

אפיון מולקולארי של זני נגיף הלוקמיה בבקר בישראל ושל המרקרים הביולוגיים הייחודיים למחלה בבקר לצורך פיתוח שיטות אבחון וטיפול כנגד זנים המקושרים לרמות חומרה שונות של המחלה.

Molecular characterization of Bovine Leukemia Virus strains in Israel and the specific biological markers of the disease in cattle for the development of diagnosis methods and treatments against BLV strains associated to different levels of the disease.

שמות השותפים במחקר

א. חוקר ראשי – דר' אלעד אליהו, מכון וטרינרי ע"ש קימרון.

כתובת דוא"ל: elade@moag.gov.il, טלפון: 054-4772299.

ב. דר' ינון קרמר, החקלאית

כתובת דוא"ל: kremer@hak.il, טלפון: 052-2851377

תקציר

נגיף לוקמיה בבקר הינו נגיף דלתא-רטרווירוס הגורם למחלת הלאוקוזיס בבקר. לרוב, הבקר הנגוע יהיה נשא של הנגיף ללא סימנים קליניים. אך, בכ-30% מבעלי החיים הנגועים המחלה עלולה להחמיר למחלה בעלת מופע של לאוקוציטוזיס כרוני ובכ-5% ללימפומה ממארת ולמוות. בעקבות תופעות אלו נזק כלכלי כבד יכול להיגרם לרפתן ולבוקר ולכן יש חשיבות לפיתוח שיטות להערכה מוקדמת של הסבירות להחמרה במחלה, גם בהיעדר סימנים קליניים מוקדמים. זיהוי זני הנגיף (גנוטיפ) מתבצע לרוב על פי מקטע בגן לחלבון המעטפת (env). בנוסף, ניתן לבצע זיהוי של הזן על פי הגן ρ המקודד לחלבון קובע האלימות Tax. שינויים ספציפיים בחלבון ה-Tax נמצאו באסוציאציה לאלימות הנגיף, לעומס הפרוויורוס ולהחמרה במחלה. הערכה בישראל על סמך סקר קודם, היא שהנגיף נמצא בכ-40-50% מהמשקים ובממוצע כ-5% מהפרות שנבדקו היו נשאיות של הנגיף. כיום, עיקר האבחון הנעשה בישראל הוא בשיטות סרולוגיות ומולקולאריות שאינן מבחינות בין זנים ותתי-זנים של הנגיף ובעומס הפרוויורוס בבעל החיים הנגוע. כתוצאה מכך, עד כה לא קיים מידע על אילו זנים קיימים בישראל, מהם תתי-הזנים הקשורים לעלייה בתדירות התחלואה במשקים נגועים ובדיקות של רקמות תלויות באבחון מולקולארי נפרד. בנוסף, אין מידע

על התפלגות הפולימורפיזם הגנטי של חלבון קובע האלימות TAX בישראל. כמו-כן, העומס הנגיפי של הפרוורוס בפרות המודבקות או השינויים במרקרים של מערכת החיסון לא נבדקים ולא מתבצעות כיום הערכות על מצב הפרות המודבקות או על הסבירות להתפרצות של תחלואה של לאוקוציטוזיס או של לימפומה במשקים הנגועים.

בעבודה זו נעשתה בדיקה מפורטת של ריצוף המקטע לגן לחלבון המעטפת ולגן לחלבון Tax מכ-169 דוגמאות שנאספו בשנים 2015-2024. בדגש על איסוף מסודר של הדוגמאות בשנים 2023-2024. תוצאות האבחון הראו שעל פי רצפי env הגנוטיפ הדומיננטי הינו גנוטיפ 4 עם קרבה פילוגנטית לבידודים מרוסיה ומפולין, כאשר כ-13% מרצפי ה-env נמצאו קרובים לגנוטיפ 6 שמקורו מהמזרח הרחוק. באופן מסקרן, רצפי הגן ל-Tax מהדוגמאות שנבדקו נמצאו כולם בקרבה לגנוטיפ 4 בלבד, גם בדוגמאות בהם רצף ה-env נמצא בקרבה לגנוטיפ 6, ממצא שיכול להעיד על אפשרות לאירוע רקומבינציה בין הזנים ליצירת תת זן מקומי. בנוסף, זוהו ארבעה וריאנטים עיקריים של החלבון TAX, כאשר מוטציה ספציפית, Y257C, נמצאה באסוציאציה לדוגמאות מפרות שהראו סימנים קליניים והחמרה במחלה. ארבעת וריאנטים אלו שובטו לפלסמידי ביטוי תחת פרומוטור כללי לביטוי בתאי יונקים, וביטוי שלהם עם תג 6xHis-tag, זוהו בתאי בקר מסוג MDBK. לאור מידע מדעי המראה קשר בין מוטציה Y257C לעומס הפרוורוס ועלייה בסבירות להחמרה במחלה, נבחר המקטע הכולל את הקודון לחומצה האמינו בעמדה זו לפיתוח שיטת אבחון מבוססת real-time PCR לזיהוי פולימורפיזם (SNP) המקושר לוריאנטים בעלי אלימות שונה של Tax.

תוצאות עבודה זו מניחות את היסודות למחקרי המשך לאפיון האינטראקציות של חלבון Tax לחלבוני המאכסן בזמן הדבקה, ופיתוח שיטות לא פולשניות לזיהוי וריאנטים המקושרים להבדלי אלימות של הנגיף בזמן הדבקה וכן למרקרים של המאכסן שרמתם משתנה בעקבות הדבקה בזנים השונים. פיתוח שיטות אלו וסטנדרטיזציה של בדיקות אלו בהתאמה לוריאנטים השונים שזוהו, יכולים לשמש ככלי חשוב של הוטרינר והמגדל להערכת הסבירות להחמרה במחלה בבעל החיים הנגוע ולהיערכות מתאימה על פי הערכה זו.

סיכום תוצאות המחקר

רקע

נגיף לוקמיה בבקר (Bovine Leukemia Virus – BLV), הינו נגיף דלתא-רטרווירוס ממשפחת הרטרווירודאה הגורם למחלה עיקשת בבקר בעלת טווח רחב של תסמינים (Enzootic Bovine Leukosis - EBL) [1]. רוב הפרות הנגועות (כ-70%), לא יפגינו תסמינים קליניים אך יהיו נשאות של הנגיף (aleukemic stage) [2, 3]. מצב נשאות נרחב זה, המלווה בהפרשה מרובה של הנגיף לסביבה, מקשה מאוד על היכולת למנוע את התפשטות הנגיף במשק הנגוע [4]. כ-30% מהפרות הנגועות יפגינו מופע של לאוקוציטוזיס כרוני מסוג לימפוציטוזיס (Persistent Lymphocytosis) המאופיין בלימפומה שאינה ממארת בעגלות מעל גיל 3. לרוב, המחלה אסימפטומטית אך מראה עלייה בספירת כדוריות הדם הלבנות ורגישות לזיהומים משניים ועלולה להתפתח ללימפומה ממארת. כמו-כן, עד כ-5% מהפרות יפתחו בשלבים מתקדמים לימפומה ממארת רב מוקדית ותמותה תוך מספר שבועות מרגע הופעת הסימנים הקליניים [5].

גנום הנגיף האקסוגני מורכב משני עותקים של RNA חד גדילי הכולל ארבעה גנים לחלבונים המבניים (env, pro, pol, gag), גן לחלבונים הלא-מבניים (pX) ושני אזורים לא מקודדים החיוניים להשתלבות הנגיף בגנום המאכסן ולרפליקציה של הנגיף (5'LTR, 3'LTR) [6, 7]. הגן לחלבון env מקודד לפוליפרוטאין המבוקע לשני חלבונים גליקופרוטאינים (TM, SU) החיוניים לקישור ולחדירה של הנגיף לתאי המטרה. הגן env מאופיין בפולימורפיזם גנטי בין זנים ותתי-זנים של נגיף הלוקמיה בבקר, ולכן מקובל לבצע על פי הרצף שלו סיווגים מולקולאריים פילוגנטיים וכן קלאסיפיקציה של הזנים ותתי-הזנים של הנגיף [8].

בנגיפי דלתא-רטרווירוסים מתבטא חלבון לא-מבני ייחודי המתקבל כתוצאה מחיתוך אלטרנטיבי של הטרנסקריפט לגן pX. חלבון זה, Tax, נמצא כחיוני לביולוגיה של הנגיף ויש לו תפקיד מכריע כטרנס-אקטיבטור של שיעתוק הגנים מהפרוויורוס (provirus), להשראת התמרה סרטנית בתאים המודבקים ועיכוב התגובה החיסונית של המאכסן [9]. בדומה לגן env, גם לגן של החלבון Tax פולימורפיזם גנטי שיכול לשמש לסיווג של זנים ותתי-זנים של הנגיף. אך בנוסף, פולימורפיזם זה נמצא בקורולציה להתפתחות המחלה ולהתמרה הסרטנית בפרות החולות [10]. לדוגמא, וריאנטים H-I A של החלבון Tax נמצאו בקורולציה עם הירידה בספירת תאי דם של פרות א-סימפטומטיות ולכן הוצעו בעבר כמרקרים ללאוקוציטוזיס אסימפטומטי של פרות נשאות [11]. בנוסף לפעילותו של החלבון Tax כאונקוגן, וריאנטים של החלבון הראו טווח פעילות משתנה בהשפעתם על בקרת שיעתוק של ncRNAs בעלי פעילות בקרה על מערכת החיסון [12, 13]. כמו-כן, החלבון מעורב בשינוי ביטוי והפרשה של הורמונים ושל ציטוקינים המשפיעים על תפקוד

מערכת החיסון כגון אנקסין-1, אנקסין-3, פקטור גידול כלי דם VEGF ואינטרפרונים מסוג אלפא וגמא [14-16]. בנוסף על כך, מוטציות נקודתיות ספציפיות בחלבון Tax בתתי-זנים הנמצאים ביחידות שטח חופפות, דווחו כבעלי השפעה על תדירות התפתחות לאוקוציטוזיס ועל הוירולנטיות של המחלה בפרות [12, 17].

בסקר שבוצע בישראל ב-2005 נמצא שכ-40% מהמשקים בישראל נגועים בנגיף ובממוצע כ-5% מהפרות שנבדקו היו נשאיות של הנגיף [18]. בנוסף, בשבע השנים האחרונות הוערכה הנגיעות של הנגיף במשקים בישראל על ידי מועצת החלב שהראתה שכ-50% מהמשקים בישראל בממוצע מראים נוכחות של הנגיף ברמות נגיעות שונות.

על פי נתונים אלו ובהתייחסות להשפעה של הידבקות בנגיף על פרמטרים נוספים, כגון תמותה של פרות חולות, זיהומים משניים של פרות חיוביות ועלייה ברגישות לטפילי מעיים הוערך כי נגרם למשקים הנגועים נזק כלכלי ישיר ועקיף משמעותי. כאשר בארה"ב בשנת 2003 הוערך נזק זה בסכום של יותר מ-525 מיליון דולר לשנה [19].

כיום, עיקר האבחון הנעשה בישראל הוא בשיטה הסרולוגית של שקיעת קומפלקסים של נגיפים-נוגדנים באגר (AGID), ELISA ולעיתים בדיקה מולקולארית מבוססת real-time PCR. לשימוש בשיטות אלו חסרונות רבים: השיטות הסרולוגיות איטיות ומסורבלות, לעיתים פענוח התוצאה אינו חד משמעי והתוצאה המתקבלת אינה מייצגת את מצב התחלואה. בנוסף, השיטות אינן מבחינות בין זנים ותתי-זנים של הנגיף, מכיוון שנבדקת רק נוכחות הנוגדנים בסרום בע"ח, או בשיטה המולקולארית, נוכחות של הפרו-וירוס בדגימות ללא אבחנה בין הזנים או תתי-הזנים השונים. כתוצאה מכך, לא קיים היום מידע על אילו זנים קיימים בישראל ומהם תתי-הזנים הקשורים לעלייה בתדירות התחלואה במשקים נגועים.

לבסוף, כיום אין מידע על התפלגות הפולימורפיזם הגנטי של חלבון קובע האלימות Tax בישראל. מכיוון שגם העומס הנגיפי של הפרו-וירוס בפרות המודבקות או השינויים במרקרים של מערכת החיסון לא נבדקים, לא מתבצעות כיום הערכות על מצב הפרות המודבקות או על הסבירות להתפרצות של תחלואה של לאוקוציטוזיס או של לימפומה במשקים הנגועים.

מטרות המחקר

- א. זיהוי ואפיון מולקולארי של הזנים של נגיף לוקמיה בבקר הקיימים בארץ.
- ב. אפיון של הוריאנטים של חלבון קובע האלימות Tax הקיימים בישראל.
- ג. פיתוח שיטה מולקולארית לזיהוי של זנים ספציפיים של נגיף הלוקמיה בבקר.
- ד. זיהוי מרקרים ספציפיים של המאכסן הנמצאים במתאם לחומרת מחלת לאוקוציטוזיס.

שיטות וחומרים

דוגמאות

דוגמאות רקמה דם וסרום מהשנים 2015-2023 שאובחנו במכון הוטרינרי כחיוביים לנוכחות נגיף לוקמיה בבקר או לנוכחות נוגדנים כנגד הנגיף נאספו לצורך המחקר. בנוסף, דוגמאות חיוביות שהתקבלו במהלך שנת 2024 נאספו גם כן. סה"כ נאספו 169 דוגמאות לבדיקה על פי הפירוט בטבלה 1.

טבלה 1: סה"כ דוגמאות שנאספו בחלוקה על פי שנים.

שנה	מספר דוגמאות
2015	1
2016	9
2017	2
2018	4
2019	3
2020	7
2021	31
2022	23
2023	8
2024	58
לא ידוע	23
סה"כ	169

הכנת הדוגמאות

דוגמאות טחול חשוד רוסקו במכשיר הומוגניזציה בנוכחות בופר סוספאט (PBS) לפני הפקת חומצות גרעין. 200 מיקרוליטר של דוגמאות הטחול המרוסק, דוגמאות דם או סרום נלקחו ישירות להפקת חומצות גרעין בשימוש ברובוט הפקה מסוג IndiMeg (INDICAL BIOSCIENCE GmbH).

הגברת מקטעי DNA בשיטת PCR

הגברת מקטעי DNA של הפרווירוס בשיטת nested-PCR מהגן לחלבון המעטפת (env) או הגן המלא לחלבון Tax בוצעו בעזרת פריימרים ייעודיים על פי המפורט בטבלה 2. PCR התבצע בשימוש במיקס מסוג DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) בתוספת של 0.5 מיקרוליטר מכל פריימר ו-5 מיקרוליטר מתמצית הפקת ה-DNA בנפח סופי של 25 מיקרוליטר. תוכנית התרמוסייקלר כללה שלב ראשון של 95°C ל-1 דקה ולאחר מכן 40 סבבים של 95°C ל-30 שניות, 58°C ל-30 שניות ו-72°C ל-2 דקות ולבסוף 72°C ל-5 דקות. תוצאות ההגברה נבדקו בג'ל אגרוז.

טבלה 2: פריימרים להגברת מקטעי גנום ב-PCR לאבחון זנים ותתי-זנים ולשיבוט לפלסמידים

Name	Sequence	Gene	size	Notes
<u>PCR -env</u>				
BLV-env-F1	TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA	Env	598bp	Nested PCR
BLV-env-R1	AACAACAACCTCTGGGAAGGG			
PCR II (if needed)				
BLV-env-F2	CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT	Env	444bp	
BLV-env-R2	GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG			
<u>PCR-Tax (pX)</u>				
P7199F	TCGAAGCTTATTACCTGATAACGACA	pX	1015bp	
P8213R	TACCGGTGGGCGGTGGCGGG			
PCR II				
Tax_For	AGTTAAGCTTGCCACCATGGCAAGTGTGTTGG	pX	926bp	Full gene
Tax_Rev	GATGACCGGTGTCAAAAAGGCGGGAGAGCC			
<u>Colony PCR – pCDNA3-Tax</u>				
T7 promoter F	TAATACGACTCACTATAGGG	pX-His cloned	1023bp	Full pX gene with His-tag and restriction sites overlaps
pCDNA cloning R	CAACAGATGGCTGGCAACTA			

הפקת DNA וריצוף סאנגר

דוגמאות שבהן ההגברה הצליחה על פי בדיקה בג'ל אגרוז, הופקו בקיט GeneAll Expin™ purification kit (GeneAll manufacturers) ונשלחו לריצוף סאנגר במעבדות חי (HyLabs). תוצאות הריצוף נבדקו כנגד מאגר המידע NCBI בשיטת BLAST לצורך זיהוי הזנים הקרובים ביותר לרצף שהתקבל.

שיבוט רצפי TAX לפלסמיד ביטוי

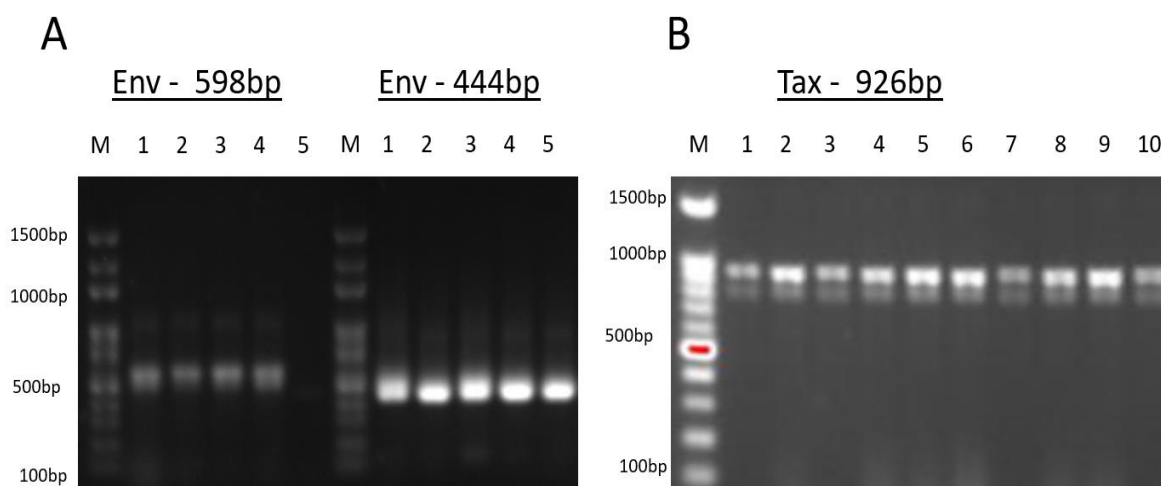
תוצאות חיוביות להגברה מלא של הגן לחלבון Tax עם קצה 5' HindIII וקצה 3' Agel נלקחו לשיבוט לפלסמיד ביטוי מסוג pCDNA3 המכיל פרומוטור מסוג CMV ואתר שיבוט במורד הזרם הכולל גם תוספת בסוף הגן לסמן חלבוני מסוג His-tag₆ (תמונה 2). הצלחת שיבוט התבצעה על ידי הגברת DNA ממושבות חיידקים החשודות כמכילות את הפלסמיד בעזרת הפריימרים T7 promoter F ו-pCDNA cloning R המתאימים לאתר השיבוט (ראה טבלה 1). מושבות חיוביות גודלו overnight ב-37°C במצע גידול LB המכיל אנטיביוטיקה מסוג אמפיצילין והופקו בעזרת הקיט Nucleospin Plasmid EasyPure kit (MACHEREY-NAGEL GmbH). הצלחת ההפקה נבדקה בג'ל אגרוז והפלסמידים נשלחו לריצוף סאנגר של אזור השיבוט במעבדות חי (HyLabs) לצורך זיהוי הצלחת השיבוט לאתר המתאים ובמסגרת הקריאה המתאימה.

תוצאות

איסוף דוגמאות ובניית מערכת להגברה וריצוף של מקטעי גנים.

על מנת להעריך את התפלגות ושכיחות הזנים של נגיף הלוקמיה בבקר בארץ, בדקנו את הדוגמאות שנאספו על ידי הגברת מקטעים מהגנים env ו-TAX. פריימרים אלו נבדקו כנגד הדוגמאות שנאספו ונמצאו מתאימים להגברת המקטעים על פי הגדלים המתוכננים לשני גני המטרה (תמונה 2).

תמונה 2: הגברת מקטעים מהגן env לחלבון המעטפת והגן pX לחלבון Tax.



דוגמאות DNA שהופקו מסרום חיובי לנגיף הלוקמיה בבקר הוגברו למקטעים מהגנים הרלוונטיים. A. מקטע בגודל 598 בסיסים מהגן לחלבון env הוגבר בעזרת זוג הפריימרים הראשון. לאחר מכן, בוצעה הגברה נוספת בשיטת nestedPCR למקטע פנימי בגודל 444 בסיסים. תוצרי ההגברה נוקו ונשלחו לאנליזת ריצוף בשיטת סאנגר לצורך קביעת הזן של הנגיף. דוגמאות: 1-1567/18, 2-2068/19, 3-2521/20, 4-1406/22, 5-1017/16, 2-1018/15, 1-1017/16, 3-024/23. B. הגברה של הגן המלא pX לחלבון Tax בגודל 926 בסיסים לדוגמאות 1-1018/15, 2-1017/16, 3-1168/24, 4-2488/17, 5-2068/19, 6-2688/20, 7-1735/21, 8-1775/22, 9-2153/23, 10-1168/24.

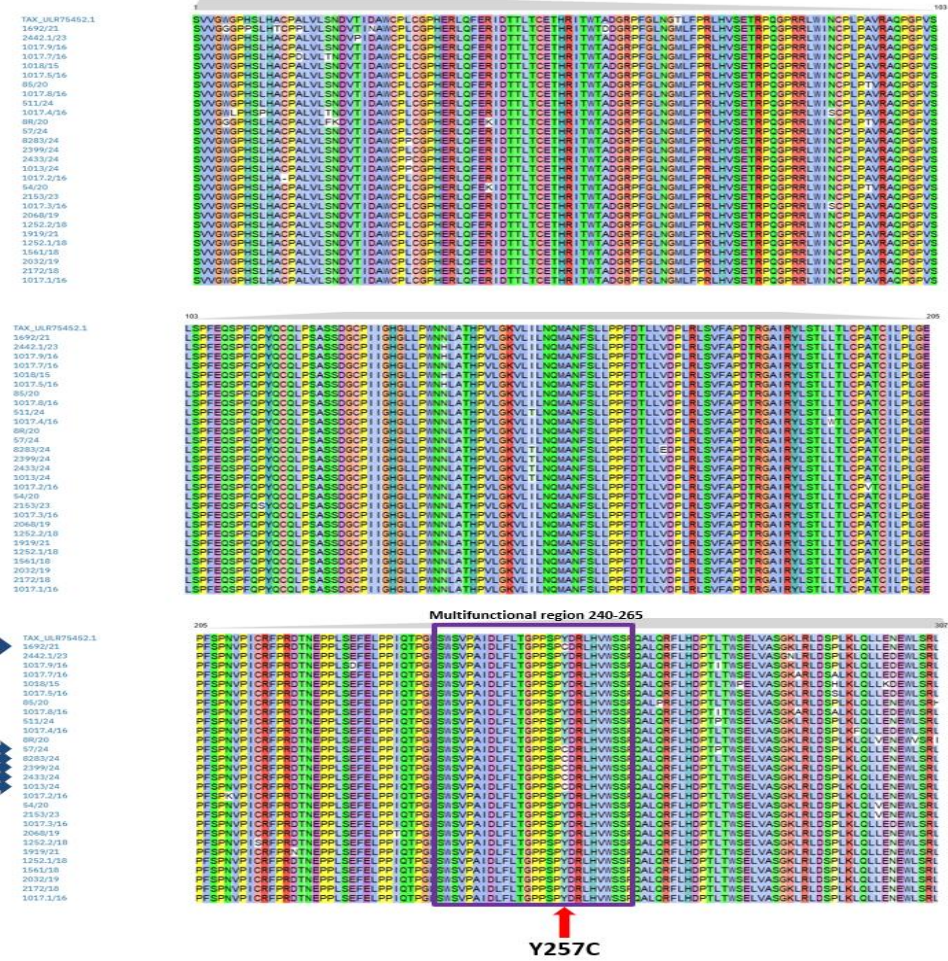
לאחר מכן, המקטעים שהוגברו לשני הגנים נשלחו לריצוף בשיטת סאנגר. הרצפים שהתקבלו לכל דוגמא הושושו לזנים השונים הידועים על ידי השוואת רצפים כנגד מאגר המידע NCBI בשיטת BLAST גם כנגד הרצפים לגן env וגם כנגד הרצפים לגן pX. הרצפים במאגר המידע שהראו את ההומולוגיה הגבוהה ביותר לרצפים שהתקבלו שימשו לצורך הגדרה ראשונית של הזנים שאובחנו בדוגמאות שנבחנו. סיכום של הגנוטיפים השונים על פי מספר הדוגמאות והשנים מפורט בטבלה 3.

טבלה 3: שכיחות זני BLV בדגימות חיוביות עד שנת 2023.

year	Total number of Cows	Genotype by env	Genotype by Tax	Notes
2015	1	-	Genotype 4 (1)	
2016	9	-	Genotype 4 (9)	
2017	2	Genotype 6 (2)	Genotype 4 (1)	
2018	4	Genotype 4 (4)	Genotype 4 (4)	
2019	3	Genotype 4 (3)	Genotype 4 (2)	
2020	7	Genotype 4 (5) / Genotype 6 (2)	Genotype 4 (1)	
2021	31	Genotype 4 (20) / Genotype 6 (10)	Genotype 4 (7)	
2022	23	Genotype 4 (18) / Genotype 6 (4)	Genotype 4 (5)	
2023	8	Genotype 4 (7)	Genotype 4 (4)	
2024	58	Genotype 4 (46) / Genotype 6 (7)	Genotype 4 (12)	
N/A	23	Genotype 4 (18) / Genotype 6 (4)	Genotype 4 (3)	
Total	169	Genotype 4 (121) / Genotype 6 (29)	Genotype 4 (49)	

מתוצאות האבחון של הזנים על פי ריצוף הגן env, הערכנו שגנוטיפ 4 נמצא בשכיחות הגבוהה ביותר בדוגמאות שנאספו (121/150) ורוצפו בהצלחה. על פי תוצאות הרצפים, קיימת קרבה גבוהה לזני גנוטיפ 4 שזוהו ברוסיה ובפולין ולא לגנוטיפ 4 הנפוץ במצרים. לעומת זאת, מצאנו שגנוטיפ 6 גם כן קיים בארץ אך בשכיחות נמוכה יותר (29/150) ובעל קרבה גבוהה לגנוטיפ 6 הנפוץ בווייטנאם ובמזרח הרחוק. ממצא זה ייחודי ומעניין לאור העובדה שבעוד שגנוטיפ 4 אינו קיים במזרח הרחוק (פרט לסין), גנוטיפ 6 אינו קיים כלל במזרח אירופה. לכן, ממצא זה מעלה את האפשרות שגנוטיפ 6 חדר למשק הישראלי ממקור המזרח הרחוק ולעומתו גנוטיפ 4 חדר ככל הנראה ממזרח אירופה או מרוסיה. בנוסף, בדקנו את רצף החלבון Tax שתורגם על פי רצפי הגן שרוצפו בהשוואה לרצפים מדוגמאות אחרות ולזן הקרוב ביותר TAX_ULR75452.1 (וריאנט 009B-W_M, פולין 2016) (תמונה 3). כפי שניתן לראות, הדוגמאות הראו קרבה ריצפית לבידודים של גנוטיפ 4, ללא זיהוי של גנוטיפ 6, גם בדוגמאות שנמצאו בריצוף הגן env כשייכות לגנוטיפ 6 (לדוגמא פרות 9060, 1692 ו-2488). כמו-כן, נראה שהחדירה של גנוטיפ 6 לארץ התרחשה עוד לפני 2017, למרות שתוצאות ריצוף Tax משנים אלו, ולאותן דוגמאות, מראות קרבה יחסית לגנוטיפ 4. ממצא זה מחזק את ההשערה שזנים אלו עברו אירועי רקומבינציה, בהן נוצר ווריאנט מקומי הכולל את הגן לחלבון env מגנוטיפ 6 אך את הגן לחלבון Tax מגנוטיפ 4. בנוסף, ניתן לראות שבעוד שבשנים 2020-2021, תפוצת גנוטיפ 6 הגיע לשיא וכללה כשליש מהדוגמאות שנבדקו. אך, בשנת 2024, גנוטיפ 4 הפך לדומיננטי יותר. לכן, ניתן להסיק שלמרות החדירה של גנוטיפ 6 לארץ, ולמרות אירוע הרקומבינציה בין הזנים, נראה שנוכחות גנוטיפ 6 דועכת לטובת גנוטיפ 4. כמו-כן, זוהו מוטציות ספורות באזורים אחרים של החלבון המיוחסים

לאזור הדומיין המולטי-פונקציונאלי. חלק מהמוטציות דווחו כרצפים שנמצאים באסוציאציה עם ירולנטיות גבוהה יותר [12, 17]. לדוגמא, בשש דוגמאות נמצא מוטציה מוכרת (Y257C) הקשורה לעלייה בעומס הפרווירוס בבעל החיים ומראה על עלייה בסיכון להתפרצות לאוקוזיס. מתוך שש הדוגמאות, חמש בודדו מדוגמאות שהגיעו למכון הווטרינרי לאבחון לאחר סימני מחלה אחת מדוגמא משיאון ללא דיווח על סימנים קליניים (ראה טבלה 4). בחמש מהדוגמאות האלו זוהתה גם מוטציה ייחודית נוספת בחומצה אמינית 140 (I140T).



תמונה 3: השוואת רצפים של החלבון Tax מדוגמאות שונות.

תוצאות ריצוף סאנגר של הגנים שהוגברו בשלב הראשון הוערכו על ידי תרגום *In-silico* לצורך השוואת רצפי החלבון של הוריאנטים השונים. הרצפים הושווו בשיטת Clustal Omega כנגד רצף החלבון Tax שפורסם לן הקרוב ביותר TAX_ULR75452.1 (וריאנט W_M_009B-009B, פולין 2016). הרצף מוצג בשורה הראשונה. האזור המולטיפונקציונאלי של החלבון מסומן במסגרת סגולה. החומצה האמינית המקושרת לפולימורפיזם של המוטציה שנמצאה בקורולציה לעלייה בעומס הפרווירוס (Y257C) מסומנת בחץ אדום. הדוגמאות שכוללות את הויראנט בעל האלימות המוגברת (cysteine) מסומנים בחץ כחול.

פיתוח מערכת qPCR לאבחנה מוקדמת של זנים בעלי פוטנציאל אלימות גבוה.

על פי תוצאות ריצוף הגן לחלבון Tax מהדוגמאות השונות, זיהינו מוטציה ספציפית (Y257C) בדוגמאות בהן נראו סימנים קליניים של לאוקוזיס. מוטציה זו גם דווחה בעבר בספרות המדעית כמוטציה המקושרת לעלייה באלימות הנגיף ובאסוציאציה לעומס נגיפי גבוה. לכן, מוטציה זו נבחרה לפיתוח מערכת אבחון מולקולארית להבדלה בין וריאנטים המכילים את המוטציה לכאלו שלא (תמונה 5). מערכת זו מבוססת על qPCR הכולל פרובים לווריאנטים השונים בשינוי נוקלאוטיד יחיד (AccuStart Genotyping ToughMix, Quanta).

תמונה 5: רצף TAX הכולל את אזור המוטציה ותכנון האמפליקון לאנליזת SNP.

>Consensus sequence of pX [tax protein] gene
CAAGTGTGTTGGTTGGGGGCCCCACTCTCTACATGCCTGCCCCGGCCCTGGTTTTGTCCA
ATGACGTCACCATCGATGCCTGGTGGCCCTCTGCGGGCCCCATGAACGACTCCAATTTCG
AAAGGATCGACACCACGCTCACCTGCGAGACCCACCGTATCACCTGGACCGCCGATGGAC
GACCTTTCGGCCTCAATGGAACGTTGTTCCCTCGACTGCATGTCTCCGAGACCCGCCCC
AAGGGCCCCGACGACTCTGGATCAACTGCCCCCTTCCGGCCGTTCCGCGCTCAGCCCGGCC
CGTTTTCACTTCCCCCTTCGAGCAGTCCCCCTCCAGCCCTACCAATGCCAATTGCCCT
CGGCCTCTAGCGACGGTTGCCCATCATCGGGCACGGCCTTCTCCCTGGAACAACCTTAG
CAACGCATCCTGTCTCGGAAAAGTCCTTATATTAATCAAATGGCCAATTTTCTTAC
TCCCCCCTTCGACACCCTCCTGTAGACCCCTCCGGCTGTCCGTCTTCGCCCCGGACA
CTAGGGGAGCCATACGTTATCTCTCCACCCTTTTGACGCTATGCCAGCTACTTGTATTC
TACCCTAGGGCAGCCCTTCTCTCCTAATGTCCCCATATGCCGCTTCCCCGGGACACCA
ATGAACCTCCCCTTTCGGAATTCGAGCTGCCCCCTATTCAAACGCCCGGCCTGTCTTGGT
CTGTCCCCGCGATCGACCTATTCCTAACC GGTCCCCCTTCCCCAT (A/G)CGACCGGTTACA
CGTGTGGTCCAGTCCCTCAGGCCTTACAACGCTTCCTCCA TGACCCTACGATCACCTGGTCAG
AATTGGTTGCTAGCGGGAAACTGAGACTTGATTACCCTTAAAATTACAGCTGTTAGAAA
ATGAATGGCTCTCCCGCCTTTTTTGA

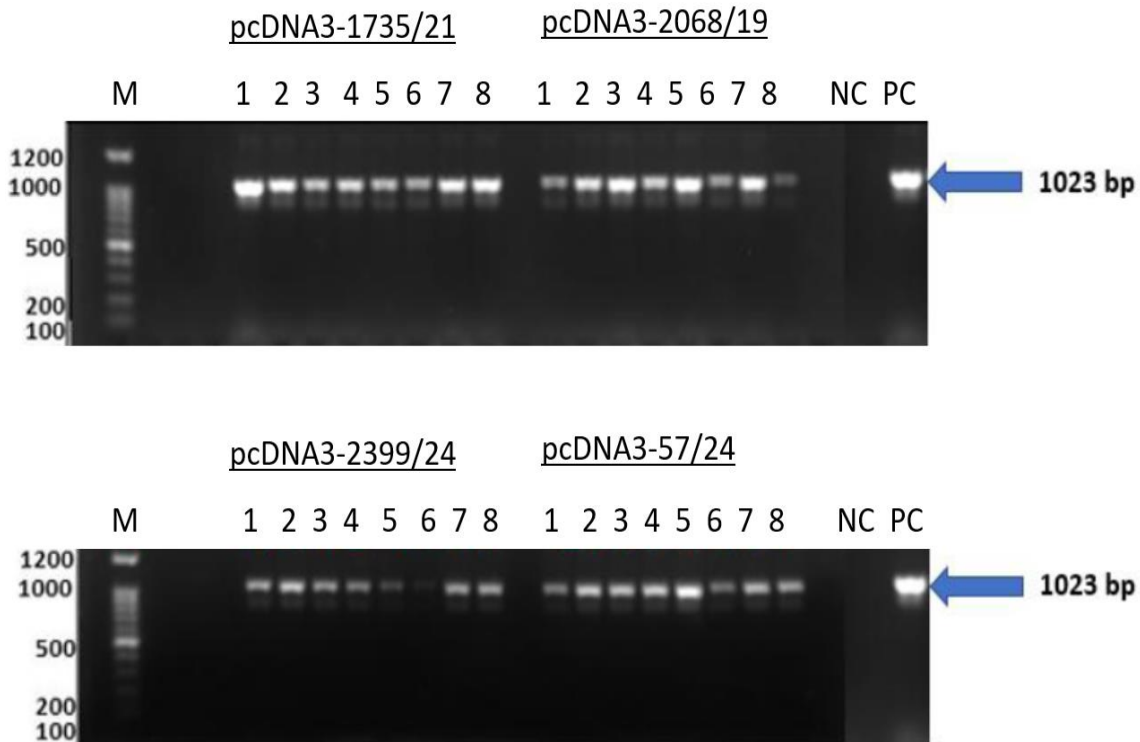
רצף הקונצנזוס של הגן לחלבון TAX כפי שהתקבל מרצף הנוקלאוטידים של הדוגמאות הקליניות שהתקבלו במכון הווטרינרי. הרפליקון המתוכנן באורך 88 נוקלאוטידים מסומן בקו תחתון והפריימרים לרפליקון מסומנים בהדגשה צהובה. הפולימורפיזם של הנוקלאוטיד היחיד (SNP) בו קיימת המוטציה A או G, מודגש בתכלת ובסוגריים.

בשלב הבא, אנחנו מתכננים לבצע בדיקות לצורך כיול המערכת על הדוגמאות הקיימות, ולאחר מכן על דוגמאות נוספות על פי הופעת סימנים קליניים של לאוקוזיס לעומת דוגמאות ללא סימנים קליניים. במקביל, נשווה את התוצאות גם תוצאות מערכת אבחון מולקולארית קיימת לצורך הערכת העומס הנגיפי בדוגמאות.

שיבוט וריאנטים של הגן לחלבון Tax לפלסמיד ביטוי.

לאחר שוידאנו שהפריימרים לגן לביטוי החלבון Tax מתאימים להגברת הגן כולל אתרי רסטריקציה ספציפיים בקצוות וריצוף של המקטעים שהתקבלו, בחרנו מספר וריאנטים על מנת לשיבוט לפלסמיד ביטוי. הפלסמיד שנבחר הוא מסוג pCDNA3 המכיל פרומוטור מסוג CMV ואתר שיבוט במורד הזרם הכולל גם תוספת בסוף הגן לסמן חלבוני מסוג 6xHis-tag. בשלב הראשון, ניסינו מספר שיטות לשיבוט הגן על מנת לקבל את השיטה המתאימה ביותר בשיבוט הוריאנטים השונים. כאן, הצלחנו לבצע שיבוט מלא של ארבע דוגמאות, המייצגות את ארבעת הוריאנטים כפי שזוהו בעץ הפילוגנטי (1753/21, 2068/19, 57/24 ו-2399/24). המקטע לאחר שיבוט רוצף על ידי פריימרים הנמצאים מחוץ לאתר השיבוט והרצף שהתקבל הראה שהגן הוכנס בהתאמה למסגרת הקריאה הרצויה כך שבביטוי בתאים החלבון יתורגם בתוספת סמן 6xHis-tag בקצה האמיני של החלבון.

תמונה 6: בדיקת החדרת הגן לפלסמיד ביטוי pcDNA3.

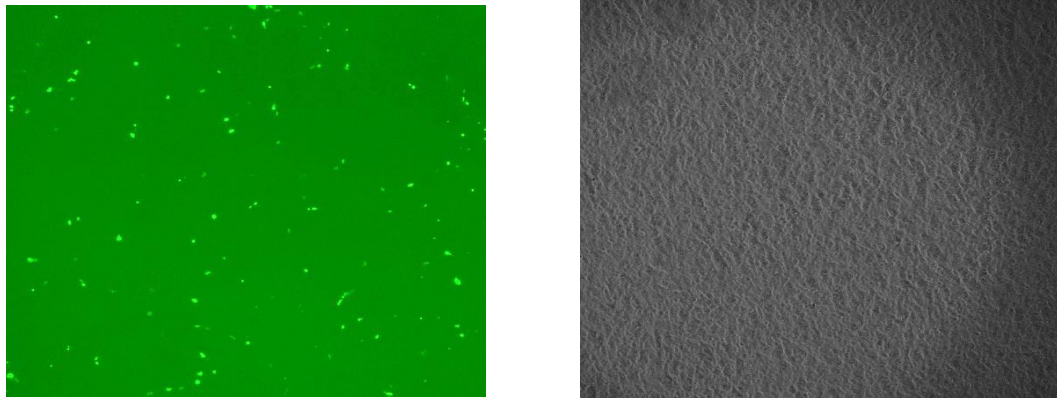


הצלחת החדרת הגן לחלבון Tax מדוגמאות 1735/21, 2068/19, 2399/24 ו-57/24 נבדקה על מושבות חיוביות בשיטת קולוני PCR. הגודל המצופה הכולל את תג ההיסטידין ואתרי הרסטריקציה בקצוות הוערך כ-1023 נוקלאוטידים. הכנסת הגן באופן מלא ובמסגרת הקריאה וודאה על ידי ריצוף סאנגר.

בדיקת ביטוי החלבון TAX בתרבית תאי MDBK.

לאחר שיבוט ארבעת הויראנטים הנבחרים של הגן לחלבון Tax לפלסמיד הביטוי, ביצענו בדיקה למעקב אחר הצלחת ביטוי החלבון בתאי בקר מסוג MDBK. הפלסמידים השונים הוחדרו לתאי MDBK בטרנספקציה כפי שתואר בפרק שיטות וחומרים. לאחר 24 שעות, וידאנו שהטרנספקציה הצליחה על ידי בדיקת ביטוי חלבון פלורוסנטי ירוק (GFP) בתאים אליהם הוחדר פלסמיד pcDNA3 בו משובט הגן לחלבון GFP (תמונה 7).

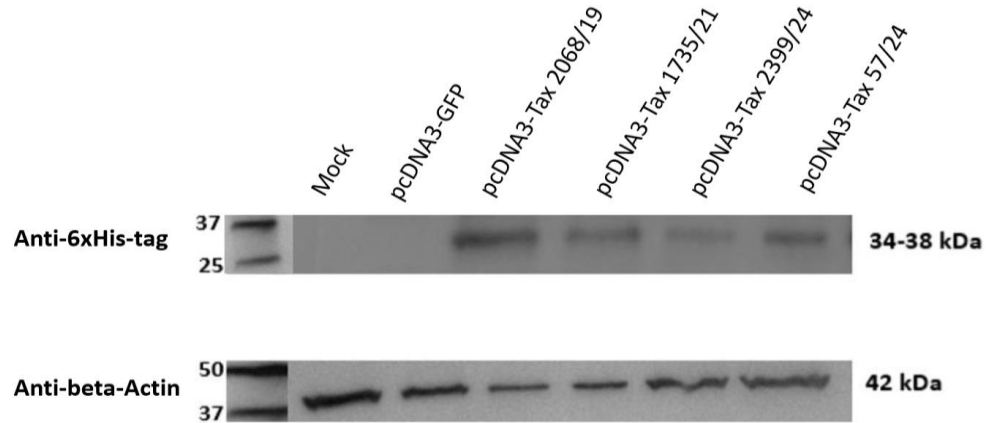
תמונה 7: וידוא הצלחת טרנספקציה של פלסמיד ביטוי pcDNA3 המבטא GFP לתאי MDBK.



לתאי MDBK הוחדר פלסמיד ביטוי pcDNA3-GFP במקביל לארבעת פלסמידי ביטוי Tax-pcDNA3. יעילות ביטוי GFP נבדקה בתאים במיקרוסקופ פלורוסנטי (הגדלה $\times 400$) באור נגלה (פאנל ימין) לעומת פילטר לאור באורך גל 475 ננומטר (פאנל שמאל). רוחב השדה הנמדד 100 מיקרומטר.

לאחר וידוא הצלחת הטרנספקציה, התאים נקצרו ממשטחי הגידול ונבדקו לביטוי חלבונים בשיטת ווסטרן בלוט. כפי שניתן לראות בתמונה 8, מצאנו כי כל 4 השיבובים של החלבון, מראים ביטוי של החלבון מאוחה לסמן היסטידין (6xHis-tag) בגודל המתאים לחלבון Tax. ממצא זה מראה שכל ארבעת הויראנטים מראים ביטוי ברמה סבירה בתאי בקר תחת פרומוטור כללי. כמו-כן, ניתן לבצע בדיקות המשך לביטוי החלבון בתאים מודבקים בנגיף BLV ולצורך ניסויי המשך לאנליזות חלבונים של האינטראקציות של החלבון עם פקטורים של תאי המאכסן.

תמונה 8: אנליזת ווסטרן בלוט לביטוי חלבוני TAX בתאי MDBK.



תמצית חלבונים מתאי MDBK לאחר טרנספקציה של פלסמידי ביטוי הוטענה על ג'ל חלבונים SDS-PAGE. לאחר הפרדה על פי גודל, החלבונים הועברו לממברנת ניטרצולוז ונחשפו לנוגדנים כנגד 6xHis-tag (פאנל עליון) או כנגד חלבון ביקורת אקטין (פאנל תחתון). החלבון Tax מאוחה לסמן ההיסטידין הוערך כמתאים לגודל 34-38kDa. לעומת זאת, חלבון האקטין מזהה בגודל 42kDa.

דין

לעבודה זו נקבעו ארבע מטרות עיקריות:

- א. זיהוי ואפיון מולקולארי של הזנים של נגיף לוקמיה בבקר הקיימים בארץ.
- ב. אפיון של הוריאנטים של חלבון קובע האלימות Tax הקיימים בישראל.
- ג. פיתוח שיטה מולקולארית לזיהוי של זנים ספציפיים של נגיף הלוקמיה בבקר.
- ד. זיהוי מרקרים ספציפיים של המאכסן הנמצאים במתאם לחומרת מחלת לאוקוציטוזיס.

לצורך מימוש המטרה הראשונה, זיהוי ואפיון מולקולארי של הזנים של נגיף הלוקמיה בבקר הקיימים בארץ, נעשה לראשונה מחקר סקר לזיהוי תפוצת זני נגיף הלוקמיה בבקר בישראל על פי הדוגמאות שהגיעו למכון הוטרינרי. דוגמאות אלו כללו דוגמאות של בקר שהראה סימני מחלה כמו-גם דוגמאות לאבחון כללי של דוגמאות ללא סימנים קליניים. לרוב, האבחון במכון הוטרינרי נעשה על פי זיהוי נוגדנים כנגד הנגיף, ובמיעוט המקרים, זיהוי מולקולארי של נוכחות הפרווירוס בדם או בטחול. בהתבסס על מטרות תוכנית העבודה, דוגמאות שנמצאו חיוביות לנוכחות נוגדנים או לנוכחות הפרווירוס, נבדקו לזיהוי של הזנים על פי רצף הגנים לחלבון המעטפת (env) ולחלבון Tax. סך הכל, נבדקו 169 דוגמאות מהשנים 2015-2024, בדגש על השנים 2023-2024, בהן נאספו הדוגמאות ונשמרו בצורה מסודרת יותר. התוצאות שלנו מראות כי זן הגנוטיפ 4, ממקור

מזרח אירופה ורוסיה, הוא הנפוץ יותר בארץ. כל הריצופים המוצלחים של הגן לחלבון TAX תמכו ברצפים בעלי קרבה פילוגנטית לגנוטיפ 4 בעוד רוב (80% כללי, 87% בשנת 2024) הריצופים של הגן לחלבון המעטפת נמצאו גם כן קרובים לרצפים של גנוטיפ זה. לעומת זאת, רצפי הגן לחלבון המעטפת בכ-13-20% מהדוגמאות, זוהו כגנוטיפ 6 ממקור מזרח אסיה. ממצא מעניין נוסף בהקשר זה הראה שבדוגמאות שזוהו כגנוטיפ 6 על פי הגן לחלבון המעטפת, זיהינו קרבה פילוגנטית לגנוטיפ 4 כאשר הצלחנו לרצף באופן חלקי או מלא את הגן TAX לחלבון TAX. תוצאות אלו מעידות על אפשרות של אירוע רקומבינציה בין הגנוטיפים בארץ ליצירת וריאנט מקומי בו חלבון ה-Tax הינו ממקור גנוטיפ 4 או אירוע חדירה של וריאנט זה ממקור לא ידוע לאחר אירוע רקומבינציה בין הזנים בארץ המוצא. למרות זאת, זיהינו שמיא יחסי בתפוצה של גנוטיפ 6 כשליש מהדוגמאות שנבדקו בשנים 2020-2021, נראתה ירידה יחסית בתפוצת הוריאנט הכולל גנים מגנוטיפ 6 ועלייה בדומיננטיות של גנוטיפ 4 בשנים העוקבות עד לתפוצה יחסית של 13% בלבד שלגנוטיפ 6 בשנת 2024.

לצורך מימוש המטרה שנייה, אפיון של הוריאנטים של חלבון קובע האלימות Tax הקיימים בישראל, ביצענו אנליזה מפורטת של הגן TAX לחלבון Tax, חלבון קובע האלימות של הנגיף. בעבר תוארו מספר מוטציות שנמצאו באסוציאציה לעומס הנגיפי של הפרוויורוס בבעל החיים הנגוע וכן לעלייה באלימות הנגיף ובסבירות להתפתחות של לאוקוזיס. אנליזה שביצענו על סמך הרצפים של הגן, חלקיים או מלאים, הראתה אסוציאציה אפשרית של וריאנטים ספציפיים לדיווחים על סימנים קליניים בבקר. אחת המוטציות, Y257C, גם דווחה בעבודות קודמות כקשורה לעלייה בעומס הפרוויורוס בזנים בעלי רקע של גנוטיפ 4. באופן מעניין, מוטציה זו זוהתה במספר דוגמאות בהן דווח על הופעת סימנים קליניים ורק בדוגמא אחת בה לא היה דיווח (מקור הדוגמא משיאון). בנוסף, מוטציה זו נמצאה בקורלציה להופעת מוטציה משמעותית נוספת של החלפה בעמדה 140 של חומצה אמינו הידרופובית אליפאטית- איזולאוצין (Isoleucine) בחומצה אמינו פולרית ריאקטיבית - תראונין (Threonine), (I140T), שלא דווחה בעבר בזנים אלו ולא הופיעה בדוגמאות האחרות שנבדקו. בנוסף, בחרנו ארבעה וריאנטים של הגן לחלבון Tax שרוצפו בעבודה זו, ושיבטנו אותם בהצלחה לפלסמיד ביטוי pCDNA3 במסגרת הקריאה לתג 6xHistidine. שיבוטים אלו נמצאו חיוביים בבדיקת ביטוי בתאי בקר MDBK ומיועדים לצורך מחקר עתידי שיבדוק את האינטראקציות של וריאנטים אלו עם פקטורים תאיים של המאכסן.

לצורך מימוש המטרה השלישית, תכננו מערכת לזיהוי פולימורפיזם מבוסס שינוי נוקלאוטיד אחד (Single nucleotide polymorphism - SNP) המבדיל בין וריאנטים בהם חומצת האמינו במיקום 257 הינה cysteine לעומת כאלו בהן חומצת האמינו היא tyrosine. דיווחים בפרסומים בעבר

מצאו שנוכחות של ציסטאין בעמדה זו קשורה לעלייה בעומס הפרווירוס ולעלייה בסבירות להתפתחות לאוקוזיס בבעל החיים הנגוע. לכן, ובהתאמה לתוצאות הרצף של הגן לחלבון Tax שביצענו במטרה הקודמת, הערכנו שניתן לפתח אבחנה מבדלת המבוססת על שינוי זה. אבחנה זו יכולה להיות מתאימה לצורך הערכה לשינויים בסבירות להחמרת המחלה בבעל החיים הנגוע ולהיערכות בהתאם של הוטרניר והרפתן. לצורך כך, יש להשלים את מימוש המטרה ולבצע כיוול של המערכת ובהתאמה להערכת העומס של הפרווירוס במערכת האבחון המקובלת של כלל הדוגמאות.

המטרה הרביעית, זיהוי מרקרים ספציפיים של המאכסן הנמצאים במתאם לחומרת מחלת לאוקוציטוזיס, במחקר זה לא התממשה. כפי שתואר בהצעת המחקר, מטרה זו תלויה במימוש חלק מהמטרות הקודמות ולמרות שהוקצו למחקר זה טכנאות, סטודנטית לעבודת גמר וסטודנט מילגאי לתואר שני, אירועים חיצוניים הגבילו בצורה משמעותית את היכולת לממש את המטרות הללו בלוח הזמנים המקורי. בעקבות כך, רכישת פלטות האלייזה המתאימות, כגון פלטות לזיהוי הפקטורים אינטרפרון אלפא, אינטרפרון גאמא, VEGF, Annexin-A1 ו-Annexin-A3, שהוערכו בעבודות קודמות כקשורות לעלייה בחומרת המחלה לא התבצעה. להערכתנו, לאבחון של פקטורים אלו בדוגמאות הקיימות, ובעיקר משנת 2024, בהתאמה לסיווג חומרת המחלה (הדבקה ראשונית (נשאות), הדבקה כרונית, לאוקוציטוזיס כרוני ולימפומה) ולאופן שביצענו לוריאנטים שזוהו בגן לחלבון TAX בדוגמאות, יש פוטנציאל לספק מידע חשוב על מצב בעל החיים עוד לפני עלייה נראית בחומרת המחלה ולהיערכות מתאימה של המגדל או הוטרניר.

לסיכום, מחקר זה סיפק בפעם הראשונה בישראל מידע על תפוצת זני BLV בישראל בשנים האחרונות, את מקור זנים אלו והיתכנות של אירוע רקומבינציה אפשרי להתפשטות זן מקומי. בנוסף, המחקר הצביע על קורולציה אפשרית בין חומרת המחלה למוטציות ספציפיות בגן לחלבון קובע האלימות Tax. ממצאים אלו הובילו לפיתוח מערכת SNP לאבחון מבדל בין זנים הקשורים לעלייה בעומס הנגיפי לזנים הנמצאים בסירקולציה בישראל בעלי סבירות נמוכה יותר לעלייה בחומרת המחלה. לבסוף,

לבסוף, פרויקט המחקר הזה, הניח את היסודות לזיהוי פקטורים של המאכסן הנמצאים באינטראקציה עם וריאנטים שונים של חלבון קובע האלימות Tax בשיטות מבוססות פרוטאומיקה על מנת לפתח טיפול שיעכב אינטראקציות אלו עם וריאנטים אלימים של החלבון בזמן מחלה וימנע עלייה בחומרת המחלה כתוצאה מכך. בנוסף, המידע שהתקבל בעבודה זו בשילוב עם מחקר עתידי על הדוגמאות שיראה את רמות הפקטורים המיוחסים להבדלים בחומרת המחלה, יכול לשמש כבדיקה מיקדמית, לפני הופעת סימנים קליניים, לפוטנציאל להתפתחות לאוקוזיס בבעל החיים ולהיערכות הוטרניר המטפל בהתאם.

רשימת ספרות

- .1 Sagata, N., et al., *Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames*. EMBO J, 1984. **3**(13): p. 3231-7.
- .2 Nekouei, O., et al., *Predicting within-herd prevalence of infection with bovine leukemia virus using bulk-tank milk antibody levels*. Prev Vet Med, 2015. **122**(1-2): p. 53-60.
- .3 Moratorio, G., et al., *A detailed molecular analysis of complete bovine leukemia virus genomes isolated from B-cell lymphosarcomas*. Vet Res, 2013. **44**: p. 19.
- .4 Juliarena, M.A.B., Clarisa Natalia Icon ; Lützel Schwab, Claudia María; Esteban, Eduardo Néstor; Gutiérrez, Silvina Elena Icon, *Bovine leukemia virus: current perspectives*. Virus Adaptation and Treatment, 2017.
- .5 Burny ,A., et al., *Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis*. Onderstepoort J Vet Res, 1985. **52**(3): p. 133-44.
- .6 Aida, Y., et al., *Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus*. Front Microbiol, 2013. **4**: p. 328.
- .7 Maclachlan, N.J.D., E.J., *Fenner's Veterinary Virology, Chapter 14 - Retroviridae*, in *Fenner's Veterinary Virology*, E.J.D. N. James MacLachlan, Editor. 2017, Academic Press: Cambridge, MA, USA. p. 269-297.
- .8 Rola-Luszczak, M., et al., *Molecular Characterization of the env Gene of Bovine Leukemia Virus in Cattle from Pakistan with NGS-Based Evidence of Virus Heterogeneity*. Pathogens, 2021. **10**(7)
- .9 Lawson, J.S., B. Salmons, and W.K. Glenn, *Oncogenic viruses and breast cancer: mouse mammary tumor virus (MMTV), bovine leukemia virus (BLV), human papilloma virus (HPV), and epstein–barr virus (EBV)*. Frontiers in oncology, 2018. **8**: p. 1.
- .10 Arainga, M., E. Takeda, and Y. Aida, *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, 2012. **13**(1): p. 1-18.

- .11 Zyrianova, I.M. and S.N. Kovalchuk, *Bovine leukemia virus tax gene/Tax protein polymorphism and its relation to Enzootic Bovine Leukosis*. Virulence, 2020. **11**(1): p. 80-87.
- .12 Pluta, A., et al., *Analysis of Nucleotide Sequence of Tax, miRNA and LTR of Bovine Leukemia Virus in Cattle with Different Levels of Persistent Lymphocytosis in Russia*. Pathogens, 2021. **10**(2)
- .13 Ochiai, C., et al., *Characterization of microRNA expression in B cells derived from Japanese black cattle naturally infected with bovine leukemia virus by deep sequencing*. PLoS One, 2021. **16**(9): p. e0256588.
- .14 Tomiyasu, T., et al., *L233P mutation in the bovine leukemia virus Tax protein has impact on annexin A3 and type I collagen secretion by host cells*. Vet Microbiol, 2021. **256**: p. 109042.
- .15 Usuga-Monroy, C., et al., *IFN-gamma mRNA expression is lower in Holstein cows infected with bovine leukemia virus with high proviral load and persistent lymphocytosis*. Acta Virol, 2020. **64**(4): p. 451-456.
- .16 Arainga, M., E. Takeda, and Y. Aida, *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, 2012. **13**(1): p. 121.
- .17 Montero Machuca, N., et al., *Genetic analysis of the pX region of bovine leukemia virus genotype 1 in Holstein Friesian cattle with different stages of infection*. Arch Virol, 2022. **167**(1): p. 45-56.
- .18 Trainin, Z. and J. Brenner, *The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle*. Israel journal of veterinary medicine, 2005. **60**(4): p. 94.
- .19 Ott, S., R. Johnson, and S. Wells, *Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms*. Preventive veterinary medicine, 2003. **61**(4): p. 249-262.