istotnie ($p < 0,001$) negatywnie sprzężona z występowaniem przeciwciał dla białka gp51, podczas gdy występowanie allelu W12.1 łączyło się istotnie z serokonwersją u tych zwierząt. Dodatkowo odczyny serologiczne u krów z obecnością antygeny W8.1 notowane były tylko u 24%, podczas gdy swoiste przeciwciała u krów z antygenem W12.1. obserwowano aż u 97% zwierząt. Wykazano także, że serokonwersja u osobników posiadających antygen W8.1 wystąpiła średnio 6 miesięcy później, niż u krów z innym genotypem BoLA. W wyjaśnieniu roli allelu W8.1 w większej oporności na zakażenie BLV prawdopodobne, jak się wydaje, jest przyjęcie założenia odnoszącego występowanie antygeny W8.1 z blokowaniem replikacji wirusa BLV na poziomie transkrypcji prowirusowego DNA. Wykazano, że w osoczu krwi i chłonki zakażonych zwierząt znajdują się czynniki blokujące transkrypcję BLV, i że mogą nimi być produkty ekspresji genów związanych z układem BoLA (36).

W przeprowadzonych podobnych badaniach wykazano, że oporność na wystąpienie przewlekłej limfocytozy u bydła rasy Holstein związana jest z występowaniem alleli kodujących antygeny DRB3.2*11, *23 i *28 (37). Wyniki te zostały potwierdzone w późniejszych badaniach przeprowadzonych przez Sulimow i wsp. (38) oraz Zannottiego i wsp. (39) na krowach rasy Black Pied. W dalszych badaniach usiłowano wyjaśnić molekularne podłoże opisanej zależności. Analiza struktury pierwszorzędowej cząsteczki DRB3.2, wydedukowanej z sekwencji nukleotydowej egzonu 2 genu DRB3.2 wykazała, że wszystkie antygeny kodowane przez allele związane z opornością na PL posiadały motyw ER (glutamina-arginina) w pozycji 70-71 łańcucha β białek klasy II. Ponieważ aminokwasy te mogą być częścią miejsca wiązania obcych antygenów (glikoproteidy otoczki wirusa BLV) przez białka klasy II przyjęto, że obecność tych właśnie aminokwasów umożliwia prezentację białek wirusowych limfocytom T i wyzwala mechanizmy komórkowe (cytotoksyczne limfocyty T, ADCC) prowadzące do destrukcji komórek zakażonych wirusem BLV. Trudno przeceniać rolę takich badań w selekcjonowaniu zwierząt opornych na zakażenie BLV czy też rozwój formy PL białaczki. Ponieważ jednak 70% osobników z formą PL rozwija formę guzową białaczki, oznaczanie markerów genetycznych warunkujących wysokie ryzyko wystąpienia formy PL może mieć znaczenie prognostyczne w zwalczaniu EBB.

Nowy, obiecujący krok w kierunku uzyskania zwierząt opornych na zakażenie BLV związany jest z możliwością uzyskiwania zwierząt transgenicznych. Rozważa się możliwość wprowadzenia, jako transgeny, rybozymy specyficznie ukierunkowa-

nego na sekwencję *tax/rex* wirusowego mRNA, odgrywającą podstawową rolę w replikacji wirusa BLV. Aktywność katalityczną takiego rybozomu, którego ekspresja regulowana była przez promotor wirusa RSV, potwierdzono w zakażonych BLV komórkach płuc nietoperza w których zanotowano obniżenie aktywności odwrotnej transkryptazy o 90% (40). Sukcesem zakończyły się także próby uzyskania pokolenia królików transgenicznych, w komórkach których potwierdzono obecność sekwencji rybozomu (41). Nieznana jest jednak ochronna wartość ekspresji rybozomu w warunkach doświadczalnego zakażenia BLV.

W świetle tych wyników można przyjąć, że oporność na rozwój zakażenia BLV, jak i wystąpienie przewlekłej limfocytozy związane jest z obecnością określonego układu BoLA. Prowadzone badania powinny zmierzać w kierunku możliwości identyfikacji i selekcji buhajów wykorzystywanych do rozrodu, posiadających odpowiedni układ BoLA.

Literatura

1. Sagata N., Yasunaga T., Ogawa Y., Tsusuku-Kawamura J., Ykawa Y., (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4741-4750.
2. Gupta P., Ferrer J. F., (1982), Science, 215, 405-407.
3. Heeney J. L., Valli P. J., Jacobs R., Valli V. E., (1992), Lab. Invest., 66, 608-613.
4. Miller J., Miller L., Olson C., Gillette K., (1969), J. Natl. Cancer Inst., 43,1297-1305.
5. Portetelle D., Bruck D., Burny A., Dekegel D., (1978), Ann. Res. Vet., 9, 667-674.
6. Urlich R., Siakkou H., Platzer C., Bossmann H., Mohring R., Wiedmann M., Bahring S., Rosenthal S., (1990), Arch. Exper. Vet. Med., 44, 909-916.
7. Zajac V., Slavikova K., (1989), Folia Biologica, 35, 35-41.
8. Bicka L., Kuzmak J., Kozaczynska B., Plucienniczak A., Skorupska A., (2001), Acta Biochemica Pol., 48, 227-232.
9. Kettmann R., Dechamps J., Cleuter Y., Couez D., Burny A., Marbaix G., (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2465-2469.
10. Belak S., Ballagi-Pordany A., (1993), Vet. Res. Com., 17, 55-72.
11. Rola M., Kuzmak J., (2001), J. Virol. Methods, 99, 33-40.
12. Naif H., Daniel C., Cogle W., Lavin M., (1992), J. Clin. Microbiol., 30, 675-679.
13. Kettmann R., Portetelle D., Mammerickx M., Cleuter Y., Dekegel D., Galoux M., Ghysdael J., Burny A., Chantrenne H., (1976), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1014-1019.
14. Naif H., Brandon R., Daniel R., Lavin M., (1990), Vet. Microbiol., 25, 117-122.
15. Brandon R., Naif H., (1991), Res. Vet. Sci., 50, 89-94.
16. Jacobs R., Song Z., Poon H., Heeney J., Taylor A., Jefferson B., Vernau W., Valli V., (1992), Can. J. Vet. Res., 56, 339-343.
17. Eaves F., Molly J., Dimmock C., Eaves L., (1994), Vet. Microbiol., 39, 313-320.
18. Cockerell G., Rovnak J., (1988), Leukemia Res., 12, 465-469.
19. Miller L., Miller J., van der Maaten M., Schmerr M., (1985), Am. J. Vet. Res., 46, 808-814.
20. Klintevall K., Ballagi-Pordany A., Naslund K., Belak S., (1994), Vet. Microbiol., 42, 191-196.
21. Willems L., Kerkofs P., Burny A., Mammerickx M., Kettmann R., (1995), Virology, 206, 769-775.
22. Kono Y., Arai K., Sentsui H., Matsukawa S., Itoharu S., (1986), Jpn. J. Vet. Sci., 48, 117-124.
23. Patrascu I. V., Goman S., Sandu I., Stiube P., Munteanu I., Coman T., Ionescu M., Popescu D., Mikalescu D., (1980), Rev. Roum. Med.-Virol., 95-102.
24. Grundboeck M., Buzala E., Szczotka M., (1992), Bull. Vet. Inst. Pulawy, 36, 8-12.

25. Onuma M., Hodatsu T., Yamamoto S., Higashihara M., Masu S., Mikami T., Izawa H., (1984), *Am. J. Vet. Res.*, 45, 1212-1220.
26. Altaner C., Ban J., Altanero V., Janik V., (1991), *Vaccine*, 9, 889-895.
27. Rułka J., Szczotka M., Buzala E., (1995), *Rocz. Wojsk. Inst. Hig. Epid.*, 32, 75-82.
28. Theilen G., Miller J., Higgins J., Rupanner R., Garret W., (1982), *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.*, 15, 547-554.
29. Merza M., Linne T., Høglund S., Portetelle D., Burny A., Morein B., (1989), *Vaccine*, 7, 22-31.
30. Gatei M., Naif H., Kumar S., Boyle D., Daniel R., Good M., Lavin M., (1993), *J. Virol.*, 67, 1803-1810.
31. Temin H., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 4419-4424.
32. Reichert M., Cantor G. H., Willems L., Kettmann R., (2000), *J. Gen. Virol.*, 81, 965-969.
33. Reichert M., Winnicka A., Willems L., Kettmann R., Cantor G. H., (2001), *J. Virology*, 75, 8082-8089.
34. Willems L., Letellier C., Gonze M., Martin R., Kettmann R., Burny A., Meulemans G., (1989), *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 22, 201-211.
35. Sitte K., East J., Lewin H., Jazwinska E., (1995), *Anim. Gen.*, 26, 413-417.
36. Lewin H., Wu M., Stewart J., Nolan T., (1988), *Immunogenetics*, 27, 338-344.
37. Xu M., Eijk M., Park C., Lewin H., (1993), *J. Immunol.*, 151, 6977-6985.
38. Sulimowa G. E., Udina I. G., Szajchajew G. O., Zacharow I. A., (1995), *Gienetyka*, 31, 1294-1299.
39. Zanutti M., Poli G., Ponti W., Polli M., Rocchi M., Bolzani E., Longeri M., Russo S., Lewin H., Eijk M., (1996), *Anim. Gen.*, 27, 337-341.
40. Cantor G. H., McElvain T., Birkebak T. A., Palmer G., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10932-1036.
41. Rola M., Kuźmak J., Jura J., Bicka L., Skrzyszowska M., Gajda B., Smorąg Z., Cantor G. H., (2002), *Bull. Inst. Vet. Puławy* (w druku).