



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



BOVINE LEUKEMIA VİRUSUN ENV, LTR VE PX GEN BÖLGELERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Selda DURAN YELKEN

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Feray ALKAN**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BOVINE LEUKEMIA VİRUSUN ENV, LTR VE PX GEN
BÖLGELERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

Selda DURAN YELKEN

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Feray ALKAN

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 19L0239007
proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Bovine Leukemia Virusun Env, LTR ve pX Gen Bölgelerinin Moleküler Analizi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Selda DURAN YELKEN

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Viroloji Anabilim Dalında
Selda DURAN YELKEN tarafından hazırlanan
“Bovine Leukemia Virusun Env, LTR ve pX Gen Bölgelerinin Moleküler Analizi”
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ
olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkan

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	2
1.1.1. Sınıflandırma	2
1.1.2. BLV Yapısı ve Genomu	3
1.1.2.1. BLV gag geni	5
1.1.2.2. Pro ve Pol Genleri	6
1.1.2.3. Env Geni	6
1.1.2.4. ‘Long Terminal Repeat’ (LTR) Bölgeleri	8
1.1.2.5. pX Gen Bölgesi	10
1.1.3. BLV Transkripsiyon ve Replikasyonu	15
1.2. Epidemiyoloji	18
1.3. Bulaşma	24
1.4. Klinik Bulgular	25
1.5. Patoloji	27
1.6. Kontrol ve Koruma	27
1.7. Tanı	30
1.8. BLV ve Meme kanseri	30
2. GEREÇ VE YÖNTEM	33
2.1. Gereç	33
2.1.1. Örneklenen Hayvanlar ve Tanı Materyalleri	33
2.2. Yöntem	34
2.2.1. Viral Nükleik Asit İzolasyonu	34
2.2.2. Hedef gen bölgeleri için PCR uygulanması	36
2.2.2.1. BLV env gen bölgesi için Nested Polimeraz Zincir Reaksiyon (Nested-PCR) Tekniği	37

2.2.2.2. BLV LTR Gen Bölgesi Nested Polimeraz Zincir Reaksiyon (Nested-PCR) Tekniği	38
2.2.2.3. BLV pX Gen Bölgesinin PCR Tekniği	39
2.2.3. PCR ürünlerinin Jel Elektroforezi ile görüntülenmesi	40
2.2.4. Dizin Analizi	40
2.2.5. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	40
2.2.6. Filogenetik Analiz	41
3. BULGULAR	42
3.1. BLV <i>Env</i> Gen Bölgesi Moleküler Analizi	42
3.1.1. <i>Env</i> Gen Bölgesi Nested-PCR Sonuçları	42
3.1.2. <i>Env</i> Gen Bölgesi Filogenetik Analizi ve Benzerlik Sonuçları	43
3.1.3. <i>Env</i> Gen Bölgesi Dizin Analizi Sonuçları	47
3.2. BLV'lerin LTR Gen Bölgesi Yönünden Sonuçları	51
3.2.1. LTR Gen Bölgesi Nested-PCR Sonuçları	51
3.2.2. LTR Gen Bölgesi Filogenetik Analiz Sonuçları	51
3.3.3. LTR Gen Bölgesi Dizin Analizi Sonuçları	55
3.3. BLV'lerin pX Gen Bölgesi Yönünden Sonuçları	60
3.3.1. pX Gen Bölgesi PCR Sonuçları	61
3.3.2. pX Gen Bölgesi Moleküler Analiz Sonuçları	62
3.3.2.1. pX Gen Bölgesi/ <i>Tax</i> Geni Filogenetik Analizi	62
3.3.2.2. pX Gen Bölgesi/ <i>Tax</i> Geni Amino Asit Dizin Sonuçları	65
3.3.2.3. pX Gen Bölgesi/ <i>Rex</i> Geni Amino Asit Dizin Sonuçları	69
3.3.2.4. pX Gen Bölgesi/ <i>R3</i> ve <i>G4</i> Genleri Amino Asit Dizin Sonuçları	73
4. TARTIŞMA	79
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
ÖZET	95
SUMMARY	96
KAYNAKLAR	97
EKLER	109
Ek 1. Etik Kurul Raporu	109
ÖZGEÇMİŞ	110

ÖNSÖZ

BLV, birçok ülkede yaygın olarak bulunmakta ve ülkeler arası ticaret ile de yayılarak önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle, BLV genom karakterizasyonuna yönelik çalışmalar, BLV genotiplerinin saptanması ve moleküler epidemiyolojik durumun ortaya konulması, virusun evrimsel süreci ve enfeksiyonun patogeneziyle ilgili verilerin elde edilmesi, insanlarda enfeksiyon yapan bazı retroviruslarla ilgili çalışmalarda da BLV'nin örnek oluşturmaları ve özellikle son dönemde insan meme kanseri dokusunda BLV tespiti ile zoonotik potansiyelin tekrar gündeme gelmiş olması nedeniyle önem taşımaktadır. Bu bağlamda planlanan bu çalışma ile Türkiye'nin farklı bölgelerinde yerleşik işletmelerde bulunan süt sığırlarını enfekte eden BLV'nin *env* gen bölgesi karakterizasyonu ile sirküle olan genotip(ler)in belirlenmesi ve transkripsiyonal aktivitede önemli rolü olan LTR gen bölgesi, viral transaktivatör Tax, post-transkripsiyonel düzenleyici Rex ve virusun etkili dağılımı için gerekli olan R3 ve G4 genlerini içeren pX gen bölgesinin moleküler karakterizasyonlarının yapılması ve meydana gelen mutasyonların patogenezi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler ışığında hedeflenen bilgilere ulaşılarak değerlendirmelerde bulunulmuş ve bilimsel bilgi birikimine katkıda bulunarak gelecek araştırmalara da kaynak sağlanmıştır.

Doktora eğitimim süresince, bilgisi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, sadece tez çalışmamda değil her konuda yardım ve desteğini gördüğüm, sevgisini ve sabrını hiç esirgemeyen sevgili danışman hocam Prof. Dr. Feray Alkan'a, lisansüstü eğitimim süresince emeği geçen ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aykut Özkul ve Öğretim Üyeleri, Prof. Dr. Seval Bilge Dağalp, Prof. Dr. M. Taner Karaoğlu ve Prof. Dr. T. Çiğdem Oğuzoğlu, Doç. Dr. Ayşe Zeynep Akkutay Yoldar ile Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi ve tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Hakan Yardımcı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmam ve akademik hayatım boyunca desteklerini gördüğüm; Dr. Arş. Gör. İlke Karayel Hacıoğlu ve birlikte görev yaptığım tüm araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman yanımda olan ve tez çalışmam sırasında da beni destekleyen eşim Mehmet Yelken, oğlum Ali Çınar Yelken ve aileme, ayrıca tez çalışma sürecimde yanımda olamasada tüm eğitim hayatım boyunca beni destekleyerek üzerimde büyük emeği olan babam Ekrem Duran’a minnet ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Müdürlüğü 19L0239007 proje numarası ve Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Celsius türünden derece, Santigrat derece
µl	Mikrolitre
aa	Aminoasit
AGID	Agar Jel İmmunodifüzyon/Agar gel immunodiffusion
AL	Aleukemi
AS1	Antisense 1
AS2	Antisense 2
AP	Activatör Protein
ARR	Arginine-Rich Region
ATF	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü
ATLL	Adult T-Cel Leukemia
BHV-1	Bovine Herpes Virus Tip 1
BLV	Bovine Leukemia Virus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Baz çifti-base pair
BVD	Bovine Viral Diarrhea
BT	Blue Tongue
CA	Kapsit
CREB	Cyclic Amp-Response Element Binding Protein
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte
cm	Santimetre
DAS	Downstream Activator Sequence
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Di nükleotrifosfat
EBL	Enzootic Bovine Leucosis
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Env	Envelope
FelV	Feline leukemia virus
FPPS	Farnesyl pyrophosphate synthase
g	G kuvveti-G Force
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GRE	Glucocorticoid response element
HAM	HTLV-1 ile ilişkili Myelopati
HIV-1	Human immunodeficiency Virus
HRE	Hormone Response Element
HTLV-1	Human T-Lymphotropic Virus Type 1
IBR	Infectious bovine rhinotracheitis
IFN-γ	Interferon-γ

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IN	Integrase
IRF	Interferon Regulatory Factor
kb	Kilobaz
LTR	Long Terminal Repeat
M	Molar (Birim)
MA	Matrix proteini
MEGA X	Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
mRNA	messenger RNA
MYB	Myb-Like Motif
NC	Nükleokapsit
NCBI	Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
ND	Neutralization Domain
NES	Nuclear Export Signal
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
ng	Nanogram
NLS	Nuclear Localization Signal
nt	Nükleotit
ORF	Open Reading Frame
pBL	Periferik Kan Lökositleri (Peripheral Blood Leukocytes)
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
pH	Asitlik/bazlık Ölçütü
PI-3	Parainfluenza-3
PL	Persiste Lenfositöz
PR	Proteaz
PVL	Proviral Yük (Proviral Load)
qPCR	Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Bir dakikadaki dönüş sayısı (Revolutions Per Minute)
RT	Reverse transkriptaz
Nested	PCR Nested polimeraz zincir reaksiyonu
s	Saniye
SU	Surface
TAE	Tris Asetat Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (Tris Asetat Ethylene

	Diamine Tetra Acetic Acid)
TM	Trans Membrane
TRE	Tax-responsive element
tRNA	Transfer RNA(Taşıyıcı RNA)
U	Ünite



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. BLV virion yapısı	4
Şekil 1.2. BLV pX bölgesinin genomik yapısı ve dört BLV düzenleyici genin 5' bölümünün yerleri ve pX bölgesindeki üç okuma çerçevesi	11
Şekil 1.3. Retrovirus yaşam siklusu	16
Şekil 1.4. BLV provirusunun yapısı: genler, RNA transkriptleri ve viral proteinler	18
Şekil 1.5. EBL ile enfekte sığırdaki kalp ve bağırsaklarda gözlenen neoplastik oluşumlar	27
Şekil 3.1. BLV Env Nested-PCR 2. tur sonucu jel görüntüsü	42
Şekil 3.2. Bu çalışmada elde edilen yerel virus dizinleri ile GenBank'taki Türkiye ve diğer ülkelere ait BLV kısmi env gen bölgesi dizinleri (1-11 genotip) ile yapılan filogenetik analiz	46
Şekil 3.3. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer referans suşların BLV kısmi env gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması	49
Şekil 3.4. BLV LTR Nested-PCR 2. tur sonucu jel görüntüsü	51
Şekil 3.5. Bu çalışmadaki yerel viruslar ile GenBank'taki diğer ülkelere ait BLV kısmi LTR gen bölgesi dizinleri (1-10 genotip) ile yapılan filogenetik analiz	54
Şekil 3.6. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer ülkelere ait bazı suşların BLV LTR gen nükleotid dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması	56
Şekil 3.7. BLV pX gen bölgesi (pX1, pX2, pX3) PCR jel görüntüsü	61
Şekil 3.8. Bu çalışmadaki yerel viruslar ile GenBank'taki diğer ülkelere ait BLV tax gen bölgesi dizinleri (genotip 1-10, genotip 7 hariç) ile yapılan filogenetik analiz	64
Şekil 3.9. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer referans suşların BLV tax gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması	66
Şekil 3.10. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer referans suşların BLV rex gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması	71
Şekil 3.11. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer referans suşların BLV pX/R3 gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması	74

Şekil 3.12. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer referans suşların BLV pX/G4 gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması 75



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan tanı materyalleriyle ilgili bilgiler	33
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primer dizinleri ile ilgili bilgiler	36
Çizelge 2.3. BLV env gen bölgesi Nested-PCR miks bileşenleri ve programı	37
Çizelge 2.4. BLV LTR gen bölgesi Nested-PCR miks bileşenleri ve programı	38
Çizelge 2.5. BLV pX gen bölgesi PCR miks bileşenleri ve programı	39
Çizelge 3.1. Çalışmada pozitif tespit edilen örneklerden Env, LTR ve pX gen bölgesi dizin bilgileri elde edilen örneklerle ait bilgiler	43
Çizelge 3.2. Çalışmada elde edilen env gen bölgesi dizinleri GenBank'a kaydedilen BLV'ler ve filogenetik analiz için kullanılan GenBank'ta kayıtlı diğer BLV suşlarına ilgili bilgiler	44
Çizelge 3.3. Çalışmada elde edilen LTR gen bölgesi dizinleri GenBank'a kaydedilen BLV'ler ve filogenetik analiz için kullanılan GenBank'ta kayıtlı diğer BLV suşlarına ilgili bilgiler	52
Çizelge 3.4. LTR gen kısmi dizin bilgilerinden hazırlanan nükleotit değişikliklerin genomda bulunduğu fonksiyonel bölgeler ve pozisyonları	60
Çizelge 3.5. Çalışmada elde edilen Tax gen bölgesi dizinleri GenBank'a kaydedilen BLV'ler ve filogenetik analiz için kullanılan GenBank'ta kayıtlı diğer BLV suşlarına ilgili bilgiler	62
Çizelge 3.6. Tax gen aa dizin bilgilerinden hazırlanan aa değişikliklerin genomda bulunduğu fonksiyonel bölgeler ve pozisyonları	69
Çizelge 3.7. Çalışmada elde edilen yerel virusların ve diğer referans suşların BLV rex gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılmasında yer alan suşlara ait bilgiler	72
Çizelge 3.8. Rex gen aa dizin bilgilerinden özetle hazırlanan aa değişikliklerin genomda bulunduğu fonksiyonel bölgeler ve pozisyonları	73
Çizelge 3.9. Çalışmada elde edilen yerel virusların ve diğer referans suşların BLV R3/G4 gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılmasında yer alan suşlara ait bilgiler	76

Çizelge 3.10. Çalışmada elde edilen bir kısım yerel virusun LTR, Tax ve G4 geni bazı fonksiyonel olan/olmayan bölgelerinde yer alan nt ve aa değişimlerinin birlikte gösterimi

78



1. GİRİŞ

Retroviruslar, omurgalılarda yaygın olarak bulunurlar. Büyük çoğunluğu inaktive edici mutasyonlardan etkilenir. Birkaçı, aktivasyonun ardından, ya eksojen viruslardan ayırt edilemeyen bir şekilde replikasyon yoluyla ya da replike olabilen virus ile rekombinasyonun ardından önemli biyolojik farklılıklar gösterebilir (ICTV, 2020).

Bovine Leukemia Virus (BLV) iki yaşından büyük sığırların neredeyse tüm organlarında tümör oluşumuyla ve lenfosit sayılarındaki artışla karakterize, sığırlarda önemli verim kaybına neden olan “Enzootic Bovine Leucosis” (EBL) enfeksiyonunun etkeni olan bir retrovirustur. EBL sığırların en sık görülen neoplastik hastalığıdır. EBL enfeksiyonu ilk olarak 1871 yılında tanımlanmış fakat 20. yüzyılın başlarında bazı Avrupa ülkelerindeki sığır sürülerinde yüksek insidense sahip benzer hastalık belirtilerinin gözlemlenmesi ile dikkat çekmiştir. Ancak hastalığın viral etiyojisi 1969 yılına kadar tanımlanmamıştır (MacLachlan ve Dubovi, 2011). Doğal enfeksiyon sığır (*Bos taurus*), zebu (*Bos indicus*), manda (*Bubalus bubalis*) ve kapıbaralarda meydana gelebilmektedir. Koyun, keçi, tavşan, tavuk gibi diğer türler de deneysel olarak enfekte edilebilmektedir (Schwartz ve Levy, 1994). Koyunlar, BLV enfeksiyonuna karşı oldukça hassastır ve enfeksiyonu takip eden 6 ay ila 7 yıl içinde vakaların %90'ından fazlasında lenfosarkom geliştiği bildirilmiştir (Mammerickx ve ark., 1988). BLV enfeksiyonu, aleukemik (AL) durumdaki sığırlarda klinik olarak sessiz kalabilir veya artan sayıda B lenfositleri ile karakterize persiste lenfositoz (PL) şeklinde ve daha nadiren de uzun bir latent dönemden sonra çeşitli lenf düğümlerinde B hücreli lenfomalar olarak ortaya çıkabilir (Tajima ve ark., 1998). Ayrıca BLV, azalan süt üretimi ve kilo kaybı, artan teşhis ve tedavi masrafları, azalan döl verimliliği ve kısa yaşam süresi gibi büyük ekonomik kayıplardan sorumludur. Bu tez çalışmasında, BLV pozitif tespit edilen retrospektif örneklerde Env, LTR ve pX gen bölgesi dizinlerinin elde edilmesi; gerek ülkesel ve gerekse uluslararası bilgi birikimine katkı sağlanması ve çalışılan gen bölgelerindeki mutasyonlara bağlı olarak

enfeksiyonun epidemiyolojisinde ve patogenetik mekanizmalar konusunda yaklaşımda bulunulması amaçlanmıştır.

1.1. Etiyoloji

Sığır löykozu ilk olarak 1871'de sığırların genişlemiş dalaklarında hafif sarı nodüllerin varlığı olarak rapor edilmiştir (Leisering, 1871). Miller ve Van Der Maaten (1976), sığırdan elde edilen lenfosarkoma doku kültüründe replike olan C tipi viral partiküller saptamış, Kettmann ve ark. (1976) ise BLV partiküllerinin RNA ekzojen virusları olduğunu ve bir RNA ters transkriptaz kompleksi taşıdığını göstermiştir. Devamında virusun ve virusa karşı oluşan antikorların tespitine dayalı birçok araştırma yapılarak etken 'Bovine Leukemia Virus' olarak adlandırılmış ve onkojenik retroviruslar arasında sınıflandırılmıştır.

1.1.1. Sınıflandırma

Retrovirus virionları küresel, zarflı ve 80-100 nm çapındadır. Glikoprotein yüzey çıkıntıları yaklaşık 8 nm uzunluğundadır. İç çekirdek viral nükleokapsiti oluşturur. Nükleokapsit çekirdeğin şekli ve konumu, tarihsel olarak retroviral cinslerin ana sınıflandırma özelliği olarak kullanılmıştır (Goff, 2013). Küresel nükleokapsit (nükleoid), Betaretrovirus cinsinin üyeleri için dış merkezli, Alpharetrovirus, Gammaretrovirus, Deltaretrovirus ve Spumavirus cinslerinin üyeleri için eş merkezli ve Lentivirus cinsinin üyeleri için çubuk veya kesik koni şeklindedir (ICTV, 2020).

Bovine leukemia virus; *Ortervirales* takımı, *Retroviridae* familyası, *Orthoretrovirinae* altfamilyasında ve Primat T-lenfotropik virusları ile birlikte *Deltaretrovirus* genusu içinde sınıflandırılmaktadır (ICTV, 2020).

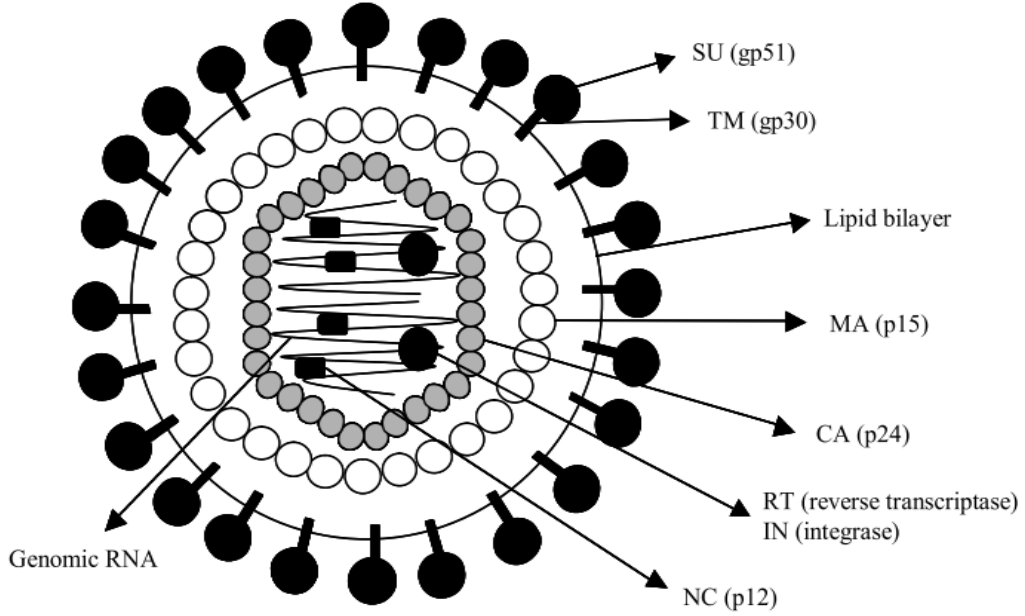
1.1.2. BLV Yapısı ve Genomu

BLV virionları çift iplikçikli DNA genomuna revers transkribe edilen ve provirus formunda konakçı genomuna entegre edilen diploid RNA genomu içerir. BLV genomu, linear, pozitif polariteli ve tek segmentlidir. Virion ikozahedral simetriye sahip, zarflı, 80-120 nm büyüklüğünde ve küresel görünümündedir (ICTV, 2020). Viral genomik RNA, iki özdeş dizinin bir homodimeri olarak mevcuttur ve bu nedenle virionlar fonksiyonel olarak diploiddir (Goff, 2013). Provirus, kapsit (*gag*) ve zarf proteinlerini (*env*) kodlayan genlerin yanı sıra enzimleri (*pol*), yardımcı proteinleri ve mikroRNA'ları içerir (Pluta ve ark., 2020). Kapsit proteinleri (CA (p24)), nükleokapsit proteinleri (NC (p12)) ile etkileşim halinde viral RNA'yı içeren bir kapsit oluşturur. Viral genomun ters transkripsiyon ve entegrasyonu için sırasıyla gerekli olan iki enzimatik protein (RT ve IN) de kapsite paketlenir. Matriks proteini (MA (p15)), bir viral protein kompleksinin (gp51 (SU) ve gp30 (TM)) yerleştirildiği hücrel kökenli bir lipid çift tabakası tarafından oluşturulan kapsiti ve dış zarfı birbirine bağlar (Gillet ve ark., 2007 ve ICTV, 2020) (Şekil 1.1). Enfeksiyöz virionlar, RNA içeren iki 38 S poli-A molekülünün birleşmesinden kaynaklanan 60-70 S ribonükleik asit içerir (Gillet ve ark., 2007). Virionlar ısıya, deterjana ve formaldehite duyarlıdır (Goff, 2013).

Genom, yapısal ve enzimatik proteinleri kodlayan *gag*, *pro*, *pol* ve *env* genleri, pX gen bölgesi ve iki özdeş 'Long Terminal Repeat' (LTR) içeren toplam 8714 nükleotitten oluşur, pX gen bölgesi ise Tax, Rex, R3 ve G4 bölgelerini içerir (Schwartz ve ark., 1994 ve Zhao ve ark., 2007b).

Ayrıca, BLV genomunda 7217 ve 8353 baz çiftleri arasında bölünmüş okumalar ile, eklenmiş bir transkriptin varlığı (Antisense 1, AS1), 2829 ve 8353 baz çiftleri arasında ikinci bir bölünmüş okuma setinde de ikinci bir transkriptin (Antisense 2, AS2) varlığı gösterilmiştir (Durkin ve ark., 2016). BLV antisens transkripsiyonunun varlığı, BLV LTR'nin (HTLV-1'deki gibi) her iki yönde de transkripsiyonu

sürdürebildiğini göstermiştir. Bu transkriptlerin hem lösemik hem de malign olmayan klonlarda tutarlı ifadesi, virusun yaşam döngüsünde ve tümör oluşturma potansiyelinde önemlidir.



Şekil 1.1. BLV virion yapısı (Gillet ve ark., 2007).

Env ve R3 genleri arasında kodlanan beş mikro RNA (miRNA) tespit edilmiştir (Kincaid ve ark., 2012 ve Rosewick ve ark., 2013). Virus tarafından kodlanan miRNA'lar ilk olarak DNA viruslarında tespit edilmiştir. Başlangıçta, Retrovirusların RNA genomlarının self-bölünme potansiyelleri nedeniyle miRNA'lar kodlamadıkları düşünülse de, yakın zamanda BLV'nin de kodladığı tespit edilmiştir. Bu viral mikroRNA'lar, dönüştürülmüş B hücrelerinde mikroRNA havuzunun ~%40'ını temsil eder. Viral miRNA'ların, BLV yaşam döngüsünde ve hücrel transformasyonda hayati bir role işaret ettiği bildirilmiştir. BLV genomu, *env* geninin 3' ucuna yakın ve önemli açık okuma çerçevelerinden yoksun bir proviral bölgeden beş miRNA hairpin kümesi kodlar. Bunlar Drosha bağımsız bir yoldan on miRNA'ya dönüşür (Gillet ve ark., 2016; Kincaid ve ark., 2012 ve Rosewick ve ark., 2013). BLV-miR-B4 BLV ile ilişkili tümör oluşumuna katkıda bulunur, ayrıca, miRNA'lar konak bağışıklığına

müdahale eder ve B-hücre farklılaşmasında rol oynayan genlerin ekspresyonunun azalmasıyla ilişkilidir (Pluta ve ark., 2021).

1.1.2.1. BLV *gag* geni

BLV *gag* geni 1178 nükleotitlik bir diziden oluşur ve yüksek oranda korunmaktadır. BLV *gag* geni öncü olarak Pr70Gag oluşumunu kodlar; daha sonra bu protein, matriks proteini (MA), kapsit proteini (CA) ve nükleokapsit proteini (NC) olmak üzere 3 olgun proteine dönüştürülür (Goff, 2013 ve Schwartz ve ark., 1994). Gag öncüsünün NH₂-terminal ucuna karşılık gelen MA proteini (p15), yedi amino asitlik bir ürün, p10 ve p4 olmak üzere üç parçadan oluşur ve fosforile edilmiş bir polipeptittir. MA proteinleri, genomik viral RNA'yı bağlar fakat aynı zamanda viral membranın lipid çift tabakası ile de etkileşime girer (Copeland ve ark., 1983 ve Gillet ve ark., 2007).

CA, BLV kapsitinin ana bileşenidir ve enfekte olmuş hayvanların serumunda bulunan yüksek antikor titreleriyle konakçı immun yanıtı için hedef olarak görünen, nötr ve orta derecede hidrofobik bir proteindir (Marcela ve ark., 2007). BLV CA'ya yönelik monoklonal antikorun kullanımı baz alınarak yapılan bir çalışmada, HTLV CA ile ortak bir epitopun paylaşıldığı bulunmuştur (Zandomeni ve ark., 1991). BLV ve HTLV-1'in kapsit antijenleri arasındaki bu çapraz reaktivite, iki virus arasında evrimsel bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. BLV ve kedi lösemi virusu (FeLV) NC proteinleri arasında immünolojik bir çapraz reaksiyon varlığı da bildirilmiştir (Yoshinaka ve ark., 1986). NC, paketlenmiş genomik RNA'ya sıkıca bağlı, prolin açısından zengin bir proteindir. Zn⁺² varlığında NC, nanomolar aralığında bir afinite ile tek sarmallı nükleik asitlerle etkileşime girer (Gilden ve ark., 1975).

1.1.2.2. *Pro* ve *Pol* Genleri

BLV genomunda yer alan diğer proteinler bir proteaz (PR, *pro* gen tarafından kodlanır), bir ters transkriptaz (RT, *pol* geni tarafından kodlanır) ve bir integrazdır (IN, *pol* geni tarafından kodlanır) (ICTV, 2020). Retroviral DNA, viral IN proteinini içeren bir mekanizma ile bir provirus oluşturmak için konağın kromozomal DNA'sına entegre olur. Entegre provirus, viral LTR'lerdeki transkripsiyonel sinyallere yanıt olarak hücrel RNA polimeraz II tarafından virion RNA ve mRNA türlerine kopyalanır. Tüm genomu içeren bir mRNA, *gag*, *pro* ve *pol* genlerinin translasyonuna hizmet eder. Bu, sırasıyla yapısal proteinleri, PR, RT ve IN'yi vermek üzere parçalanan poliprotein öncülerinin oluşumu ile sonuçlanır (ICTV, 2020 ve Katoh ve ark., 1989).

Olgun pol ürünü, 145 kDa'lık bir öncüden üretilir. *Pol* geni, N-terminal kısmında tercihen Mg^{+2} varlığında aktif olan RNA'ya bağımlı bir DNA polimerazı olan 80 kDa'lık RT kodlar, C-terminal kısmında bir RNAase H aktivitesi sunar (Kettmann ve ark., 1976 ve Schwartz ve ark., 1994). Aslında enzim, hem DNA polimeraz hem de RNase H aktivitelerinde Mn^{+2} yerine Mg^{+2} için bir tercih gösterir. Pol ürünü ayrıca bir bütünleştirici aktiviteye sahiptir. BLV RT enzimi, HIV-1 ters transkriptazının güçlü inhibitörleri olduğu bilinen nükleosit trifosfat analoglarına ise nispeten dirençlidir (Gillet ve ark., 2007).

1.1.2.3. *Env* Geni

BLV *env* kodlayan diziler, 51 nükleotit ile pol'ün 3' ucunda farklı bir çerçevede kısmen örtüşür ve *env* geni pr72 öncüsünü kodlayan 5.1kb'lık mRNA'ya transkribe edilir. Bu gen tarafından öncül olarak kodlanan poliproteinden (gp72), yüzey glikoproteini (gp51 (SU)) ile transmembran proteini (gp30 (TM)) oluşur (Voneche ve ark., 1992). SU ve TM, disülfid bağları yoluyla birleşir ve nispeten kararlı bir kompleks verir. Çok zayıf immünojenik olan gp30'un aksine, hücre dışı gp51, enfekte

hayvanlarda spesifik antikorların yoğun ekspresyonunu indükler ve bu durum teşhis ve aşı geliştirme için faydalı bir özelliktir (Gillet ve ark., 2007 ve McLachan ve Dubovi, 2011). *Env* gp51 glikoproteini hücreye giriş için gereklidir ve nötralizan antikorların oluşumunu uyarır. Glikoprotein gp51, N'-den C-terminal ucuna kadar G, H, F, E-E', B-B', D-D' ve A olarak adlandırılan yedi epitop içerir ve bunlardan üçü (G, H ve F) virus nötralizasyonunun ve sinsityum oluşumunun inhibisyonunun ana belirleyicileri olan konformasyonel epitoplardır (Bruck ve ark., 1982 ve Pluta ve ark., 2017). Ek olarak, üç nötralizasyon alanının (ND1, ND2 ve ND3) BLV-nötralize edici antikorları indüklediği gösterilmiştir. gp51'in N-terminali ve iç bölgeleri, BLV ile enfekte olmuş sığırlarda proliferatif tepkilerin indüklenmesinde rol oynayan bir CD4+ T hücre epitopu, bir CD8+ T hücre epitopu, sitotoksik T lenfositlerin (CTL) immünolojik hedefi gp51N5, gp51N11 ve gp51N12 T hücresi epitoplarını içerir (Pluta ve ark., 2017). Hücre füzyonu, yani sinsityum oluşumu, 64-73, 98-117 ve 177-192 peptitlere yönelik serumlar tarafından inhibe edilir. Enfekte ineklerden izole edilen lenfositlerin proliferasyonunu uyaran bu son dizi (özellikle gp51'in P177 ve D178 kalıntıları), bir T-yardımcı epitoptur (Gillet ve ark., 2007).

Günümüzde BLV gp51 kodlayan gen bölgesi, BLV genotiplendirme çalışmalarında kullanılmaktadır ve filogenetik çalışmalar BLV'nin en az 11 genotipte (genotip 1'den genotip 11'e kadar) sınıflandırılabilceğini göstermiştir (Polat ve ark., 2016; YU ve ark., 2019). Genotip 2, 5, 6 ve 9 çoğunlukla Güney Amerika ülkelerinde, 7 ve 8 genotipleri Rusya ve Doğu Avrupa ülkelerinde, genotip 10 Tayland, Çin ve Myanmar'da, genotip 11 Çin'de ve genotip 1, 3 ve 4 ise neredeyse tüm kıtalarda tespit edilmiştir (Fechner ve ark., 1997; Moratorio ve ark., 2010; Ochirkhue ve ark., 2016; Pandey ve ark., 2017; Polat ve ark., 2016; Polat ve ark., 2017; Yang ve ark., 2016 ve Yu ve ark., 2019).

BLV gp30, hidrofobik füzyon peptidini kapsayan hücre dışı bir alan ve sinyal iletim yollarında yer aldığına inanılan bir YXXL motifli sitoplazmik bir alan içerir (Pluta ve ark., 2017). BLV tarafından hücre teması olmadan meydana gelen bir enfeksiyon, büyük olasılıkla virion instabilitesi nedeniyle çok verimsiz olacağından,

ana bulaşma yolunun, yüzeyinde zarf proteinlerini barındıran enfekte bir hücre ile yeni bir hedef lenfosit arasındaki füzyon yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Transmembran proteini olan gp30 ise bu işlem sırasında kilit bir faktördür. Hücre füzyonundaki rolüne ek olarak, gp30 proteini sitoplazmik kuyrukta bulunan immunoreseptör tirozin bazlı aktivasyon motifleri yoluyla sinyal iletiminde rol oynar (Gillet ve ark., 2007).

1.1.2.4. 'Long Terminal Repeat' (LTR) Bölgeleri

BLV genomu 5' ve 3' uçlarda 'Long Terminal Repeat' (LTR) bölgeleri ile çevrilidir. Her bir LTR; U3, R ve U5 olarak adlandırılan üç bölgeden oluşur. U3, viral promotor ve promotor aktivitesinin düzenlenmesinde kritik olan birkaç düzenleyici element içerir ve BLV transkripsiyonunun indüklenmesinde önemli rol oynar (Gillet ve ark., 2007 ve Pluta ve ark., 2020). U3 bölgesi, kurallı promotör "CAT" kutusunu (-97 ila -92 koordinatlarında CCAACT) ve "TATA" kutularını (-44 ve -38 arasında GATAAAT) içerir (Gillet ve ark., 2007). Ana düzenleyici elementler, 5'-TGACGTCA-3' konsensus sekansı ile eşleşen, tam korunaklı olmayan döngüsel AMP-yanıt elementleri (CRE)'ni içeren üç tekrarlı 21-bp'lik Tax-responsive elementler (TRE) 'dir. HTLV-1 LTR tarafından paylaşılan bir özellik olan CRE-benzeri diziler (AGACGTCA, TGACGGCA, TGACCTCA), BLV LTR ile benzerdir ancak "TGACGTCA" konsensusunda ondan farklıdır. Koyunlarda ise enfektivite ve patojenite için bu TRE'lerden sadece ikisinin gerekli olduğu bildirilmiştir. CRE bölgeleri CREB (cyclic AMP response element binding) proteinleri gibi hücresel transkripsiyon faktörleri olan ATF-1 ve ATF-2 tarafından da kullanılır (Gillet ve ark., 2007 ve Kiermer ve ark., 1998). Virus tarafından kodlanan Tax transaktivatörü, CREB/ATF proteinlerinin bZIP domainleri (Basic Leucine Zipper Domain) ile etkileşime geçerek DNA bağlanma aktivitelerini artırır ve bu sayede BLV transkripsiyonunu pozitif yönde düzenler. Her bir TRE sekansı CRE elementlerinin yanında AP4 transkripsiyon faktörü için hedef sekans olan E box bölgesi içerir (Adam ve ark., 1994 ve Moratorio ve ark., 2013). U3 bölgesi ayrıca, transkripsiyonun

aktivasyonunda rol oynayan NF- κ B (nuclear factor- κ B) bağlanma bölgesi ile Tax varlığında deksametazona duyarlılık sağlayan GRE (glucocorticoid response element) ve ETS transkripsiyon faktör ailesi proteinleri için bağlanma bölgesi olan PU.1/Spi-B elementi gibi birkaç yanıt elementi daha içerir (Pluta ve ark., 2020).

Virus transkripsiyonunun düzenlenmesine dahil olan diğer bir dizi, R (tekrarlanan) bölgesi, RNA'da iki kez mevcut olduğu için bu isimle adlandırılmış ve 5' uçta ve 3' uçta konumlanmıştır. LTR 5' R'nin aşağı yönünde, proviral entegrasyon için gereken ATT bölgelerinden birini içeren ve U5 olarak adlandırılan başka bir dizi bulunur. U5 bölgesini, bir konakçı tRNA'nın genoma hibridize edildiği 18-nt'lik bir dizi olan primer bağlanma bölgesi ve negatif iplikli-DNA sentezinin başlama bölgesi takip eder (Goff, 2013). R ve U5 bölgeleri, sırasıyla USF (upstream stimulatory factor), DAS (downstream activator sequence) ve IRF (interferon regulatory factor) bağlanma bölgelerini içerir (Moratorio ve ark., 2013 ve Pluta ve ark., 2020). DAS bölgesi, Box A, Box B ve Box C olmak üzere üç kısımdan oluşur (Pluta ve ark., 2020). U5'teki interferon düzenleyici faktör bağlama bölgesi, IRF-1 ve IRF-2 ile etkileşime girer ve Tax yokluğunda bazal ekspresyonu uyarır. Viral transkripsiyonun bu nedenle 5' LTR boyunca dağıtılan çok sayıda bölge tarafından düzenlendiği gözlemlenmektedir (Gillet ve ark., 2007).

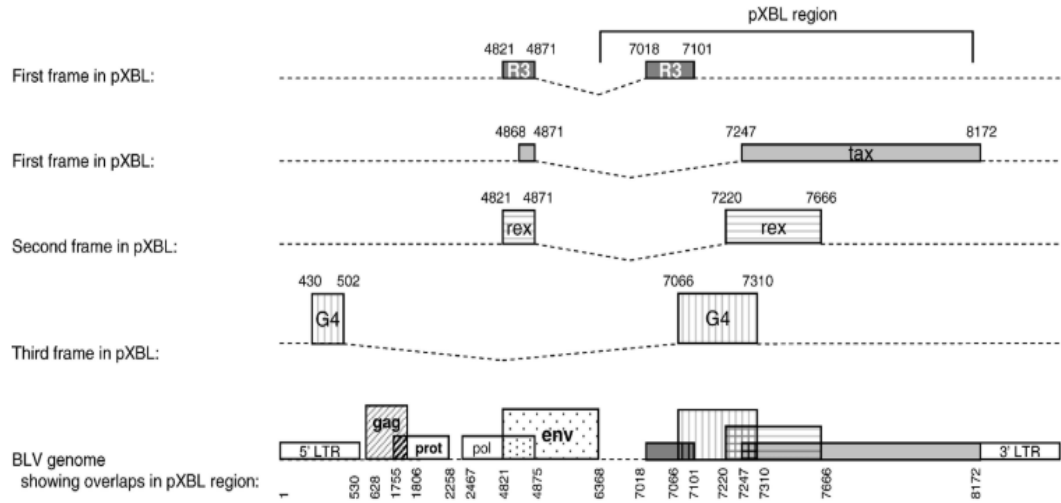
BLV LTR bölgesindeki sekans değişikliklerinin, transkripsiyon faktörleri ile etkileşimleri etkileyebileceği ve böylece viral genlerin ifade edilmesinde ve virus replikasyonunda değişikliklere yol açabileceği bildirilmiştir. Benzer olarak lentiviral LTR'lerdeki mutasyonların HIV-1 ve küçük ruminant lentivirusun transkripsiyonal aktivitelerinde de belirgin farklılıklara yol açtığı bildirilmiştir (Pluta ve ark., 2018). Kuzey Amerika, Kosta Rika, Japonya ve Belçika'dan elde edilen izolatların 5' LTR sekanslarında, korunaklı bölge olmalarına rağmen önemli değişiklikler tespit edilmiş ve 7 genetik grupta gruplandırılmıştır (Zhao ve ark., 2007a). Brezilya izolatları ile yapılan bir çalışmada ise çoğunlukla R ve U5 bölgesinde nükleotit farklılıkları saptanmış ve bu sekansların beş farklı gruba ayrıldığı bildirilmiştir (Hirsch ve ark., 2015). Pluta ve ark. (2021) ise LTR gen dizinlerinin filogenetik ağaçta *env* gen dizinleri ile uyumlu şekilde coğrafik bölgelere göre ayrıldığını bildirmiştir. Son

yıllarda yapılan çalışmalara dayanılarak LTR bölgesi çeşitliliğinin BLV virulensinde, patogeneğinde ve epidemiyolojisinde meydana gelen değişiklikler ile ilişkili olduğu bildirilmiş olup, konuyla ilgili *invivo* ve *invitro* çalışmalar önem kazanmıştır (Hirsch ve ark., 2015; Moratorio ve ark., 2013 ve Pluta ve ark., 2018).

‘Hormone response element’ (HRE), bir genin promotör bölgesinde, spesifik hormon reseptörlerinin bağlanmasına ve transkripsiyonu yönetmesine izin veren kısa bir dizidir. Bir tür HRE olan, GRE, ilk olarak ‘mouse mammary tumor virus’ (MMTV)’ de, LTR olarak adlandırılan promotör bölgesinde tanımlanmıştır ve glukokortikoid hormon reseptör kompleksleri tarafından düzenlenen bir transkripsiyonel güçlendirici olarak hareket ettiği kanıtlanmıştır (Niermann ve ark., 1997).

1.1.2.5. pX Gen Bölgesi

BLV, örtüşen okuma çerçeveleri ile dört düzenleyici proteini kodlayan genlerin 3’ kısımlarını bulunduran bir pX bölgesi içerir. Bu bölge; viral ve hücrel transkripsiyonun bir aktivatörü olan ve malign transformasyondan sorumlu olan **Tax**, viral RNA’ları transkripsiyon sonrası bağlayan ve stabilize ederek translasyonunu kolaylaştıran **Rex** ve muhtemelen kalıcı enfeksiyon sırasında yüksek viral yüklerin korunmasından sorumlu olan **R3** ve **G4** yardımcı proteinlerini kodlayan gen bölgelerini içerir (Arainga ve ark., 2012 ve Zhao ve ark., 2007b). Dört proteini kodlayan genlerin 5’ kısmı, pX bölgesinin 1500-6000 nükleotit yukarı yönünde, BLV genomunun LTR (G4) veya *pol-env* bölgesinde (R3, Rex, Tax) kodlanır (Zhao ve ark., 2007b) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. BLV pX bölgesinin genomik yapısı ve dört BLV düzenleyici genin 5' bölümünün yerleri ve pX bölgesindeki üç okuma çerçevesi (Zhao ve ark., 2007b).

Bir pX geninde/alt bölgesinde mevcut olan her nükleotitin (A, T/U, C, G) yüzdesi araştırıldığında toplam sitozin (C) yüzdesinin, dört gendeki dört nükleotitin en yükseği olduğu tespit edilmiştir. Diğer retroviruslar da (örneğin; lentiviruslarda bir A yanlılığı), retroviral filogeni ile ilgili başka nükleotit yanlılıklarına sahiptir (Bronson ve ark., 1994 ve Zhao ve ark., 2007b). Rex geninin, diğer genlerle karşılaştırıldığında (sırasıyla R3, G4 ve Tax için (sırasıyla %34,4, 34,1 ve %36,8)) en yüksek toplam C yüzdesine (%37,3) sahip olduğu bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2007b).

Tax geni: BLV'nin ifadesi, viral transkripsiyonel aktivatör Tax tarafından düzenlenir. Tax'ın tanımlanan ilk işlevi, viral transkripsiyonun aktivasyonudur. Tax'ın transkripsiyon işlem mekanizması, 5' LTR'deki 21 bp arttırıcı elementlere bağlanan CREB gibi hücrel transkripsiyon faktörleri ile etkileşimi gerektirir. BLV Tax ayrıca, CREB/ATF ailesi üyeleriyle etkileşiminin yanı sıra, nükleozomal histonların hedeflenen asetilasyonu yoluyla BLV transkripsiyonunu kolaylaştırmak için histon asetiltransferazlarla etkileşime girebilir. Tax proteininin bilinen işlevsel alanları, 'Zinc finger domain', lösin açısından zengin bir aktivasyon alanı (L-rich domain), 'multifunctional domain' ve iki fosforilasyon bölgesidir (Pluta ve ark., 2020). Çoklu biçimde eklenmiş 2,1 kb'lık mRNA tarafından kodlanır. Tax translasyonunun başlangıcı, *pol* geninin stop kodonunun hemen yukarısında bulunan bir metionin

(ATG) kalıntısında bulunur. Ayrıca Tax proteini, sırasıyla 110-130/131-150 ve 261-280 bölgelerine karşılık gelen B ve T epitopları ile konakçı immün yanıtının bir hedefidir. Tax proteini prolin (%13) ve lösin (%16) kalıntıları açısından zengindir ve nispeten kısa bir yarı ömre sahiptir (5 ila 6 saat). Esas olarak çekirdekte olmakla birlikte sitozolde de önemli miktarda bulunur (Gillet ve ark., 2007). Alpharetrovirus ve Gammaretrovirus cinslerine ait olan hayvan retrovirusları, "viral onkogen" in aktivasyonu ile ya da bir proto-onkogen gibi bir hücresel genin "insersiyonel aktivasyonu" ile olmak üzere iki mekanizmadan biriyle tümörleri indükler. Buna karşın, BLV bilinen bir onkogene sahip değildir ve konakçı hücre genomlarında tercih edilen, konak genin bozulmasıyla ilgili olan ancak viral gen ekspresyonunun baskılanmasına yol açmayan bölgelere entegre olmaz. Tax'ın, BLV ile indüklenen - lösemilerde tek bir mutant hücreden köken alan kemik iliği öncül hücrelerinin klonal bir bozukluğu olarak tanımlanan- lösemogenez de kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir ve ilgili çoğu çalışma Tax proteinine odaklanmıştır (Aida ve ark., 2013 ve Arainga ve ark., 2012). Tax proteini, hastalığın ilerlemesini indükleyen ilk onkojenik transaktivatör olarak tanımlansa da, Tax aktivasyonu maligniteyi provoke etmek için yeterli değildir. Hücre onkogenlerinin aktivasyonu, hücre hayatta kalma yolları ve büyüme faktörlerinin indüksiyonu gibi birçok konakçı faktör maligniteye veya progresyona etki eder. Tax proteini, IL-2, IL-2Ra, GM-CSF, IFN- γ , AP-1, NF- κ B, siklinler (CYC) ve CYC kinaz (CDK) molekülleri gibi birçok büyüme faktörünü ve hücre döngüsü aktivatörlerini aktive ederek patogenez ve lösemogenez için temel sağlar (Arainga ve ark., 2012 ve Ashrafi ve ark., 2020).

Zhao ve ark. (2007b), yaptığı çalışmada; tümü BLV pX bölgesinde bulunan ve düzenleyici proteinleri kodlayan R3, G4, Rex ve Tax 3' kısımları için Tax'ın en yüksek ortalama nükleotit varyasyon oranına sahip olduğunu bildirmiştir (R3, G4 ve Rex, Tax için sırasıyla; %1,24, %1,29, %1,40 ve %1,86). Bununla birlikte, Tax proteininin en düşük ortalama amino asit varyasyon oranına sahip olduğu tespit edilmiştir (R3, G4, Rex ve Tax proteinleri için sırasıyla; %3,73, %3,18, %3,38 ve %2,12).

Tajima ve Aida (2000), PCR ile BLV ile enfekte sığırlardan alınan *tax* genlerini çoğaltarak ürünlerin transkripsiyonel aktivitelerini izledikleri çalışmalarında, 240 ve

265 aminoasitleri arasında en az bir amino asit değişikliği olan yedi bağımsız mutant Tax proteinin, viral LTR-yönelimli transkripsiyonu uyarmak için vahşi tip Tax proteininden belirgin şekilde daha güçlü bir yetenek sergilediğini bildirmiştir. Bu durumun, 240 ve 265 amino asitleri arasındaki tek bir aa değişikliğinin sadece Tax proteininin transaktivasyon aktivitesini uyarmakla kalmayıp, aynı zamanda diğer LTR'lerdeki hedef diziler için spesifiklik açısından toleransı da arttırdığı bildirilmiştir.

Van Den Broeke ve ark. (1999), yaptığı çalışmada, Tax genomunda stratejik olarak yerleştirilmiş tek bir mutasyonun, B hücreli tümörlerde BLV inaktivasyonu için bir mekanizma sağladığını göstermiştir. Ayrıca 30 ve 50. aminoasitler arasındaki üç sistein ve iki histidin kalıntısının *tax* geninin düzgün transaktivatör fonksiyonu için kritik olduğu ve sistein ile histidinin, glisin ve alanine dönüşümünün proteinin bu fonksiyonunu kaybetmesine neden olduğu bildirilmiştir (Panei ve ark., 2013). Durkin ve ark. (2016) ise Tax'ın maligniteyi sürdürmek için gerekli olmadığını ancak dönüştürülmüş hücrelerde Tax'ın yokluğunun BLV'lerin immun sistemden kaçınma stratejisinde hayati bir rol oynadığını bildirmiştir. Ayrıca, hem antisens transkriptlerinin hem de mikroRNA'ların kalıcı üretiminin, tümör oluşumunda temel bir fonksiyona işaret ettiği ancak, bu transkriptlerin etkili bir konakçı bağışıklık tepkisi ortaya çıkartmadığı düşünülmektedir.

Rex geni; Rex geni tarafından kodlanan Rex proteini, viral RNA'nın çekirdekten taşınmasından sorumludur ve BLV ile enfekte hücrelerde viral mRNA'ların translasyonuna ve sitoplazmada birikimlerine öncülük eder. Rex geni viral RNA'yı stabilize ederek translasyonunu kolaylaştırır ve viral replikasyonun post-transkripsiyonal düzenleyicisidir (McGirr ve Buehring, 2005 ve Stott ve ark., 1991). Tüm BLV RNA'ları erken ekspresyon sırasında çekirdekte bulunur, ancak yapısal proteinler özellikle sitoplazmada yoktur. Bu bölümlendirme, ekspresyonun geç aşamasında, muhtemelen konakçı hücre proteinleri ile uyum içinde olan Rex tarafından sağlanır. Rex gen bölgesi 'nuclear export signal' (NES) ve nuclear localization signal' (NLS) bölgelerini barındırır (Choi ve ark., 2005).

Rex geninin %5'ten daha az bir varyasyonla korunduğunu bildiren bir çalışma (Choi ve ark., 2005) olmakla birlikte, Japonya, Belçika, Avusturalya ve Arjantin'den elde edilen izolatların *rex* gen bölgesi aminoasit varyasyonunu %11 oranında bildiren çalışma da mevcuttur (McGirr ve Buehring, 2005).

R3 ve G4 genleri: R3 ve G4 proteinlerini oluşturan R3 ve G4 geni ORF'ları, *env* ve *tax/rex* genleri arasında yer alan bir ara bölgeye aittir. R3 mRNA'sı bisistroniktir; ilk iki ekson, Tax/Rex proteinleri için ortaktır ve ekleme, R3 ORF'unun ortasında meydana gelir. G4 mRNA'sı, G4'ün 5' ucunda yer alan yalnızca bir intron içerir. Bu mRNA'ların in vitro translasyonu, R3 ve G4 için sırasıyla 5,5 kDa ve 11,6 kDa'lık proteinler oluşturur. G4 translasyonunun başlatılması, LTR/R bölgesinde bir CUG kodonunda gerçekleşir. R3, hem Rex proteininin hem de Tax proteininin AUG'sini paylaşır. Dolayısıyla R3, Rex'te de bulunan 17 amino asit ve R3 ORF'undan 27 amino asit içerir (Gillet ve ark., 2007 ve Mamoun ve ark., 1985). R3 5' kısmı ayrıca, BLV yaşam döngüsünde önemli rol oynayan Env proteinini kodlayan *env* geninin başlangıcıyla aynıdır (Zhao ve ark., 2007b). G4 proteini amino asit dizisi, 'Leader peptide' (1-24 aa) ve proteinin ortasında yer alan arginin açısından zengin bir bölgeyi 'arginine-rich region' (ARR) (amino asitler 58-70) içerir (Dube ve ark., 2009 ve Moratorio ve ark., 2013). Bu son bölge, G4'ün hücresel protein farnesil pirofosfat sentetaz (FPPS) ile etkileşimi (fosforilasyon) için gereklidir. G4'ün arginin açısından zengin α -sarmalındaki mutasyonların, çıplak farelerde (nude mouse) primer hücre ölümsüzleşmesini ve tümörlerin indüklenmesini ortadan kaldırdığı, bu nedenle, G4 ve FPPS arasındaki etkileşimin bozulmasının onkojenik sürece müdahale edebileceği bildirilmiştir (Moratorio ve ark., 2013).

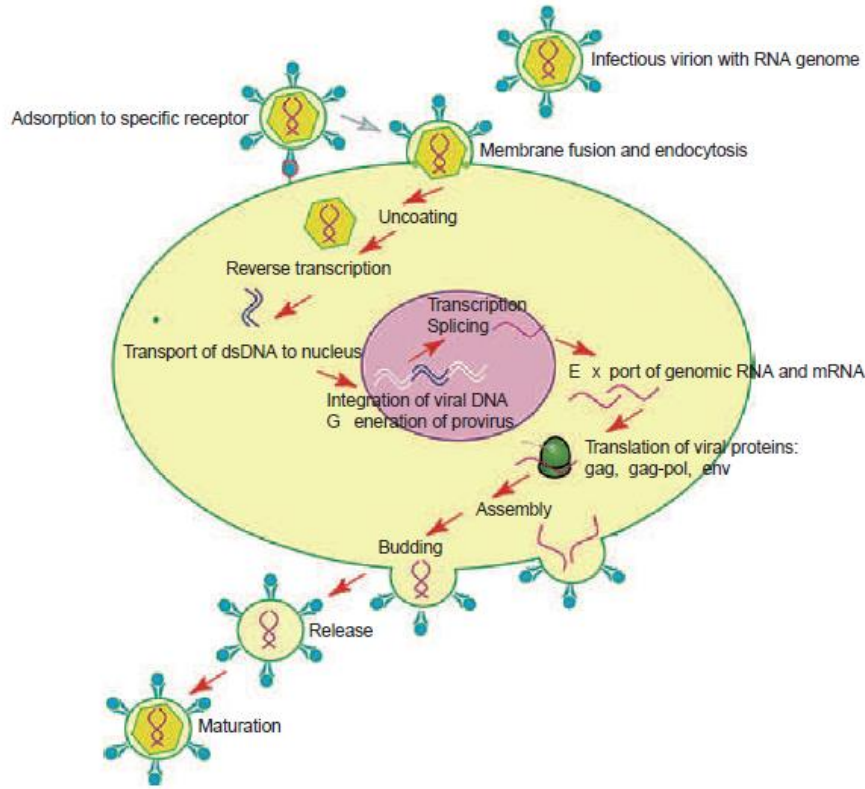
R3 ve G4 genleri olmayan mutant provirusların infektivitelerinin devam ettiği; dolayısıyla bu genlerin infektivite için şart olmamakla birlikte, konakçıda etkili virus yayılımını sağladıkları ve yüksek viral yükün korunmasında katkıda bulundukları saptanmıştır. G4 geni in vivo ortamda temel olarak lösemi fazında ifade edilmektedir ve primer embriyonik fibroblastları ölümsüzleştirebildiği için özellikle lökomogenez ile ilişkilidir (Marcela ve ark., 2007; Panei ve ark., 2013 ve Polat ve ark., 2016). pBLVIX provirusunun neden olduğu patolojinin, BLV genomundaki bazı bölgelerin

lökomojenik potansiyeli etkilemeden silinebileceğini gösterdiği, buna karşılık, G4 gen dizilerinin silinmesinin, BLV virusunun tüm enfekte hayvanlarda hem lösemi hem de lenfosarkomu indüklemeye yeteneğini tamamen ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (Kerkhofs ve ark., 1998).

1.1.3. BLV Transkripsiyon ve Replikasyonu

BLV'nin ana hedefi, immüoglobulin M'i eksprese eden bir B lenfositidir. B lenfositlerine ek olarak BLV, monosit/makrofaj hücrelerinde de varlığını sürdürmektedir (Gillet ve ark., 2007). Retroviruslar karmaşık bir yaşam döngüsü boyunca çoğalır. Bu döngünün adımları;

- Reseptör bağlanması ve membran füzyonu
- Zarftan arınma
- Çift sarmallı lineer DNA oluşturmak için RNA genomunun ters transkripsiyonu
- DNA'nın çekirdeğe girişi
- Provirusu oluşturmak için lineer DNA'nın entegrasyonu
- Viral RNA'lar oluşturmak için provirusun transkripsiyonu
- RNA'ların eklenmesi ve çekirdekten çıkarılması
- Öncü proteinler oluşturmak için RNA'ların dönüştürülmesi
- Virionun birleştirilmesi ve viral RNA genomunun paketlenmesi
- Virionların tomurcuklanması ve salınması
- Öncülerin proteolitik işlenmesi ve virionların olgunlaşması şeklinde özetlenebilir (Goff, 2013) (Şekil1.3).



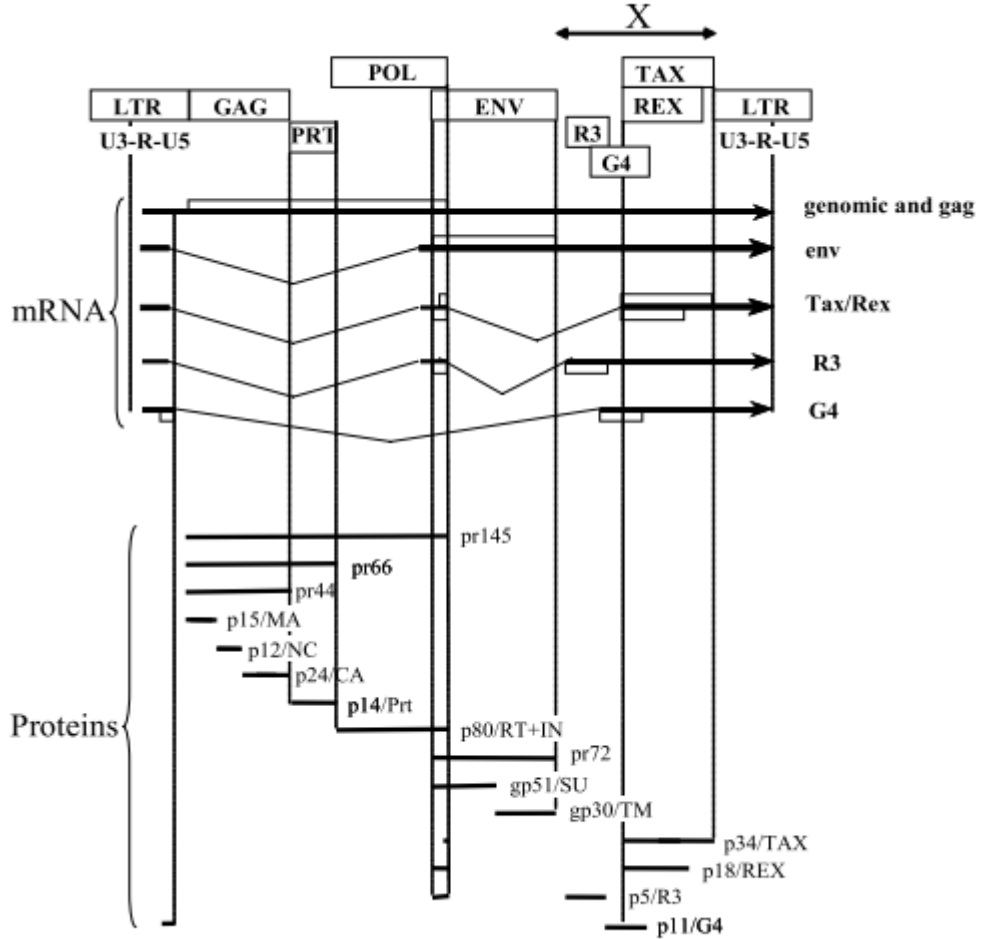
Şekil 1.3. Retrovirus yaşam siklusu (Goff, 2013).

Retroviruslar reseptör olarak olağanüstü çeşitlilikte hücre yüzeyi molekülleri kullanır. Belirli bir virus tarafından kronik olarak enfekte olan hücreler, farklı bir reseptör kullanan viruslar tarafından kolayca enfekte olabilir ancak, ilk virus tarafından kullanılan ile aynı reseptörü kullanarak girmesi gereken herhangi bir virus tarafından enfekte olamazlar. Bunun nedeni, ilk virus tarafından *env* proteininin ekspresyonunun hücre içi olarak reseptöre bağlanması, hücre yüzeyine taşınmasını veya yeni uygulanan virus için bir reseptör olarak işlevini engellemesidir. Bu fenomen, ortak bir reseptör kullanan virusların hızlı bir şekilde sınıflandırılmasını sağlar. BLV'nin kullandığı reseptör, AP-3 kompleksinin delta alt birimine oldukça benzerdir. AP-3, klatrin kaplı veziküllerin hücre içi taşınmasında rol oynar ve hücre yüzeyinde mevcut değildir (Goff, 2013 ve McLachan ve Dubovi, 2011).

Viral RNA genomunun bir dsDNA formuna ters transkripsiyonu, retrovirusların ayırt edici özelliğidir ve virusların ismi bu adımdan gelmektedir. Ters transkripsiyonun

seyri karmaşık ancak son derece düzenlidir. DNA sentezinin başlatılmasını ve son üründe dizin parçalarının çoğaltılmasıyla sonuçlanan DNA ara ürünlerinin translokasyonunu içerir. Ters transkripsiyon işlemi, primer bağlanma bölgesi olarak adlandırılan tamamlayıcı bir dizide viral RNA genomunda bir primer tRNA'nın eşleştirilmiş 3'OH'sinden başlatılır. DNA, (-) iplikli DNA dizileri oluşturmak için şablon olarak (+) iplikli RNA genomu kullanılması ile ilk olarak bu primerden sentezlenir. Sentez, LTR gen bölgesinin U5 ve R dizilerini oluşturmak için RNA'nın 5' ucuna doğru gerçekleşir (Goff, 2013). BLV provirusu, özdeş LTR'ler ile çevrilidir ve gag, pro, pol ve Env'ye karşılık gelen ORF'ları içerir. Env ve 3' LTR arasındaki pX bölgesinde Tax, Rex, R3 ve G4'ü kodlayan birkaç ORF bulunur. Genomik RNA transkripti sırasıyla 5' ve 3' LTR'lerde başlar ve biter. Bu genomik RNA, revers transkriptaz, RNase H ve integras aktiviteyi barındıran ve yapısal ve enzimatik proteinler olan; MA (p15), CA (p24), NC (p12), proteaz (p14) ve p80 (RT/IN) dönüşen gag-prt-pol öncüllerinin (pr145, pr66 ve pr44) ifadesi için bir şablon görevi görür. Genomik RNA, MA ve NC proteinleri ile etkileşime girer ve primer bağlanma bölgesini çevreleyen bir bölge boyunca dimerleşir. RNA dimerizasyonuna, U5'i barındıran bölge, primer bağlanma bölgesi ve hemen aşağısındaki 30 baz aracılık eder (Gillet ve ark., 2007; Katoh ve ark., 1993 ve Kurg ve ark., 1995). Translasyondan sonra, pr72 öncüsü hücre dışı gp51 ve transmembran gp30 glikoproteinleri olmak üzere iki alt birimde bölünür (Şekil 1.4). Tax/Rex haberci RNA'sını oluşturmak için görevli intron bölünür. Bu ikiye bölünmüş RNA, hem pol'ün sonunda bir başlatma kodunu kullanarak p34 Tax proteinini hem de Env pr72 ile aynı AUG'yi paylaşan ve RNA'nın çekirdekten sitoplazmaya taşınmasına aracılık etmek için gerekli olan Rex'i kodlar. R3 proteini, aminoterminal ucunu Rex ve pr72 ile paylaşır. G4 proteini, 5'LTR'nin R'sinde bulunan bir suboptimal CUG kodonunda başlar (Gillet ve ark., 2007). Viral RNA paketlenmesi ise, Pr145 gag-pol'ün hem MA hem de NC alanlarının, özellikle de MA'nın temel kalıntılarının yanı sıra NC'nin zincir finger domain kalıntılarının dahil edilmesini gerektirir (Gillet ve ark., 2007 ve Goff, 2013). RNA'nın etkili bir şekilde kapsidasyonu primer bağlanma bölgesi ile gag başlangıç kodunun yakınında çevrilmemiş lider bölgede bulunan bir birincil sinyal ile gag geninin 5' ucu içinde ikinci bir parça olmak üzere iki bölge gerektirir ve her iki bölge de verimli paketlenme için gerekli olan ikincil yapılara katlanır. Birincil kapsülleme sinyali,

hücreleriz dimer oluşumu için önemli bir yapı ile örtüşmez, ancak MA ile etkileşime giren bir bölgeye uyar (Gillet ve ark., 2007; Jewell ve Mansky, 2005 ve Kurg ve ark., 1995).



Şekil 1.4. BLV provirusunun yapısı: genler, RNA transkriptleri ve viral proteinler (Gillet ve ark., 2007).

1.2. Epidemiyoloji

BLV enfeksiyonu ülkeden ülkeye değişiklik gösteren prevalans oranları ile birçok ülkede tespit edilmiştir. Özellikle süt sığırcılığı endüstrisinde fertilitenin azalması, süt üretiminde azalma ve uluslararası ticarete kısıtlamalar gibi önemli

olumsuz etkiler oluşturmaktadır. BLV'nin sebep olduğu en belirgin ekonomik kayıp buzağı üretim potansiyelindeki düşüş ve lenfosarkoma/lösemi sebebiyle yaşam süresinin kısılmasıdır. Ancak klinik belirtilerin belirgin olmaması ve lenfosarkom/lösemi nedeniyle ölümün her zaman kolay tespit edilememesi sebebiyle ekonomik maliyet genellikle göz ardı edilmektedir. Bir hayvanı üretimde değiştirme maliyeti, teşhis ve veteriner bakımı ve yaklaşık 10 ay boyunca buzağı ve süt üretimi kaybı gibi dolaylı kayıplar da dikkate alındığında, BLV enfeksiyonunun işletme/ülkesel bazda neden olabileceği ekonomik kayıpların çok yüksek düzeylere ulaşabileceği bildirilmektedir (Juliarena ve ark., 2017). Bu nedenle birçok ülkede eradikasyon çalışmaları yapılmaktadır ancak enfeksiyonun sığırlar arasındaki yüksek prevalansı ve eliminasyonunun yüksek maliyette olması eradikasyonunu güçleştirmektedir (Lee ve ark., 2016). Özellikle Kuzey Amerika ve Güney Amerika ülkelerinde olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde enfeksiyonun yüksek oranda (%90) varlığının devam etmesine karşın Fransa, Almanya, İsveç, İspanya, Danimarka, İsviçre, Birleşik Krallık, Belçika ve diğer bazı ülkeler resmi olarak BLV'den ari ilan edilmiştir (Gregory ve ark., 2017 ve LaDronka ve ark., 2018). İtalya, Polonya ve Portekiz gibi diğer bazı ülkeler ise kendi bölgelerinin geniş alanlarda BLV'den ari olduğunu, enfeksiyonun küçük alanlarda varlığını sürdürdüğünü bildirmiştir (Juliarena ve ark., 2017 ve Voges, 2012). Mousavi ve ark. (2014), İran'ın kuzeydoğusunda BLV prevalansı %25,4 olarak bildirmiştir. Avustralya ve Yeni Zelanda'da süt sürülerinde BLV'nin eradike edildiği bildirilmiştir (Voges, 2012).

Türkiye'de EBL ile ilgili ilk bulgular 1962 yılında kaydedilmiştir (Hakioğlu, 1962). Günümüze kadar Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmalarda gerek halk elinde bulunan ve gerekse kamuya ait işletmelerde yetiştirilen sığırlarda enfeksiyonun değişen oranlarda varlığı serolojik olarak saptanmıştır. Ülkemizde EBL, 22.01.2011 tarihli resmi gazetede yayınlanan Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na ait “İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları ve Bildirimine İlişkin Yönetmelik” uyarınca ihbarı mecburi hastalıklar listesine eklenmiştir ve hastalığı kontrol altına almak için karantina ve serolojik tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Ülkemizdeki çiftlik sahiplerinin sığırları sürüye sokmadan önce hayvanları nadiren BLV enfeksiyonu için

test ettiği düşünölmektedir. Bir çalışmada, enfekte süt iftliklerinin yaklaşık %60'ının (79/132) başka çiftliklerden sığır getirdiği bildirilmiştir (şevik ve ark., 2015).

Akça ve ark. (1996), Türkiye 'nin değişik yerlerinde kamuya ait dokuz süt sığircılığı işletmesinde bulunan 2-11 yaş arasındaki 409 sığırdan alınan kan serumları ve süt örneklerini AGID testi ve ELISA kullanılarak BLV spesifik antikorları yönünden kontrol etmiş ve toplam 409 süt sığırından 31 (%7,6) adedi AGID testi ile, 59 (%14,4) adedi ELISA ile EBL enfeksiyonu yönünden pozitif bulunduğunu bildirmiştir.

Burgu ve ark. (1990), 3 ayrı süt sığircılığı ünitesinden (Karacebey Tarım İşletmesi / K. ünitesi, Çukurova Tarım İşletmesi / . ünitesi, Polatlı Tarım İşletmesi / P. ünitesi) 1- 14 yaşları arasındaki költür ırkı süt sığırlarına ait (İsviçre esmer ve Holstein ırkları) kan serumları AGID testi ile kontrol edilmiş ve K.ünitesinde kontrol edilen 1750 sığırdan 579'u (% 33,08), . ünitesinde 496 sığırdan 147'sini (% 29,63) pozitif bulmuş, ayrıca işletmelerde toplam 47 boğadan dört tanesinin EBL antikorları taşıdığını bildirmiştir.

Uysal ve ark. (1998), Marmara bölgesindeki Trakya ilçesinden 77 işletmeye ait 481 sığırdan alınan kan örneklerini EBL için serolojik olarak test etmiştir. Kontrol edilen işletmelerden dokuz işletmeye ait 51 sığır serumunda (%11) BLV'ye karşı antikor tespit edilmiştir.

Batmaz ve ark. (1999), Güney Marmara Bölgesi'nde (Bursa, Balıkesir ve Çanakkale) altı aylıktan büyük 717 sığırdan kan (362) ve süt (355) örnekleri olarak ELISA ile BLV antikor varlığı yönünden test etmiş ve örneklenen 69 sığırda (%9,62) BLV gp51 antijenine karşı antikor tespit edilmiştir. Test edilen serum ve süt örneklerinde BLV pozitiflik oranı sırasıyla %13,25 ve %5,91 olarak bildirilmiştir.

Özgönlük ve ark. (2005), Güneydoğu Anadolu projesi (GAP) kapsamında yer alan dokuz ilde (Siirt, Diyarbakır, Batman, Adıyaman, şanlıurfa, Gaziantep, Kilis,

Mardin ve Şırnak) halk elinde yetiştirilen, rastlantısal olarak seçilmiş sığırlardan alınan kan serumlarını, BLV'ye spesifik antikorlar yönünden AGID yöntemi ile test etmişlerdir. Örneklenen popülasyonda BLV enfeksiyonunun seroprevalansı %0,27 (2/740) olarak bildirilmiştir.

Yıldırım ve Burgu (2005), Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde bulunan sekiz ilde (Iğdır, Ağrı, Kars, Erzurum, Bayburt, Gümüşhane, Artvin, Ardahan) sığırlarda IBR, BVD, BT, PI-3 ve EBL enfeksiyonlarının seroprevalansları araştırmak için yaptığı çalışmada, AGID testi ile EBL seropozitifliğini %1,58 oranında tespit etmiştir.

Tan ve ark. (2006), BHV-1 ve BLV antikorlarının prevalansını belirlemek için, beş süt sığırı işletmesinden toplanan 313 serum örneğini, virus nötralizasyon ve AGID testi kullanarak BHV-1 ve BLV'ye karşı antikorların varlığı açısından test etmiş, BLV enfeksiyonunun prevalansını %0,3 olarak bildirmiştir.

Bilge-Dağalp ve ark. (2008), Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde bulunan altı süt sürüsünden elde edilen 1984 adet serum örneğinde, serum nötralizasyon tekniği ile BHV-1 ve BVDV'ye karşı nötralize edici antikorlar ve AGID testi ile de BLV'ye karşı antikorları taramış, BLV enfeksiyonunun seropozitiflik oranını %37,15 olarak bildirmiştir.

Bulut ve ark. (2009), doğal enfekte bir sürüde BLV enfeksiyonunun varlığı nested-PCR ve iki farklı ELISA kitiyle araştırılmış, her iki ELISA sonucunda, % 21,5 BLV seropozitifliği belirlemişlerdir. Nested-PCR neticesinde ise; toplam 16 (% 24,6) örnekte BLV proviral DNA varlığını tespit edilmiştir.

Acar ve ark. (2013), Afyonkarahisar ilinde, merkezden ve 17 ilçeden 6,631 erişkin sığır BLV tespiti için örneklemiş ve test edilen 6,631 sığırın 1,025'i (%15,45) BLV pozitif olarak bildirilmiştir.

Şevik ve ark. (2015), Türkiye'deki süt sığırcılığı işletmelerinde BLV'nin seroprevalansı ile ilgili risk faktörlerini değerlendirmek için yaptığı sero-epidemiolojik çalışmada; süt sığırcılığı işletmelerinin %11,8'inde BLV ile enfekte sığır olduğunu ve sürülerde seropozitif sığır prevalansının %3,1 ile %26,6 arasında değiştiğini bildirmiştir. 2006'dan 2013'e kadar, İç Anadolu Bölgesi'nde BLV prevalansı ise %0,8 ile %2,5 arasında bildirilmiştir.

Türkiye'de BLV moleküler karakterizasyonuna ilişkin ilk rapor ise Alkan ve ark. (2011) tarafından bildirilmiştir. Çalışmada, Türkiye'de üç farklı coğrafi bölgede bulunan dört sığır sürüsünden BLV'lerin dizi analizi için alınan kan örneklerinde BLV *env* ve *gag* gen bölgelerinin değişkenliği incelenmiş, *env* gen dizilerinin, Brezilya, Arjantin ve Japonya'da saptanan BLV suşlarıyla, *gag* gen dizinlerinin ise İran izolatları ile yüksek benzerlik gösterdiği bildirilmiştir.

Değirmenci (2011) doktora tezinde, Marmara bölgesindeki sığırlarda Bovine Leukemia Virus genomunun saptanması ve ELISA ile BLV antikorlarını tespit etmek amacıyla, dokuz ilçede toplam 13 adet çiftlikten 211 adet kan örneği toplamış, total kandan BLV proviral DNA'sının tespit için real-time ve konvansiyonel PCR yöntemleri kullanılmıştır. ELISA ile 23 (%10,9) adet kan serumunda seropozitiflik tespit edilmiş, 24 örnekte de (%11,379) BLV proviral DNA'sı konvansiyonel ve real-time PCR ile saptanmıştır. BLV kısmi “*env* gen” ile yapılan filogenetik analiz sonucunda tez çalışmasındaki dört adet BLV suşunun genotip 4 içerisinde sınıflandırıldığı bildirilmiştir.

Doğan ve ark. (2020), *Culicoides spp.* BLV'nin taşınmasındaki olası rolünü değerlendirmek için Türkiye'nin güneyindeki Hatay ilinde beş farklı ilçede 27 farklı küçük aile işletmesinden örneklenen 224 sığırdaki BLV enfeksiyonu seroprevalansını araştırmıştır. *Culicoides spp. (C.schultzei)* içeren 25 havuzdan biri (%4,0; 1/25) ve örneklenen sığırların %2,67'si (6/224) BLV nükleik asiti için pozitif olarak belirlenmiştir. Örneklenen sürüler ve örneklenen tüm sığırlar için seroprevalans oranları sırasıyla %7,40 (2/27) ve %1,33 (3/224) olarak bulunmuş ve filogenetik

analize göre, sığırlardan (n = 6) ve bir BLV-pozitif *C.schultzei* havuzundan gelen BLV'lerin dizilerinin, genotip 1 (G1) de yer aldığı bildirilmiştir.

Alkan ve ark. (2021) tarafından, bu tez çalışmasında da kullanılan, 25 BLV virusun *env gp51* geninin kısmi veya tam uzunluktaki dizisine dayanan filogenetik analiz sonucunda yerel virusların genotip 1'de tespit edildiği bildirilmiştir.

BLV'nin prevalansının ülkeler arasında değişen dünya çapında bir dağılımı vardır (Monti ve ark., 2005 ve Trono ve ark., 2001). Örneğin Japonya'daki sığırlarda BLV'nin seroprevalansının %68,5 (Kobayashi ve ark., 2010) olduğu bildirilmiştir. BLV enfeksiyonu, EBL insidansının düşük olmasına rağmen Japonya'da endemiktir ve 2009'dan 2011'e kadar ülke çapında BLV seroprevalansı ile ilgili yapılan araştırmada, süt sığırlarının %20'sinden fazlasının bir yaşından küçükken BLV ile enfekte olduğu bildirilmiştir (Konishi ve ark., 2018).

Virusun immunolojik işlev bozukluklarında ve artan itlaf oranlarındaki rolü de ortaya koyulmuştur. İki büyük ölçekli araştırmada, pozitif BLV sürüleri arasında negatif sürülere kıyasla inek başına süt üretimindeki ortalama düşüş sırasıyla %2,5 ve %2,7 ile çok benzer oranlarda tespit edilmiştir (OIE, 2018 ve Ott ve ark., 2003). BLV ile enfekte sığırlarda diğer hastalıklara karşı aşılama sonrası koruyucu bağışıklığın azaldığı da bildirilmiştir. Bu nedenle, uzun subklinik enfeksiyon döneminde belirgin klinik belirtiler olmamasına rağmen, kalıcı BLV enfeksiyonlarının neden olduğu ekonomik kayıplar önemlidir (OIE,2018 ve Puentes ve ark., 2016). Örneğin, ABD'de süt endüstrisindeki yıllık BLV ile ilişkili ekonomik kayıpların 285 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir (Bartlett ve ark., 2014 ve Phiri ve ark., 2019).

BLV Retrovirus ailesinde yer alan HIV gibi, etkisini immun sistemi baskılayarak ve çok çeşitli fırsatçı patojenlere organizmayı açık hale getirerek göstermektedir. Bu nedenle, mastitis, tırnak sorunları ve mukozal hastalıklar gibi bulaşıcı hastalıklar ve ayrıca ringworm (mantar) oluşumlarının temizlenememesi ile ilişkilendirilmiştir ve

diğer hastalık koşullarını kolaylaştırdığından muhtemelen sığır endüstrisinin BLV'nin tam etkisini tanıması gecikmiştir (Bartlett ve ark., 2020).

1.3. Bulaşma

BLV, lökositleri enfekte ettikten sonra, provirus formunda konak genomuna yerleşir ve ilk enfeksiyon başlangıcından yaklaşık iki hafta sonra BLV partikülleri üretilerek kanda saptanabilir seviyeye gelir. Bu viremik dönemden sonra, viral partiküller zor tespit edilebilir. BLV ile enfekte olan sığırlarda BLV'nin yayılması esas olarak enfekte hücrelerin mitozuna bağlıdır ancak küçük popülasyon oluşturan BLV ile enfekte hücrelerin de virus ürettiği düşünülmektedir (Murakami ve ark., 2016). BLV ile enfekte sığırlarda virus yayılımı, kandaki proviral kopya sayısı olarak tanımlanan proviral yük (PL) ile tahmin edilebilir ve bu BLV ile enfekte olmuş hücrelerin sayısına bağlıdır. PL'nin, BLV patogenezi ile ilişkili olduğuna ve hastalığın ilerlemesi ile arttığına inanılır, çünkü yüksek bir PL genellikle EBL gelişen sığırlarda tespit edilmiştir (EBL sığırlarından alınan yüzeysel servikal, medial iliak ve jejunal lenf düğümlerinin %70'inden fazlası 1000 kopya/10 ng DNA'ya sahipken, BLV ile enfekte sığırlardan alınan lenf düğümleri bu orana sahip değildi) ve BLV patogenezi için önemlidir. Ayrıca, inekteki BLV proviral yükün, etkenin buzağıya bulaşma olasılığını etkilediği bildirilmiştir (Murakami ve ark., 2016 ve Somura ve ark., 2014).

BLV, çoğunlukla enfekte hücreli kanla kontamine aletlerle ve fiziksel temas ile transfer edilir. BLV bulaşma yolları, hayvandan hayvana temas, kan teması, kastrasyon, boynuz kesme ve kulak numaralama, doğal üreme sırasında, uterus yoluyla bulaşma, peripartum, süt ve/veya kolostrumla olarak sıralanabilir (Burgu ve ark., 1990 ve Schwartz ve ark., 1994). Virus ayrıca çeşitli vücut sıvılarının (burun ve bronş sıvıları, tükürük, süt) hücresel yapısında da bulunur (OIE, 2018). Bazı çalışmalarda BLV'nin buzağılara kolostrum ve/veya süt yoluyla bulaştığı bildirilmiş ise de kolostrum ve süt yoluyla BLV bulaşma riskinin oranı net olarak bilinmemektedir. BLV'nin buzağılara bulaşmasını önlemek için kolostrumun dondurulması ve

özölmesi, önerilen bir sürü yönetimi uygulamasıdır fakat bu yöntemi destekleyecek güçlü kanıtlar mevcut değildir (Kuczewski, 2019 ve Ruiz ve ark., 2018). Diğer yandan bazı çalışmalarda kolostral antikorların BLV enfeksiyonuna karşı güçlü bir koruyucu aktivitesi olduğu bildirilmiştir (Konishi ve ark., 2018 ve Lassauzet ve ark., 1989).

Benzer şekilde, kontamine eldivenler BLV bulaşması için bir risk faktörü olarak kabul edilse de, tek kullanımlık rektal muayene manşonlarının uygulanmasının süt çiftliklerinde BLV durumunu olumlu etkileyip etkilemeyeceği belirsizdir. *Ixodes ricinus* kenelerinin, kan emici Tabanidae sineklerinin ve bazı sivrisinek türlerinin BLV enfeksiyonunu yayabileceği bildirilmiştir (Schwartz ve ark., 1994). Sığır yetiştiriciliği işletmelerinde sinek kontrolünün olmaması veya kan emici böceklerin varlığı, BLV enfeksiyonu için risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (Kobayashi ve ark., 2010). Deneyisel koşullar altında BLV iletiminde tabanidlerin, ahır sineklerinin ve boynuz sineklerin (*Haematobia irritans*) rolünü araştıran çalışmalar mevcuttur (Buxton ve ark., 1985; Doğan ve ark., 2020; Foil ve ark., 1988 ve Ooshiro ve ark., 2013). Yapılan bir çalışma ile BLV'nin genetik materyali sineklerde PCR yoluyla tespit edilmiş, ancak PCR pozitif sineklerin varlığına rağmen boynuz sineklerinin doğal koşullar altındaki rolünün hala belirsiz olduğu bildirilmiştir (Panei ve ark., 2019).

1.4. Klinik Bulgular

BLV B-lenfotropik onkogenik bir retrovirustur. Virus inokulasyonu ile birkaç türün enfekte edilebildiği bildirilse de doğal enfeksiyon sadece sığır, manda, bufalo ve kapibaralarda meydana gelmektedir. Koyunlar deneysel enfeksiyonlara karşı çok hassastır ve deneysel koşullar altında aynı virus, sığırlara göre daha yüksek oranda ve daha kısa bir latent dönemden sonra koyunlarda B hücreli lenfosarkomlar geliştirir (OIE, 2018 ve Tajima ve ark., 1998). İlginç bir şekilde, sığırlarda dönüştürülen B-lenfositleri CD5+ IgM+ B hücreleriyken, koyunlarda CD5– IgM+ B hücreleridir ve

bu durum BLV tarafından indüklenen lösemi mekanizmalarının oluşumunun farklı olduğunu düşündürmüştür (Aida ve ark., 2013).

Enfeksiyon genellikle subklinikdir ancak enfekte sığırların yaklaşık % 30'unda yaşam boyu süren persiste lenfositoz oluşur, % 5 ten daha azında ise lenfosarkom oluşumu gözlenir (Juliarena ve ark., 2013 ve OIE, 2018). BLV tarafından meydana getirilen lenfosarkoma çoğunlukla üç yaş üstündeki sığırlarda (daha çok 4-8 yaş aralığı) tespit edilmiştir ve lenfosarkomaların yaklaşık olarak 2/3'ü persiste enfeksiyon periyodundan sonra gelişir fakat persiste enfeksiyon varlığı lenfosarkom oluşumu için zorunlu değildir (Kabeya ve ark., 2001 ve Marcela ve ark., 2007). BLV'nin neden olduğu tümörler tipik olarak 3 yaşın üzerindeki hayvanlarda görülse de, enfekte buzağların daha genç yaşta BLV'den etkilenme potansiyeli vardır. Son zamanlarda, Japonya'da iki yaşından küçük sığırlarda da EBL vakası rapor edilmiştir (Konishi ve ark., 2018 ve Oguma ve ark., 2017). Birçok hayvan klinik olarak asemptomatiktir ve persiste enfekte kalarak enfeksiyonun yayılmasında rol oynar (Lee ve ark., 2016 ve Rodriguez ve ark., 2011). Enfekte hayvanlarda klinik belirtiler tümörlerin olduğu bölgeye göre değişmekle birlikte sindirim bozuklukları, iştahsızlık, kilo kaybı, halsizlik veya genel durum bozukluğu ve bazen de nörolojik belirtiler şeklinde gözlemlenebilir. Yüzeysel lenf nodüllerinde belirgin şekilde büyüme de tespit edilebilmektedir (OIE, 2018).

HTLV-1 ve BLV yakından ilişkilidir ve yetişkin T hücreli lösemi/lenfoma (ATLL) ve EBL çok benzer patolojiye neden olur. HTLV-1, CD4+ T hücrelerini enfekte ederken BLV, B-lenfositleri enfekte eder ve her ikisi de hücre proliferasyonunu indükleyerek maligniteye yol açabilir. EBL'de, ATLL gibi, transforme edilmiş B hücreleri, birçok organda malign hücrelerin biriktiği lösemik veya lenfatik formlara dönüşebilir (Ashrafi ve ark., 2020).

1.5. Patoloji

BLV enfeksiyonlarının çoğu asemptomatiktir ve yalnızca serolojik testlerle tanınır. Enfekte sığırların yaklaşık %30'unda kalıcı lenfositoz gelişir ancak % 5 ten daha azında ise lenfosarkom oluşumu gözlenir (McLachan ve Dubovi, 2011). Nekroskopide lenf nodülleri ve birçok dokunun neoplastik hücreler tarafından infiltre edildiği tespit edilmiştir. En çok etkilenen organlar abomasum, omasum, kalbin sağ kulakçığı, dalak, karaciğer, böbrek, bağırsak, akciğerler ve uterusur. Deri ve iskelet kaslarında ise genelde neoplastik oluşumlar görülmez (OIE, 2018). Birçok organda sert beyaz neoplastik kitleler bulunmasına rağmen, en belirgin değişimlerin kalpte ve bağırsaklarda olduğu bildirilmiştir (Yoon ve ark., 2005) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. EBL ile enfekte sığırdaki kalp ve bağırsaklarda gözlenen neoplastik oluşumlar (Yoon ve ark., 2005).

1.6. Kontrol ve Koruma

Tüm retroviruslarda olduğu gibi BLV, DNA'sını konakçı genomuna entegre eden bir provirus oluşturur (Goff, 2013) ve bu durum nötralizan antikorların üretilmesine rağmen konağın virüsü elimine etmesini imkansız hale getirir (Bartlett ve ark., 2014). Bununla birlikte, BLV'nin biyolojisi nedeniyle, kontrolü ve/veya eradikasyonu, temelde enfekte hayvanların sürüden çıkarılmasına bağlıdır. BLV

eradikasyonu, BLV testi pozitif hayvanların sürüden çıkarılması veya BLV'nin hayvanlar arasında bulaşmasını önlemeyi amaçlayan yönetim uygulamaları ile başarılabilir (Kuczewski, 2019).

Besi sığırlarının kaybı, çiftliklerde büyük ekonomik hasara neden olabilir. EBL'den etkilenmeseler bile, bu hayvanlar virusun daha büyük yaşta enfekte olan ineklerden daha uzun süre çiftlik içinde yayılmasına neden olur. Bu nedenle buzağılarda BLV enfeksiyonunun önlenmesi, virusun yayılmasını önlemek ve ekonomik etkisini azaltmak için hayati önem taşımaktadır (Konishi ve ark., 2018). Son zamanlarda BLV'nin insan meme kanserinde rol oynayabileceği ile ilgili çalışmalar yayınlanmıştır. BLV maruziyeti ile meme kanseri gelişimi arasında nedensel bir ilişki kanıtlanmamış olsa da, bu bulguların tüketici endişelerine neden olarak ve süt tüketimini azaltarak süt endüstrisi üzerinde zararlı etkilere sahip olabileceği, süt endüstrisinde de BLV'nin kontrolü ve ortadan kaldırılmasının bir öncelik olarak düşünülmesi gerekliliği araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Kuczewski, 2019).

Enfeksiyonun kontrolünde aynı zamanda, BLV seropozitif sığırların kolostrum ve sütlerinin yavrulara içirilmemesi, tanklarda toplanan sütlerin seronegatif hayvanlardan alınması, kan örneklemeleri, kastrasyon, boynuz kesme, şırıngal operasyonlar, rektal uygulama ve tedavi işlemlerinde kullanılan aletlerin steril olması, insekt kontrol programlarının uygulanması, sürüdeki hayvanların belirli periyotlarla serolojik taramalarının yapılması ve sürüye yeni katılacak hayvanların hastalıktan arı bölgelerden seçilmesinin önerildiği bildirilmiştir (Kale ve ark., 2005). Düşük prevalanslı sürülerde test pozitif hayvanların kesilmesi mümkün olsa da, yüksek prevalanslı sürülerde çoğu zaman ekonomik olarak uygulanabilirliği zordur. BLV testi pozitif hayvanların negatif hayvanlardan ayrılması ve/veya BLV'nin hayvanlar arasında bulaşmasını azaltmayı veya önlemeyi amaçlayan yönetim uygulamaları gibi BLV'yi kontrol etmek için alternatif yaklaşımların tercih edilmesi gerekmektedir (Kuczewski, 2019).

BLV'nin biyolojisine, özellikle epidemiyolojisine ilişkin yeni bilgilerin, BLV kontrol ve eradikasyon stratejilerini iyileştirebileceği düşünülmektedir. Örneğin, farklı proviral yüklere sahip hayvanların farklı BLV bulaşma riskleri oluşturduğu varsayılmıştır (Jimba ve ark., 2010 ve Juliarena ve ark., 2007). Yüksek proviral yüke sahip hayvanların stratejik olarak itlaf edilmesinin, tüm pozitif hayvanların itlafının uygun bir seçenek olmadığı durumlarda bulaşma riskini ve sürü içi yaygınlığı azaltabileceği önerilmektedir (Kuczewski, 2019).

Hastalıktan korunma için çeşitli yöntemler ile elde edilen aşı denemeleri (Gatei ve ark., 1993; Gutiérrez ve ark., 2015 ve Kabeya ve ark., 1996) yapılmış olmasına karşın, günümüzde dünyada kullanılan ticari bir aşı bulunmamaktadır. Etkili bir BLV aşısının, nötralizan antikorların yanı sıra virus-spesifik hücresel immunitiyi indüklemesi gerektiği yapılan çalışmalar sonucunda bildirilmiştir. Tax proteinin sitotoksik T lenfositleri için epitop bölgeleri içerdiği ve güçlü sitotoksik T lenfosit yanıtı oluşturabildiği, bu nedenle HTLV-1 ve BLV için potansiyel aşı adayı olabileceği düşünülmüş ve bu bağlamda Tax proteinine karşı immün yanıt oluşumu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Kannagi ve ark., 1992; Ohashi ve ark., 2000; Sakakibara ve ark., 1998 ve Usui ve ark., 2003). BLV Tax proteininin spesifik immün yanıtı indükleyebildiğini ve daha önce Env ve gag proteinleri için de bildirilen faredeki B ve T hücresi epitoplarını içerdiği bildirilmiştir. Usui ve ark. (2003) yaptığı çalışmada, BLV *tax* geni baz alınarak yapılan aşının koyunda hücre aracılı immün yanıtı uyardığını ve elde edilen sonuçlara göre enfeksiyon gelişimine karşı koruyucu olduğunu bildirmiştir. BLV için hedeflenen Tax aşı modelleri benzeri olarak, BLV ile yakın ilişkili olan HTLV enfeksiyonuna yönelik aşı geliştirme çalışmalarında da, Tax protein kodlayan rekombinant vektörlerin elde edilmesi ve aşı olarak vektör ya da hedef protein ürünlerin kullanılabilirliklerinin incelenmesi araştırmacıların önemli çalışma konularını oluşturmaktadır (Kabiri ve ark., 2018; Kannagi ve ark., 2019 ve Sundaram ve ark., 2003).

1.7. Tanı

BLV'nin serolojik tespitinde çoğunlukla Env gp51'e karşı oluşan antikorları tespit eden AGID testi ve indirekt ELISA (indirekt enzyme-linked immunosorbent assay) rutin olarak kullanılmaktadır. Ancak günümüzde ELISA'nın AGID testinden daha hassas olduğu bildirilmiş olup, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) tarafından uluslararası ticarete bu testin kullanılması önerilmiştir. *Env* gen bölgesine bağlanan primerler ile gerçekleştirilen nested PCR (nested polimeraz zincir reaksiyonu), OIE tarafından serolojik testlere alternatif tanı aracı olarak önerilmektedir (OIE, 2018).

BLV provirusunu saptamak için PCR kullanımı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Fechner ve ark., 1996). PCR kullanımı enfeksiyondan yedi gün sonra provirusun saptanmasına izin verirken, antikorların saptanması enfeksiyondan en az üç hafta sonra mümkündür (Kuczewski, 2019 ve Nagy ve ark., 2007). Bununla birlikte, BLV'ye karşı antikor tespitinin, enfekte hayvanları tanımlamanın güvenilir, uygun maliyetli ve hızlı bir yolu olduğu ortaya konmuştur. Yine de, tanısal testlerin performansının, kullanıldıkları populasyonun özelliklerine de bağlı olduğu belirtilmektedir (Kuczewski, 2019). Genomun *gag*, *pol* ve *env* gen bölgelerini hedef olarak oluşturulan primerlerin tümü BLV tespitinde değişen başarı oranları ile kullanılmıştır. Şimdiye kadar, real-time PCR en hızlı ve hassas yöntem olarak bildirilmiştir (Rola-Łuszczak ve ark., 2013).

1.8. BLV ve Meme kanseri

Miller ve ark. (1969), sığırlarda BLV'yi ilk keşfettiklerinde, insanları enfekte edip hastalığa neden olabileceğinden endişe etmişlerdir. Enfekte sığırların kanlarında BLV'ye karşı antikorlar varlığının saptanması sonrasında insanlarda anti-BLV antikorlarının varlığı için testler yapılmış ancak testler negatif sonuç vermiştir. Bu durum BLV'nin insanlarda hastalık oluşturmayaacağı kanaatine yol açmıştır. Bu

açıklamaya rağmen, birçok araştırmacı BLV ile ilgili araştırmalar yapmıştır. Western blot yönteminin ortaya çıkışı, insan serumlarının yeniden test edilmesini sağlamış ve bu 100 kat daha hassas teknik kullanılarak, 257 insan deneğin %74'ünün serumunda anti-BLV antikorlarının açıkça tanımlandığı bildirilmiştir (Buehring ve ark., 2003 ve Buehring ve Sans, 2020). Sonrasında, Buehring ve ark. (2015), insan meme kanseri dokusunda BLV DNA ve proteinlerinin varlığını bildiren bir makale yayınlamış ve BLV DNA'sının, meme kanseri olan, ağırlıklı olarak Kafkasyalı ve Amerikalı kadınlardan alınan meme epiteli örneklerinin %59'unda ve normal kontroller için yalnızca %29'unda bulunduğunu bildirmişlerdir. Premalign meme kanseri olan kadınlardan alınan örneklerde ise BLV %38 oranda tespit edilmiştir. Diğer bir çalışma da, Güney Brezilyalı kadınlara ait parafine gömülü meme dokusu örneklerinde BLV DNA'sının sağlıklı memede %13,9, meme kanseri dokusunda %30,5 oranında bulunduğunu bildirilmiş ve araştırmacılar tarafından BLV'nin meme kanseriyle bağlantısının yaşam tarzı ve üreme öyküsünden daha güçlü olduğu belirtilmiştir (Schwingel ve ark., 2019).

Arjantin'de yapılan bir çalışmada, 85 meme kanseri örneğinin %22,6'sında PCR ile BLV nükleik asidi tespit edilmiştir (Ceriani ve ark., 2018). Diğer bir çalışmada ise 96 Avustralyalı kadından oluşan bir popülasyonda meme kanseri numunelerinin %80'inde, normal doku örneklerinin %41'inde BLV nükleik asidinin mevcut olduğu bildirilmiştir (Buehring ve ark., 2017). Taghadosi ve ark. (2019), nested-PCR ve RT-nested-PCR kullanılarak BLV Tax genomunu ve BLV Tax ekspresyonunu saptamak için formalinle sabitlenmiş, parafine gömülmüş ve taze insan lenfoma dokuları kullanmış ve 41 örneğin 9'unun BLV genomunun Tax bölgesini içerdiğini ve bunun sekiz örneğinin yüksek dereceli diffuz büyük hücreli lenfomaya (B hücre tipi) ait olduğunu bildirmiştir. BLV ve meme kanseri arasında ilişki olduğunu bildiren bu çalışmalara rağmen ilişki bulunamadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur. Zhang ve ark. (2016) Çin'de yaptıkları çalışmada, meme kanseri dokusunda ve meme kanseri tespit edilmiş kişilerden alınan kan örneklerinde PCR ve real-time PCR ile BLV tespit edilmediğini bildirmiştir. Gillet ve Willems (2016), Amerika Birleşik Devletleri, Meksika ve Vietnam'dan alınan meme kanseri numunelerinin 51 tam genomundan ve 19 normal dokudan elde edilen verileri analiz ettiklerini ancak BLV'ye dair kanıt

bulamadıklarını bildirmişlerdir. Genel olarak, dünya çapındaki çok sayıda çalışmanın sonuçları, meme kanserlerini etkileyen BLV hipotezini desteklemektedir. BLV sıklığındaki farklılıklar, örneklem büyüklüğü oranlarına ve farklı etnik kökenlere ve diyetlere bağlanabilir. İnsanlarda meme kanseri ve BLV arasındaki bağlantı hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiği araştırmacıların ortak kanaatidir (Gao ve ark., 2020; Gillet ve Willems, 2016 ve Schwingel ve ark., 2019).

BLV'nin birçok ülkede önemli ekonomik kayıplara yol açması, insanlarda enfeksiyon yapan bazı retroviruslarla ilgili çalışmalarda da örnek oluşturması ve özellikle son dönemde insan meme kanseri dokusunda BLV tespiti ile zoonotik potansiyelin tekrar gündeme gelmiş olması nedeniyle, BLV genom karakterizasyonuna yönelik çalışmalar, moleküler epidemiyolojik durumun ortaya konulması ve virusun evrimsel süreci ile enfeksiyonun patogeneziyle ilgili verilerin elde edilmesi önem taşımaktadır. Bu bağlamda planlanan bu çalışma ile Türkiye'nin farklı bölgelerinde yerleşik işletmelerde bulunan süt sığırlarını enfekte eden BLV'nin *env* gen bölgesi karakterizasyonu ile sirküle olan genotip(ler)in belirlenmesi ve transkripsiyonal aktivitede önemli rolü olan LTR gen bölgesi, viral transaktivatör Tax, post-transkripsiyonel düzenleyici Rex ve virusun etkili dağılımı için gerekli olan R3 ve G4 genlerini içeren pX gen bölgesinin moleküler karakterizasyonlarının yapılması ve tespit edilen mutasyonların patogeneze üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örneklenen Hayvanlar ve Tanı Materyalleri

Bu çalışmada, Türkiye'nin çeşitli illerindeki (Kırklareli, Balıkesir, Bursa, Ankara, Şanlıurfa, Adana) sığır işletmelerinde bulunan ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda daha önce gerçekleştirilen araştırmalar kapsamında ELISA ile BLV virusa karşı antikor varlığı saptanmış olan hayvanlara ait 276 retrospektif tanı materyali (kan) kullanılması planlandı. Tanı materyallerinden işletmelere ve örnekleme yıllarına göre seçilen 179 adedi BLV *env* gen hedef alan PCR yöntemi ile proviral DNA tespiti için test edildi. Tanı materyallerin sağlandığı işletmeler, örnekleme yılı ve test edilen örnek sayısı Çizelge 2.1'de sunuldu.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan tanı materyalleriyle ilgili bilgiler.

İşletme No	İşletme	Örnekleme Yılı	Örnek Sayısı	Env Gen Bölgesi PCR ile Test Edilen Örnek Sayısı
1	TG (KIRKLARELİ)	2012	28	28
		2017	37	17
2	TH (BALIKESİR)	2012	11	11
3	KRC (BURSA)	2012	27	19
		2013	27	15
		2014	22	13
		2015	13	13
4	P (ANKARA)	2014	15	15
		2015	6	6
5	CP (ŞANLIURFA)	2016	79	31
6	CKR (ADANA)	2016	11	11
Toplam			276	179

Araştırma kapsamında kullanılan tanı materyallerinin BLV *env* gen temelli PCR ile değerlendirilmesi sonrasında, BLV *env* geni elde edilen örneklerden, materyalin ait olduğu işletme ve örnekleme yılları dikkate alınarak seçilen örneklerin, pX (n=73) ve LTR (n=120) gen bölgeleri PCR ile test edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Viral Nükleik Asit İzolasyonu

Viral nükleik asit tespiti için kullanılacak olan kan materyalleri 2000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek, serumlarının ayrılması sağlandı. Santrifüj işlemine tabi tutulması ile elde edilen ürünlerden fenol-kloroform yöntemi (Sambrook ve ark., 1989) ve ticari ekstraksiyon kiti (QIAGEN Qiamp DNA Mini Kit (Cat No: 51304) ile nükleik asit eldesi sağlandı.

Fenol-kloroform yöntemi: 1,5 ml’lik ependorf tüplere her örnekten 300 µl alındı. Örneklerin üzerine eşit hacimde 300 µl solüsyon D eklendi ve 15 s vortekslendi. Daha sonra tüplerin üzerine 300 µl alkali fenol, 300 µl kloroform/izoamilalkol (24:1) eklenerek 15 s vortekslendi ve 12000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, üstteki sıvıdan 700 µl alınarak, yeni bir ependorfa koyuldu. Tüplerin üzerine eşit miktarda (700 µl), -20°C’de soğutulmuş izopropil alkol ve 100 µl sodyum asetat eklenerek vortekslendi. Karışım, nükleik asitin çökmesi için -80°C’de en az bir saat süre ile bekletildi. Sonrasında oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı. Çözünen karışım, 14000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ependorf tüpünün üst kısmında kalan sıvı aspire edildikten sonra çökmüş olan viral DNA pelleti, %70’lik alkol (-20°C’de soğutulmuş) ile yıkandı ve tekrar 14000 rpm’de, 2-3 dk santrifüj edildi. Daha sonra tüpte kalan %70’lik alkol aspire edilerek pellet 37°C’de ~20 dk bekletildi.

Kurutulan pellet 25 µl nükleaz ari su ile süspanse edilerek hazır hale getirildi ve moleküler çalışmada kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

QIAGEN Qiamp DNA Mini Kit (Cat No: 51304) ile DNA ekstraksiyonun prosedürü: Ekstraksiyon ticari kit içerisinde bildirilen prosedüre göre gerçekleştirildi. Bunun için;

1. 1,5 ml’lik Mikrosantrifüj tüpüne 20 µl proteinase K koyuldu, üzerine 200 µl kan örneği eklendi (Miktarı yetersiz gelen örneklerin üzeri PBS ile 200 µl’ye tamamlandı).
2. Karışımın üzerine 200 µl AL Buffer eklendi ve 15 s vortekslendi.
3. Karışım daha sonra 56 °C’de 10 dk inkubasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrası, kapakta kalmış olabilecek damlaları uzaklaştırmak için 7 s kadar hızlı santrifüj yapıldı.
5. Daha sonra karışıma 200 µl etanol (%96-100) eklenerek 15 s vortekslendi ve kapaktaki damlaları uzaklaştırmak için hızlı santrifüj yapıldı.
6. 5. adımda elde edilmiş olan karışım daha sonra 2 ml’lik QIAamp Mini spin kolon tüplerine alındı ve 8000 rpm devir hızında 1 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından QIAamp Mini Spin kolon başka bir toplama tüpüne koyuldu.
7. Tüpün içerisine 500 µl AW1 buffer koyuldu ve yine 8000 rpm devirde 1 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından QIAamp Mini Spin kolon tekrar başka bir toplama tüpüne koyuldu.
8. Tüpün içerisine 500 µl AW2 buffer koyularak ve 14000 rpm’de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından QIAamp Mini Spin kolon 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne koyuldu.
9. 200 µl AE Buffer doğrudan QIAamp Mini Spin kolon membranına konuldu ve oda ısısında 1 dk inkube edildi. Ardından 8000 rpm de 1 dk santrifüj edilerek ekstrakt mikrosantrifüj tüpüne ayrılarak kullanıma hazır hale geldi.

2.2.2. Hedef gen bölgeleri için PCR uygulanması

Tanı materyallerinden elde edilen ekstraksiyon ürünlerine, öncelikle BLV proviral DNA tespiti amacıyla *env* gen bölgesini hedef alan primerler kullanılarak nested-PCR uygulandı. Daha sonra *env* gen bölgesi pozitif tespit edilenlerden işletmelere göre seçilen 120 örnek LTR, 73 örnek ise pX gen bölgesi eldesi için test edildi. Çalışmada kullanılan primerler, yerleşimleri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri ile ilgili bilgiler Çizelge 2.2’de sunuldu.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primer dizinleri ile ilgili bilgiler.

Primerler	Baz Dizisi (5'→3')	Hedef Bölge	Ürün (bp)	Kaynak
BLV- <i>env</i> -1	TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA	<i>env</i> gen	598 bp	Fechner ve ark. (1996)
BLV- <i>env</i> -2	AACAACAACCTCTGGGAAGGG			
BLV- <i>env</i> -3	CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT	<i>env</i> gen	444 bp	
BLV- <i>env</i> -4	GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG			
Geno 01F	TGTATGAAAGATCATGCCGAC	LTR gen	713 bp	Moratorio ve ark. (2013)
Geno 02R	AGCCTTTGCGCGCTTTGVVGAG			
P3	GTTAGGGTTCCGGGGTGATC	LTR gen	571 bp	Zhao ve ark. (2007a)
pXBLV 1 F	TATTCCACCCTCGCAAGGC	pX gen (pX1)	609bp	Panei ve ark. (2013)
pXBLV 1 R	GGGCAGTTGATCCAGAGTCGT			
pXBLV 2 F	ATCAACTGGACCGCCGATG	pX gen (pX2)	669bp	
pXBLV 2 R	CGTAGGGTCATGAAGGAAGCG			
pXBLV 3 F	CCTTCTCTCCTAATGTCCC	pX gen (pX3)	478bp	
pXBLV 3 R	AGGGGAAGTTGGGGAGGTA			

2.2.2.1. BLV env gen bölgesi için Nested Polimeraz Zincir Reaksiyon (Nested-PCR) Tekniği

BLV env gen bölgesi için Nested-PCR, Thermo Scientific Taq DNA Polimeraz (#EP0401) ve Çizelge 2.2’de belirtilen primerler (1.tur: BLV-env-1/BLV-env-2, 2.tur: BLV-env-3/BLV-env-4) kullanılarak uygulandı. Uygun PCR karışımlarının hazırlanmasından sonra başlangıç denatürasyonu 95 °C’de 5 dk, denatürasyon aşaması 95 °C’de 30 s, bağlanma ısısı 1.tur için 62 °C de 30 s, 2.tur için 58 °C de 30 s uzama aşaması 72 °C’de 1 dk ve son uzama aşaması 72 °C’de 7 dk olarak, toplam her PCR döngüsü 35 siklusa oluşacak şekilde uygulandı (Çizelge 2.3). İlk tur için 598 bp, 2. tur için 444 bp ürün eldesi sağlanmaya çalışıldı. Isı döngü cihazı olarak Biometra (Almanya) kullanıldı.

Çizelge 2.3. BLV env gen bölgesi Nested-PCR miks bileşenleri ve programı.

PCR Karışım Bileşeni	Miktar (µl)	Program
Taq DNA polymerase (5u/µl)	0,25 µl	95 °C’de 5 dk 95 °C’de 30 s Bağlanma ısısı*: 30s 72 °C’de 1 dk 72 °C’de 7 dk 35 siklus
10 X Taq buffer	3 µl	
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µl	
10 mM dNTP mix	0,5 µl	
Primer F (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Primer R (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Nükleaz Ari Su	19,85 µl	
DNA	3 µl	
Toplam	30 µl	

*Bağlanma ısısı: 1.tur için 62 °C, 2.tur için 58 °C dir.

2.2.2.2. BLV LTR Gen Bölgesi Nested Polimeraz Zincir Reaksiyon (Nested-PCR) Tekniği

BLV *env* gen bölgesi pozitif tespit edilen örnekler, BLV LTR gen bölgesini hedef alan primerler kullanılarak Nested-PCR tekniğine tabi tutuldu. Nested-PCR'lar Thermo Scientific DreamTaq DNA Polimeraz (#EP0702) ve Çizelge 2.2'deki primerler (1.tur: Geno 01F/ Geno 02R, 2.tur: Geno 01F/P3) kullanılarak yapıldı. Nested-PCR için;

1. İlk olarak boş bir tüpe her bir örnek için; 10X DreamTaq bufferdan 2,5 µl, 10 mM dNTP mixden 0,5 µl, primerlerden 1'er µl, DreamTaq DNA polimerazdan (5 U/µl) 0,25 µl ve nükleaz ari sudan 17,25 µl konuldu.
2. Hazırlanan karışıma 2,5 µl ekstrakt ürünü eklendi.
3. Birinci tur ve ikinci tur PCR için; başlangıç denatürasyon aşaması 95°C'de 4 dk, denatürasyon aşaması 95°C'de 30 s, bağlanma aşaması 52°C'de 30 s, uzama aşaması 72°C'de 1 dk ve son uzama aşaması 72°C'de 10 dk olarak, her PCR döngüsü 35 siklustan oluştu (Çizelge 2.4). Isı döngü cihazı olarak Biometra (Almanya) kullanıldı.

Çizelge 2.4. BLV LTR gen bölgesi Nested-PCR miks bileşenleri ve programı.

PCR Karışım Bileşeni	Miktar (µl)	Program
Dream Taq DNA polimeraz	0,25 µl	95°C'de 4 dk 95°C'de 30 s 52 °C'de 30 s 72°C'de 1 dk 72°C'de 10 dk 35 siklus
10X Dream Taq buffer	2,5 µl	
10 mM dNTP mix	0,5 µl	
Primer F [10 pmol/µl]	1 µl	
Primer R[10 pmol/µl]	1 µl	
Nükleaz Ari Su	17,25 µl	
DNA	2,5 µl	
Toplam	25 µl	

2.2.2.3. BLV pX Gen Bölgesinin PCR Tekniği

BLV *env* gen bölgesi pozitif tespit edilen örnekler, BLV pX gen bölgesini hedef alan primerler kullanılarak birbiriyle örtüşecek şekilde eklemeli olarak tasarlanmış üç adet primer çifti ile çalışıldı ve hedeflenen ürünlerin eldesi sağlandı. PCR'lar Thermo Scientific DreamTaq DNA Polimeraz (#EP0702) ve Çizelge 2.2'deki primerler kullanılarak yapıldı. PCR için;

1. İlk olarak boş bir tüpe her bir örnek için; 10X DreamTaq bufferdan 2,5 µl, 10 mM dNTP mixden 0,5 µl, primerlerden 1'er µl, DreamTaq DNA polimerazdan (5 U/µl) 0,25 µl ve nükleaz ari sudan 17,25 µl konuldu.
2. Hazırlanan karışıma 2,5 µl ekstrakt ürünü eklendi.
3. PCR'lar için; başlangıç denatürasyon aşaması 95°C'de 4 dk, denatürasyon aşaması 95°C,'de 30 s, bağlanma ısısında* 30 s, uzama aşaması 72°C'de 1 dk ve son uzama aşaması 72°C'de 10 dk olarak, her PCR döngüsü 35 siklustan oluştu (Çizelge 2.5). Isı döngü cihazı olarak Biometra (Almanya) kullanıldı.

Çizelge 2.5. BLV pX gen bölgesi PCR miks bileşenleri ve programı.

PCR Karışım Bileşeni	Miktar (µl)	Program
Dream Taq DNA polimeraz	0,25 µl	95°C'de 4 dk 95°C'de 30 s Bağlanma ısısı* 30 s 72°C'de 1 dk 72°C'de 10 dk 35 siklus
10X Dream Taq buffer	2,5 µl	
10 mM dNTP mix	0,5 µl	
Primer F [10 pmol/µl]	1 µl	
Primer R[10 pmol/µl]	1 µl	
Nükleaz Ari Su	17,25 µl	
DNA	2,5 µl	
Toplam	25 µl	

Bağlanma ısısı*; pXBLV1F/pXBLV1R için: 59°C

pXBLV2F/pXBLV2R için: 56°C

pXBLV3F/pXBLV3R için: 56°C

2.2.3. PCR ürünlerinin Jel Elektroforezi ile görüntülenmesi

PCR sonucunda elde edilen ampliconlar jel elektroforez ile görüntülendi. Görüntüleme işlemi için öncelikle %1'lik agaroz jelin elde edilmesi amacıyla 1 gr toz agaroz (Prona, EU) tartılarak 0,5X TAE (Tris Asetat Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid) (100 ml) solüsyonu ile çözelti haline getirildi. Bu çözelti ısı yardımıyla (mikrodalga fırın) çözdürülerek içerisine 7 µl Safeview™ Classic (G108) jel boyası eklendi ve jel taraklarının yerleştirilmiş olduğu jel taşıyıcısına dökülmeden önce yaklaşık 50 °C'ye soğuması için 20 dk kadar bekletildi. Donan jel, elektroforez tankına yerleştirildi ve jel tarakları jel taşıyıcılarından ürünlerin yükleneceği kuyucuklar zarar görmeden çıkarıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında olduğu gibi tank solüsyonu olarak 0,5 X TAE kullanıldı. PCR ürünleri, bir birim boya (6x Loading Dye, Fermentas, Litvanya) üç birim ürün olmak üzere karıştırılarak jelde oluşan kuyucuklara aktarıldı. Beklenen boyuttaki ürünlerin gözlemlenebilmesi için 100 bp'lik ladder (Fermentas, Litvanya) solüsyonu hazırlanarak 2 adet kuyucuğa 1,3 µl konuldu. Jele 8 volt/cm elektrik akımı uygulanarak 30-40 dk süreyle PCR ürünlerinin hareket etmesi sağlandı ve sonrasında jel görüntüleme sisteminde (Kodak, Gel Logic 100, ABD) görüntülendi.

2.2.4. Dizin Analizi

PCR sonunda elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüleri değerlendirilerek, beklenen boyutta amplicon gözlenen ve analiz için uygun nitelikte olanlar dizin analizine tabi tutuldu. Dizin analizi ticari olarak hizmet alımı yoluyla gerçekleştirildi.

2.2.5. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmada elde edilen BLV genomuna ait dizin verileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) tarafından sağlanan BLAST (Basic Local Alignment

Search Tool) web sayfası kullanılarak doğrulandı. Elde edilen dizinler GenBank'ta yer alan Türkiye ve diğer ülkelerde tespit edilen BLV genom dizinleri ile karşılaştırmalı olarak Aliview (Larsson, 2014) programının çoklu hizalama (multiple alignment) özelliğinden yararlanılarak değerlendirildi.

2.2.6. Filogenetik Analiz

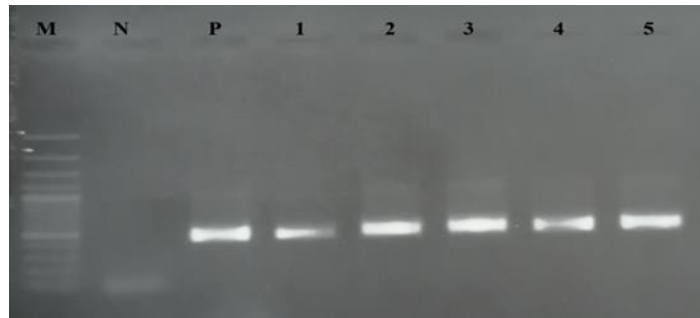
Çalışmada elde edilen BLV saha suşlarının, Türkiye ve diğer ülkelerde tespit edilen BLV suşları ile nükleik asit dizinleri arasındaki genetik benzerliğin ortaya koyulması amacıyla yapılan filogenetik analizler için MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms) programı kullanıldı (Kumar ve ark., 2018). Programda bulunan 'Find Best Model' özelliği kullanılarak en uygun modeller belirlendi. *Env* gen bölgesi filogenetik analizi Maximum Likelihood metodu, Kimura 2-parametresi artı gama dağılımı ve bootstrap analizi (1000 kopya) ile gerçekleştirildi. *LTR* gen bölgesi filogenetik analizi Maximum Likelihood metodu, Tamura-3 parametresi artı gama dağılımı ve bootstrap analizi (1000 kopya) ile gerçekleştirildi. BLV *tax* gen bölgesi filogenetik analizi ise Maximum Likelihood metodu, Tamura-Nei parametresi artı gama dağılımı ve bootstrap analizi (1000 kopya) ile gerçekleştirildi. Nükleotit ve aminoasit benzerlikleri online program sayfası kullanılarak yapıldı (SIAS, <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>).

3. BULGULAR

3.1. BLV *env* gen bölgesi moleküler analizi

3.1.1. *Env* gen bölgesi Nested-PCR sonuçları

Araştırmada ilk olarak, ELISA ile BLV'ye karşı antikor varlığı saptanmış olan hayvanlara ait kan örnekleri (n=10) ve kısmi *env* gen bölgesi eldesi için bildirilen primer çiftleri (Çizelge 2.2) kullanılarak, hedeflenen PCR ürünlerinin elde edilebilmesi için farklı protokoller uygulanarak optimizasyon çalışmaları yapıldı. Optimizasyon çalışmalarının tamamlanmasını takiben araştırmaya dahil edilen örneklerden işletme ve örnekleme yıllarına göre seçilen 179 retrospektif tanı materyalinin BLV *env* gen hedef alan Nested-PCR ile test edilmesi sonucu 126 örnekte beklenen boyutta (444bp) ampikon elde edildi (Şekil 3.1). Uygun büyüklükte olduğu belirlenen ampikonlardan işletmelere göre dağılımı, örnekleme yılı, dizin analizi için uygun olup olmadığı vb. dikkate alınarak seçilen 57 ampikonun, hizmet alımı ile dizin bilgileri elde edildi. Çalışmada pozitif tespit edilen örneklerden Env, LTR ve pX gen bölgesi dizin bilgileri elde edilen örneklere ait bilgiler Çizelge 3.1'de sunuldu.



Şekil 3.1. BLV Env Nested-PCR 2. tur sonucu jel görüntüsü.
[M: DNA merdiveni (100 bp), 1-5: Örnekler, P: Pozitif Kontrol (444 bp), N: Negatif Kontrol].

Çizelge 3.1. Çalışmada pozitif tespit edilen örneklerden Env, LTR ve pX gen bölgesi dizin bilgileri elde edilen örneklerle ait bilgiler.

No	İşletme Kodu	Örnekleme Yılı	Örnek Sayısı	Gen Bölgesi		
				Env*	LTR*	pX*
1	TG(KIRKLARELİ)	2012	28	6/22	7/8	5/5
		2017	37	3/13	3/6	2/2
2	TH(BALIKESİR)	2012	11	5/6	4/5	3/3
		2012	27	7/9	5/9	3/3
3	KRC(BURSA)	2013	27	6/10	5/8	4/4
		2014	22	3/8	3/4	1/1
		2015	13	4/8	4/5	2/2
4	P(ANKARA)	2014	15	5/13	4/6	4/4
		2015	6	2/5	3/3	-
5	CP(ŞANLIURFA)	2016	79	11/23	5/15	4/4
6	CKR(ADANA)	2016	11	5/9	5/7	5/5
	Toplam		276	57/126	48/76	33/33

*Dizin bilgileri elde edilen / (+) Tespit edilen örnek sayısı.

3.1.2. Env gen bölgesi filogenetik analizi ve benzerlik sonuçları

Çalışmada elde edilen yerel viruslar ile GenBank’tan temin edilen Türkiye ve diğer ülkelere ait virusların BLV env gen dizinlerinin filogenetik analizi Maximum Likelihood metodu, Kimura 2-parametresi artı gama dağılımı ve 1000 bootstrap analizi ile gerçekleştirildi. Filogenetik ağaçta kullanılan, çalışmada elde edilen yerel viruslar ile GenBank’tan temin edilen Türkiye ve diğer ülkelere ait viruslara ait bilgiler ve GenBank kabul numaraları (*accession number*) Çizelge 3.2’de sunuldu. Bu çalışmada dizin bilgileri elde edilen yerel viruslar ile GenBank veri tabanından erişim sağlanan Türkiye ve diğer ülkelerde tespit edilmiş olan BLV kısmi env gen bölgesi dizinleri (1-11 genotip) ile yapılan filogenetik analiz sonucunda, bu çalışmadaki yerel virusların G1’de yer aldığı görüldü (Şekil 3.2).

Çizelge 3.2. Çalışmada elde edilen env gen bölgesi dizinleri Gen Bank’a kaydedilen BLV’ler ve filogenetik analiz için kullanılan GenBank’ta kayıtlı diğer BLV suşlarına ilgili bilgiler.

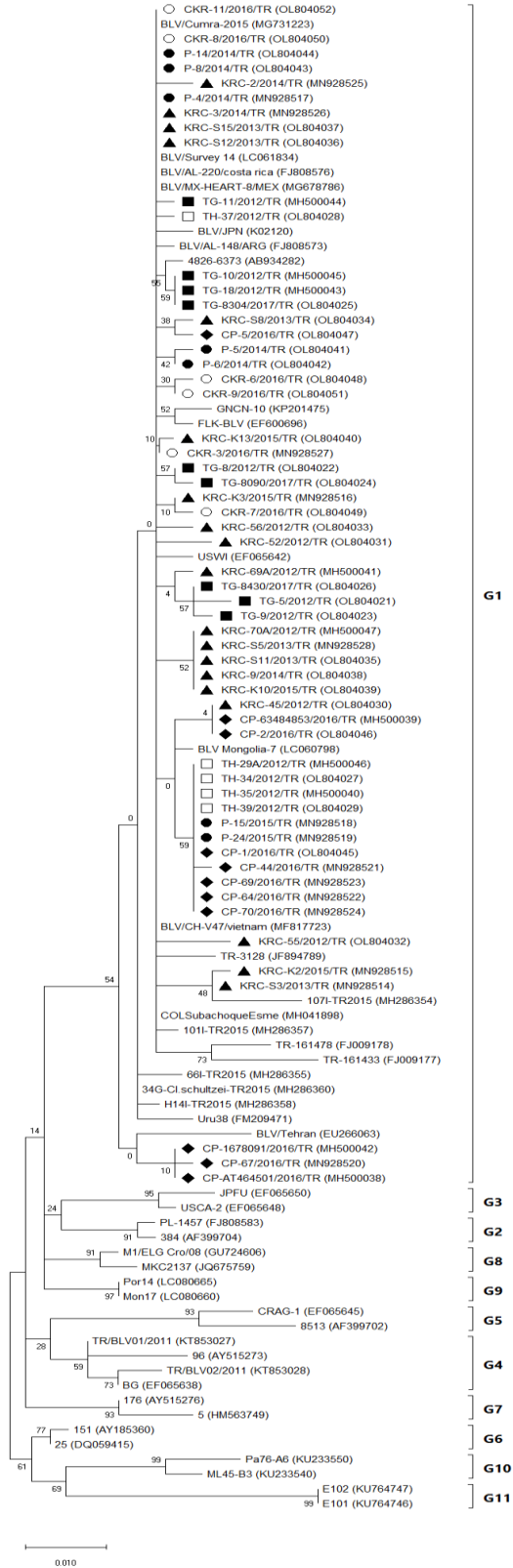
Genotip	Örnek adı *	'Accession' no	Referans	Ülke
G1	BLV/JPN	K02120	Sagata ve ark.,1985	Japonya
G1	TG-5/2012/TR	OL804021	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-8/2012/TR	OL804022	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-9/2012/TR	OL804023	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-10/2012/TR**	MH500045	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-11/2012/TR**	MH500044	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-18/2012/TR**	MH500043	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-8090/2017/TR	OL804024	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-8304/2017/TR	OL804025	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-8430/2017/TR	OL804026	Bu çalışma	Türkiye
G1	TH-29A/2012/TR**	MH500046	Bu çalışma	Türkiye
G1	TH-34/2012/TR	OL804027	Bu çalışma	Türkiye
G1	TH-35/2012/TR**	MH500040	Bu çalışma	Türkiye
G1	TH-37/2012/TR	OL804028	Bu çalışma	Türkiye
G1	TH-39/2012/TR	OL804029	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-45/2012/TR	OL804030	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-52/2012/TR	OL804031	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-55/2012/TR	OL804032	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-56/2012/TR	OL804033	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-69A/2012/TR **	MH500041	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-70A/2012/TR**	MH500047	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S3/2013/TR **	MN928514	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S5/2013/TR**	MN928528	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S8/2013/TR	OL804034	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S11/2013/TR	OL804035	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S12/2013/TR	OL804036	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S15/2013/TR	OL804037	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-2/2014/TR **	MN928525	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-3/2014/TR **	MN928526	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-9/2014/TR	OL804038	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-K2/2015/TR**	MN928515	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-K3/2015/TR**	MN928516	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-K10/2015/TR	OL804039	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-K13/2015/TR	OL804040	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-4/2014/TR **	MN928517	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-5/2014/TR	OL804041	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-6/2014/TR	OL804042	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-8/2014/TR	OL804043	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-14/2014/TR	OL804044	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-15/2015/TR**	MN928518	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-24/2015/TR**	MN928519	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-1/2016/TR	OL804045	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-2/2016/TR	OL804046	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-5/2016/TR	OL804047	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-44/2016/TR**	MN928521	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-64/2016/TR**	MN928522	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-67/2016/TR **	MN928520	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-69/2016/TR **	MN928523	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-70/2016/TR **	MN928524	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-63484853/2016/TR **	MH500039	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-AT464501/2016/TR**	MH500038	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-1678091/2016/TR **	MH500042	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-3/2016/TR **	MN928527	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-6/2016/TR	OL804048	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-7/2016/TR	OL804049	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-8/2016/TR	OL804050	Bu çalışma	Türkiye

Çizelge 3.2. Devam. Çalışmada elde edilen env gen bölgesi dizinleri Gen Bank’a kaydedilen BLV’ler ve filogenetik analiz için kullanılan GenBank’ta kayıtlı diğer BLV suşlarına ilgili bilgiler.

Genotip	Örnek adı *	‘Accession’ no	Referans	Ülke
G1	CKR-9/2016/TR	OL804051	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-11/2016/TR	OL804052	Bu çalışma	Türkiye
G1	BLV/Cumra-2015	MG731223	NCBI	Türkiye
G1	107I-TR2015	MH286354	Doğan ve ark., 2020	Türkiye
G1	FLK-BLV	EF600696	NCBI	Türkiye
G1	66I-TR2015	MH286355	Doğan ve ark., 2020	Türkiye
G1	34G-CL.schultzei-TR2015	MH286360	Doğan ve ark., 2020	Türkiye
G1	101I-TR2015	MH286357	Doğan ve ark., 2020	Türkiye
G1	H14I-TR2015	MH286358	Doğan ve ark., 2020	Türkiye
G1	TR-161433	FJ009177	Alkan ve ark., 2011	Türkiye
G1	TR-3128	JF894789	Alkan ve ark., 2011	Türkiye
G1	GNCN-10	KP201475	Lee ve ark., 2015	Güney kore
G1	Uru38	FM209471	Moratorio ve ark., 2010	Uruguay
G1	USWI	EF065642	Zhao ve ark., 2007	USA
G1	BLV/Tehran	EU266063	Hemmatzadeh ve ark., 2007	İran
G1	BLV_Mongolia-7	LC060798	Ochirkhuu ve ark., 2016	Mongolia
G1	4826-6373	AB934282	Mekata ve Norimine, 2014	Japonya
G1	BLV/AL-148/ARG	FJ808573	Rodriguez ve ark., 2009	Arjantin
G1	BLV/AL-220/costa rica	FJ808576	Rodriguez ve ark., 2009	Arjantin
G1	BLV/Survey_14	LC061834	Komabayashi ve ark., 2015	Japonya
G1	BLV/CH-V47/vietnam	MF817723	NCBI	Vietnam
G1	BLV/MX-HEART-8/MEX	MG678786	Ceron ve ark., 2020	Meksika
G1	COLSubachoqueEsme	MH041898	Corredor ve ark., 2018	Kolombiya
G2	PL-1457	FJ808583	Rodriguez ve ark., 2009	Arjantin
G2	384	AF399704	Camargos ve ark., 2002	Brezilya
G3	JPFU	EF065650	Zhao ve ark., 2007	Japonya
G3	USCA-2	EF065648	Zhao ve ark., 2007	USA
G4	TR/BLV01/2011	KT853027	NCBI	Türkiye
G4	TR/BLV02/2011	KT853028	NCBI	Türkiye
G4	96	AY515273	Felmer ve ark., 2005	Şili
G4	BG	EF065638	Zhao ve ark., 2007	Belçika
G5	CRA-1	EF065645	Zhao ve ark., 2007	Kostarika
G5	8513	AF399702	Camargos ve ark., 2002	Brezilya
G6	151	AY185360	NCBI	Brezilya
G6	25	DQ059415	NCBI	Brezilya
G7	5	HM563749	Rola-Luszczak ve ark., 2013	Rusya
G7	176	AY515276	Felmer ve ark., 2005	Şili
G8	M1/ELG_Cro/08	GU724606	NCBI	Hrvatistan
G8	MKC2137	JQ675759	NCBI	Rusya
G9	Por14	LC080665	Polat ve ark., 2016	Bolivya
G9	Mon17	LC080660	Polat ve ark., 2016	Bolivya
G10	Pa76-A6	KU233550	Lee ve ark., 2016	Tayland
G10	ML45-B3	KU233540	Lee ve ark., 2016	Tayland
G11	E101	KU764746	Yu ve ark., 2019	Çin
G11	E102	KU764747	Yu ve ark., 2019	Çin

*: Bu çalışmada elde edilen yerel virusların adlandırması “İşletme kodu-Örnek Adı / Örnekleme Yılı / Ülke ” sıralaması ile yapılmıştır.

** Bu yerel virusların Env gp51 dizinleri Alkan ve ark., 2021’de kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Bu çalışmada elde edilen yerel virus dizinleri ile GenBank'taki Türkiye ve diğer ülkelere ait BLV kısmi env gen bölgesi dizinleri (1-11 genotip) ile yapılan filogenetik analiz. Çalışmadaki yerel BLV'lerin adlandırması "İşletme kodu-Örnek Adı/Örnekleme Yılı/Ülke" şeklindedir. Yerel BLV'ler: ■ : TG, □ : TH, ▲ : KRC, ● : P, ◆ : CP, ○ : CKR.

Çalışmada elde edilen 57 örneğe ait kısmi *env* gen dizinlerinin, K02120 referans suşuyla, kendi aralarında, ayrıca filogenetik ağaçta kullanılan ve G1’de yer alan diğer ülkelere ait dizinler ile aminoasit benzerlik oranları incelendi. Çalışmada elde edilen 57 örneğe ait kısmi *env* gen dizinlerinin K02120 suşu ile benzerlik oranları; %98,59–100, kendi aralarındaki benzerlik oranları; %97,18–100, filogenetik ağaçta kullanılan ve G1’de yer alan Türkiye ve diğer ülkelere ait dizinler ile de %91,48 – 100 olarak tespit edildi.

3.1.3. Env Gen Bölgesi Dizin Analizi Sonuçları

Bu çalışmada elde edilen yerel BLV suşlarının kısmi *env* gen aminoasit dizinlerinin, K02120 referans suşu rehberliğinde GenBank’ta kayıtlı diğer bazı BLV suşlarının dizinleri ile karşılaştırılması Şekil 3.3’te sunuldu. Çalışmada elde edilen kısmi *env* gen dizinleri BLV K02120 referans suşu ile karşılaştırıldığında, yerel virus dizinlerinde spontan mutasyonların olduğu gözlemlendi.

Bu çalışmada tespit edilen BLV ‘lerin genetik çeşitliliği hakkında bilgi sağlamak amacıyla 57 Env gp51 dizisinin (kısmi) amino asit dizileri hizalandığında, 17 yerel virus arasında 12 farklı amino asit ikamesinin tanımlandığı gözlenirken, kalan 40 BLV’nin K02120 referans suşu ile aynı aa dizilimine sahip olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen bu aa değişimleri fonksiyonel bölgelere göre ayrıntılı olarak incelendiğinde;

‘Zinc binding peptide’ ve ‘2nd Neutralizing Domain’ bölgelerinde bulunan; **H148Y** değişimi yedi örnekte (KRC-70A/2012/TR, KRC-S3/2013/TR, KRC-S5/2013/TR, KRC-S11/2013/TR, KRC-2/2014/TR, KRC-9/2014/TR, KRC-10/2015/TR); **H148L** değişimi üç örnekte (TG-5/2012/TR, TG-9/2012/TR, TG-8430/2017/TR); **F146S** değişimi; TG-11/2012/TR’de tespit edilmiştir. E epitopunda

bulunan; **S189G** değişimi üç örnekte (TG-10/2012/TR, TG-18/2012/TR, TG-8304/2017/TR),

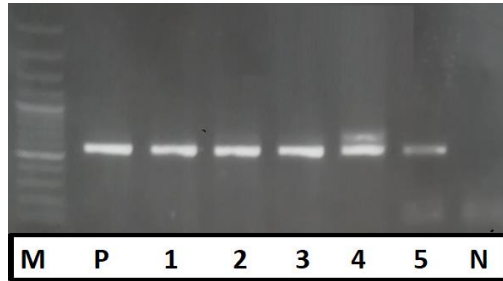
CD4+ epitopunda bulunan; **P112A** değişimi TH-37/2012/TR’de; **P94T** değişimi KRC-2/2014/TR’de; **G96R** değişimi; KRC-K2/2015/TR, CP-44/2016/TR’de, CD4+ epitopu ve F epitopunda bulunan **Q95K** değişimi; KRC-2/2014/TR’de, CD8+ epitopunda bulunan **G154R** değişimi ise CP-67/2016/TR’de tespit edilmiştir.



3.2. BLV'lerin LTR Gen Bölgesi Yönünden Sonuçları

3.2.1. LTR gen bölgesi Nested-PCR sonuçları

Env gen bölgesi yönünden test edilerek pozitif bulunan örnekler, LTR gen bölgesinin çoğaltılmasını hedefleyen primerler kullanılarak yapılan optimizasyon sonrası Nested-PCR'a tabi tutuldu ve 76 örnekte 2.tur PCR sonucunda beklenen boyutta (571bp) ürün elde edildi (Şekil 3.4). Pozitif tespit edilen 76 örnekten işletmelere göre dağılımı, örnekleme yılı, dizin analizi için kullanılabilir olması vb. özellikler dikkate alınarak seçilen 48 örneğe ait amplikonun dizin bilgileri hizmet alımı ile sağlandı. Hizmet alımı ile sağlanan dizin bilgileri BLAST web sayfası kullanılarak GenBank'ta yer alan diğer BLV LTR bölgesi dizinleri ile doğrulandı ve sonrasında elde edilen dizinlerin GenBank'a kaydı yapılarak kabul numaraları alındı (Çizelge 3.3).



Şekil 3.4. BLV LTR Nested-PCR 2. tur sonucu jel görüntüsü.

[M: DNA merdiveni (100 bp), 1-5: Örnekler, P: Pozitif Kontrol (571 bp), N: Negatif Kontrol].

3.2.2. LTR gen bölgesi filogenetik analiz sonuçları

Çalışmada elde edilen yerel viruslar ile GenBank'ta bulunan diğer ülkelere ait suşların BLV LTR gen dizinlerinin filogenetik analizi Maximum Likelihood metodu,

Tamura-3 parametresi artı gama dağılımı ve 1000 bootstrap analizi ile gerçekleştirildi. Filogenetik ağaçta kullanılan, çalışmada elde edilen yerel viruslar ile GenBank'ta bulunan diğer ülkelere ait suşlar ile ilgili bilgiler Çizelge 3.3'de sunuldu. Bu çalışmada dizin bilgileri elde edilen yerel viruslar ile GenBank veri tabanından erişim sağlanan diğer ülkelerde tespit edilen BLV kısmi LTR gen bölgesi dizinleri (1-10 genotip) ile yapılan filogenetik analiz sonucunda, bu çalışmadaki yerel virusların LTR gen dizinlerinin filogenetik ağaçta *env* gen ile benzer şekilde G1'de yer aldığı gözlenmiştir (Şekil 3.5).

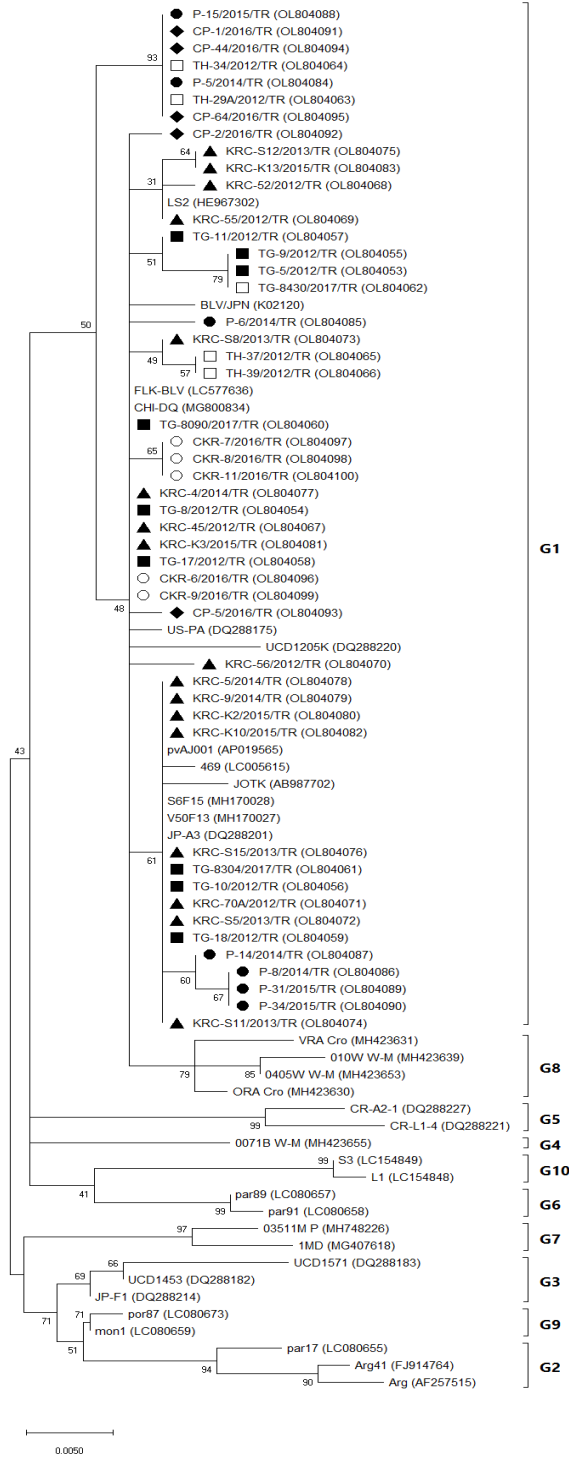
Ayrıca, bu çalışmada elde edilen 48 örneğe ait kısmi LTR gen bölgesi dizinlerinin, birbirleriyle ve filogenetik ağaçta kullanılan ve G1'de yer alan diğer ülkelere ait dizinler ile nükleik asit benzerlik oranları incelendi. Çalışmada elde edilen 48 örneğe ait kısmi LTR gen bölgesi dizinlerinin benzerlik oranları; K02120 referans suşu ile %98,84 – 99,62, kendi aralarında %98,98 - 100, filogenetik ağaçta kullanılan ve G1'de yer alan diğer ülkelere ait dizinler ile de %98,69 - 100 olarak tespit edildi.

Çizelge 3.3. Çalışmada elde edilen LTR gen bölgesi dizinleri GenBank'a kaydedilen BLV'ler ve filogenetik analiz için kullanılan GenBank'ta kayıtlı diğer BLV suşlarına ilgili bilgiler.

Genotip	Örnek adı	'Accession' no	Referans	Ülke
G1	BLV/JPN	K02120	Sagata ve ark., 1985	Japonya
G1	TG-5/2012/TR	OL804053	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-8/2012/TR	OL804054	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-9/2012/TR	OL804055	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-10/2012/TR	OL804056	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-11/2012/TR	OL804057	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-17/2012/TR	OL804058	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-18/2012/TR	OL804059	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-8090/2017/TR	OL804060	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-8304/2017/TR	OL804061	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-8430/2017/TR	OL804062	Bu çalışma	Türkiye
G1	TH-29A/2012/TR	OL804063	Bu çalışma	Türkiye
G1	TH-34/2012/TR	OL804064	Bu çalışma	Türkiye
G1	TH-37/2012/TR	OL804065	Bu çalışma	Türkiye
G1	TH-39/2012/TR	OL804066	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-45/2012/TR	OL804067	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-52/2012/TR	OL804068	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-55/2012/TR	OL804069	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-56/2012/TR	OL804070	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-70A/2012/TR	OL804071	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S5/2013/TR	OL804072	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S8/2013/TR	OL804073	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S11/2013/TR	OL804074	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S12/2013/TR	OL804075	Bu çalışma	Türkiye

Çizelge 3.3. Devam. Çalışmada elde edilen LTR gen bölgesi dizinleri GenBank’a kaydedilen BLV’ler ve filogenetik analiz için kullanılan GenBank’ta kayıtlı diğer BLV suşlarına ilgili bilgiler.

Genotip	Örnek adı	'Accession' no	Referans	Ülke
G1	KRC-S15/2013/TR	OL804076	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-4/2014/TR	OL804077	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-5/2014/TR	OL804078	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-9/2014/TR	OL804079	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-K2/2015/TR	OL804080	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-K3/2015/TR	OL804081	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-K10/2015/TR	OL804082	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-K13/2015/TR	OL804083	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-5/2014/TR	OL804084	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-6/2014/TR	OL804085	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-8/2014/TR	OL804086	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-14/2014/TR	OL804087	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-15/2015/TR	OL804088	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-31/2015/TR	OL804089	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-34/2015/TR	OL804090	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-1/2016/TR	OL804091	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-2/2016/TR	OL804092	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-5/2016/TR	OL804093	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-44/2016/TR	OL804094	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-64/2016/TR	OL804095	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-6/2016/TR	OL804096	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-7/2016/TR	OL804097	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-8/2016/TR	OL804098	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-9/2016/TR	OL804099	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-11/2016/TR	OL804100	Bu çalışma	Türkiye
G1	pvAJ001	AP019565	Murakami ve ark., 2019	Japonya
G1	LS2	HE967302	Moratorio ve ark., 2013	Uruguay
G1	US-PA	DQ288175	Zhao ve ark., 2007	USA
G1	JP-A3	DQ288201	Zhao ve ark., 2007	Japonya
G1	S6F15	MH170028	Dao ve ark., 2018	Vietnam
G1	V50F13	MH170027	Dao ve ark., 2018	Vietnam
G1	CHI-DQ	MG800834	Yu ve ark., 2019	Çin
G1	#469	LC005615	NCBI	Japonya
G1	FLK-BLV	LC577636	NCBI	Japonya
G1	JOTK	AB987702	Oguma ve ark., 2017	Japonya
G2	par17	LC080655	Polat ve ark., 2016	Paraguay
G2	Arg41	FJ914764	Dube ve ark., 2009	Arjantin
G2	Arg	AF257515	Dube ve ark., 2000	Arjantin
G3	JP-F1	DQ288214	Zhao ve ark., 2007	Japonya
G3	UCD1453	DQ288182	Zhao ve ark., 2007	USA
G3	UCD1571	DQ288183	Zhao ve ark., 2007	USA
G4	0071B_W-M	MH423655	Pluta ve ark., 2018	Polonya
G5	CR-A2-1	DQ288227	Zhao ve ark., 2007	Kostarika
G5	CR-L1-4	DQ288221	Zhao ve ark., 2007	Kostarika
G6	par89	LC080657	Polat ve ark., 2016	Paraguay
G6	par91	LC080658	Polat ve ark., 2016	Paraguay
G7	03511M_P	MH748226	Pluta ve ark., 2018	Polonya
G7	1MD	MG407618	Pluta ve ark., 2018	Moldova
G8	010W_W-M	MH423639	Pluta ve ark., 2018	Polonya
G8	VRA_Cro	MH423631	Pluta ve ark., 2018	Hırvatistan
G8	ORA_Cro	MH423630	Pluta ve ark., 2018	Hırvatistan
G8	0405W_W-M	MH423653	Pluta ve ark., 2018	Polonya
G8	UCD1205K	DQ288220	Zhao ve ark., 2007	USA
G9	por87	LC080673	Polat ve ark., 2016	Bolivya
G9	mon1	LC080659	Polat ve ark., 2016	Bolivya
G10	S3	LC154849	Polat ve ark., 2017	Myanmar
G10	L1	LC154848	Polat ve ark., 2017	Myanmar



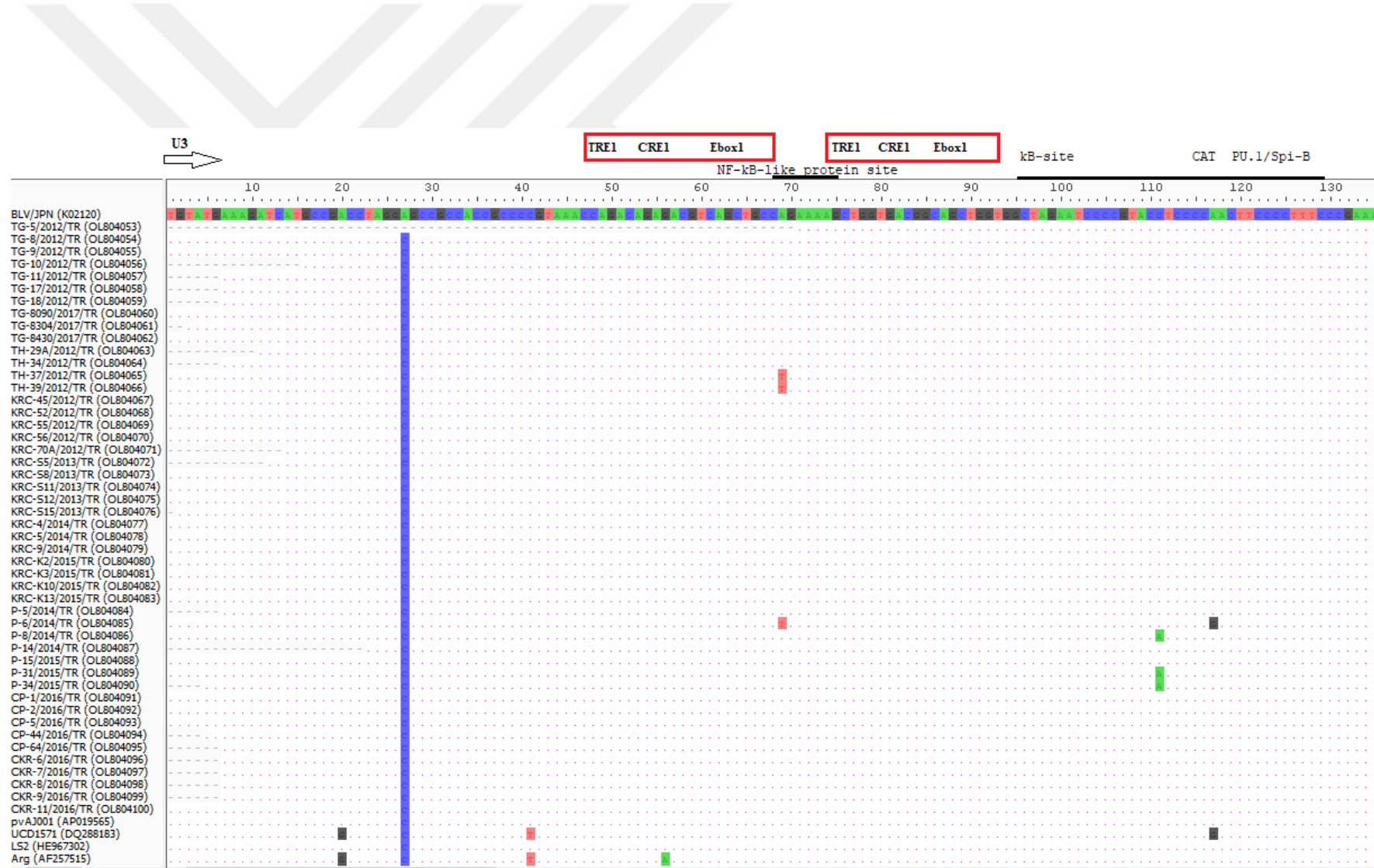
Şekil 3.5. Bu çalışmadaki yerel viruslar ile GenBank'taki diğer ülkelere ait BLV kısmi LTR gen bölgesi dizinleri (1-10 genotip) ile yapılan filogenetik analiz. Çalışmadaki yerel BLV'lerin adlandırması "İşletme kodu-Örnek Adı/Örnekleme Yılı/Ülke" şeklindedir. Yerel BLV'ler: ■ : TG, □ : TH, ▲ : KRC, ● : P, ◆ : CP, ○ : CKR.

3.3.3. LTR Gen Bölgesi Dizin Analizi Sonuçları

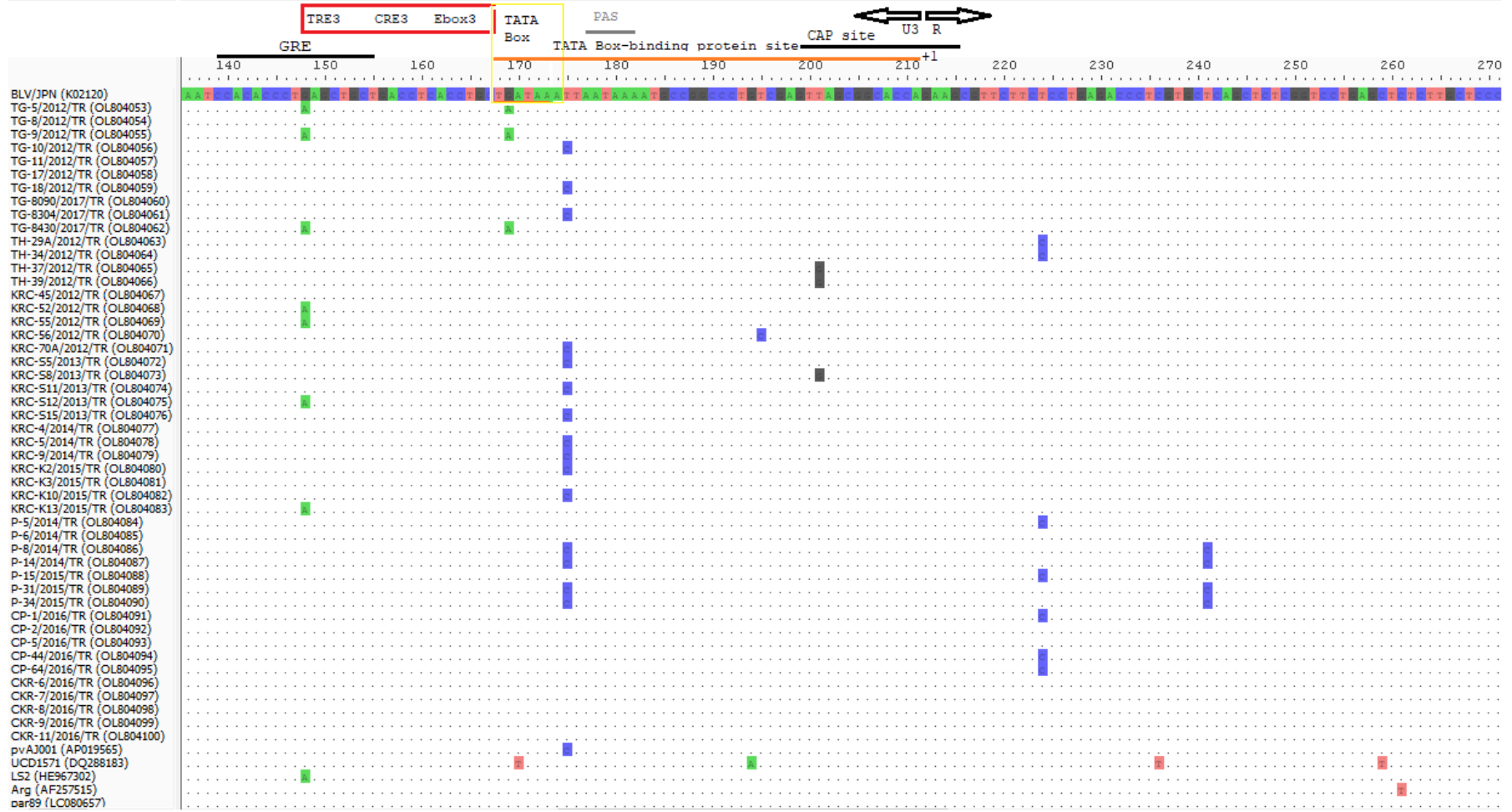
Bu çalışmada elde edilen yerel virusların kısmi LTR gen nükleotit dizinleri ile GenBank'ta kayıtlı K02120 ve diğer birkısım BLV suşlarının gen dizinleri ile birlikte karşılaştırılması Şekil 3.6'da sunuldu. Çalışmada elde edilen kısmi LTR gen dizinleri K02120 referans suşu ile karşılaştırıldığında, birçok yerel virus dizinlerinde spontan mutasyonların olduğu gözlemlendi. Ayrıca yerel virusların, Şekil 3.6'da verilen dizin bilgilerinden özetle hazırlanan nükleotit değişiklikleri ve nükleotit değişikliklerin genomda hangi fonksiyonel bölgede bulunduğu Çizelge 3.4'te sunuldu.

LTR geninin U3, R ve U5 kısımlarında bulunan bazı önemli bölgelerin nükleotit dizinleri K02120 rehberliğinde detaylı olarak incelendiğinde birçok araştırmacı tarafından (Moratorio ve ark., 2013; Murakami ve ark., 2019; Pluta ve ark., 2021 ve Zhao ve ark., 2007a) BLV LTR gen bölgesinde meydana gelen ve BLV transkripsiyon ve replikasyonunda etkili olabileceği bildirilen bazı nükleotit değişimleri değerlendirildi. Değerlendirmeler sonucunda bildirilen değişimlerden;

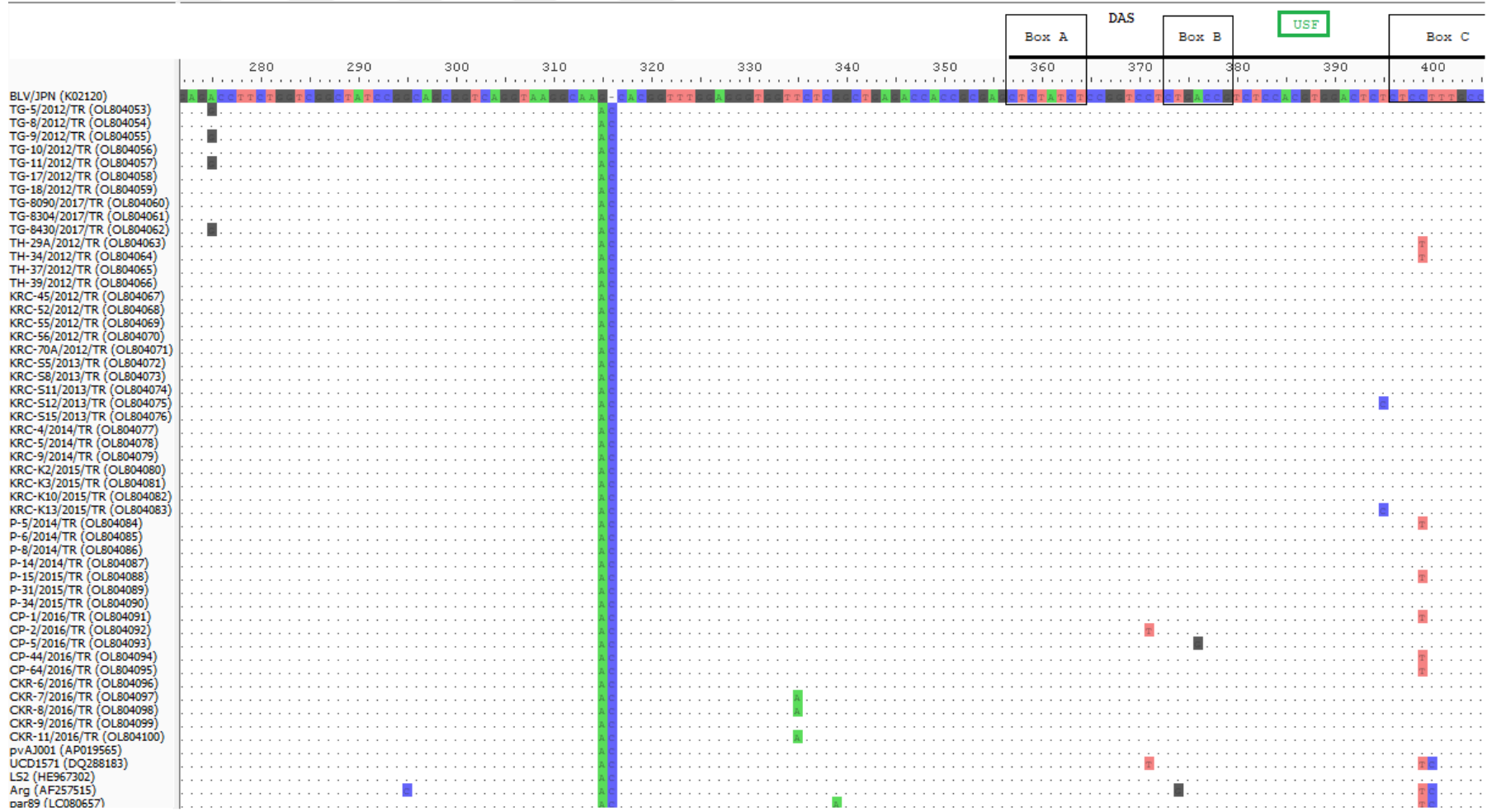
A69T değişimi; üç örnekte (TH-37/2012/TR, TH-39/2012/TR, P-6/2014/TR), **G148A** değişimi yedi örnekte (TG-5/2012/TR, TG-9/2012/TR, TG-8430/2017/TR, KRC-52/2012/TR, KRC-55/2012/TR, KRC-S12/2013/TR, KRC-13/2015/TR), **T175C** değişimi 15 örnekte (TG-10/2012/TR, TG-18/2012/TR, TG-8304/2017/TR, KRC-70A/2012/TR, KRC-S5/2013/TR, KRC-S11/2013/TR, KRC-S15/2013/TR, KRC-5/2014/TR, KRC-9/2014/TR, KRC-2/2015/TR, KRC-10/2015/TR, P-8/2014/TR, P-14/2014/TR, P-31/2015/TR, P-34/2015/TR) tespit edildi.



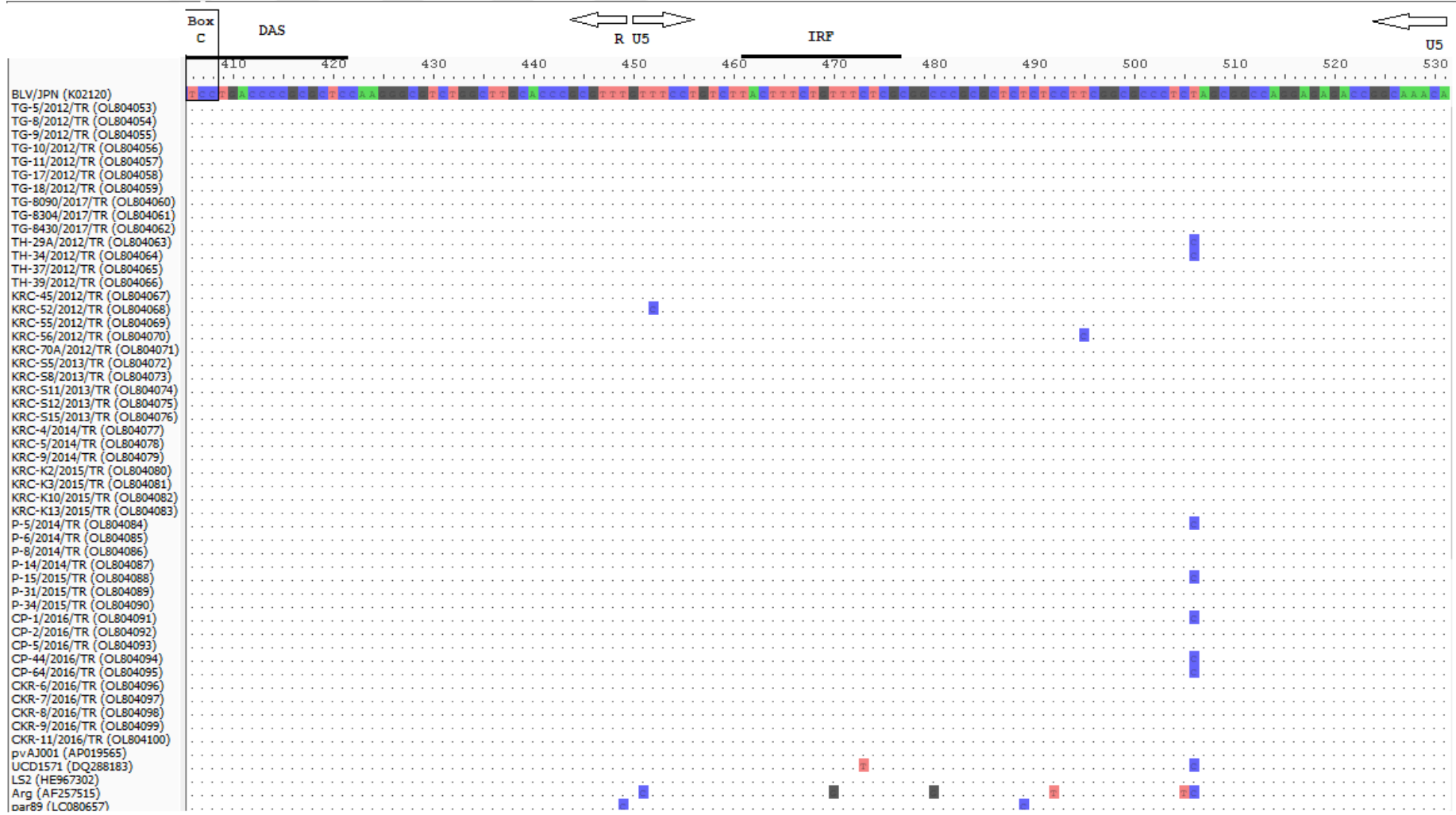
Şekil 3.6. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer ülkelere ait bazı suşların BLV LTR gen nükleotid dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması.



Şekil 3.6. Devam. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer ülkelere ait bazı suşların BLV LTR gen nükleotid dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması.



Şekil 3.6. Devam. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer ülkelere ait bazı suşların BLV LTR gen nükleotid dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması.



Şekil 3.6. Devam. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer ülkelere ait bazı suşların BLV LTR gen nükleotid dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması.

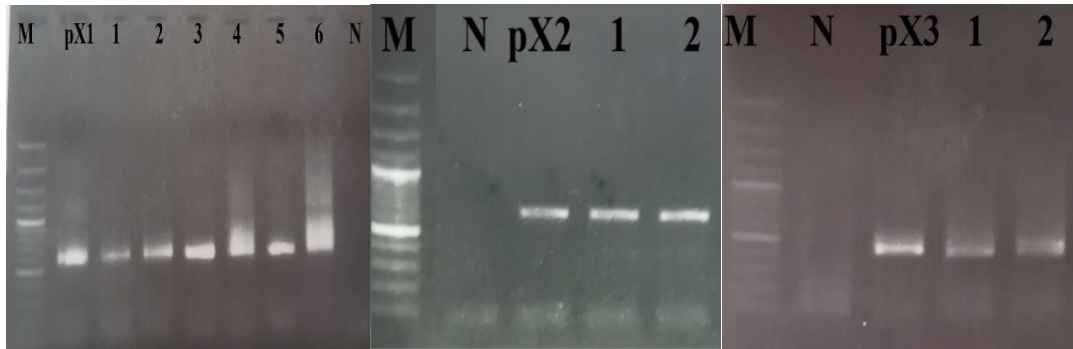
Çizelge 3.4. LTR gen kısmi dizin bilgilerinden hazırlanan nükleotit değişikliklerin genomda bulunduğu fonksiyonel bölgeler ve pozisyonları.

İşletme	Örnek Adı	Pozisyon (nt)	Fonksiyonel Bölge
TG/2012	TG-5/2012/TR	G148(-64)A,G169(-43)A,A275(+64)G	Gre-Tre3,Tata Box,-
	TG-8/2012/TR		
	TG-9/2012/TR	G148(-64)A,G169(-43)A,A275(+64)G	Gre-Tre3,Tata Box,-
	TG-10/2012/TR	T175(-37)C	-
	TG-11/2012/TR	A275(+64)G	-
	TG-17/2012/TR		
TG/2017	TG-18/2012/TR	T175(-37)C	-
	TG-8304/2017/TR	T175(-37)C	-
	TG-8430/2017/TR	G148(-64)A,G169(-43)A,A275(+64)G	Gre-Tre3,Tata Box,-
TH/2012	TG-8090/2017/TR		
	TH-29A/2012/TR	T224(+13)C,C399(+188)T,T506(+295)C	-,Das-Boxc,-
	TH-34/2012/TR	T224(+13)C,C399(+188)T,T506(+295)C	-,Das-Boxc,-
	TH-37/2012/TR	A69(-143)T,T201(-11)G	Nfkb-Like,Cap Site
KRC/2012	TH-39/2012/TR	A69(-143)T,T201(-11)G	Nfkb-Like,Cap Site
	KRC-45/2012/TR		
	KRC-52/2012/TR	G148(-64)A,T452(+241)C	Gre-Tre3,-
	KRC-55/2012/TR	G148(-64)A	Gre-Tre3
	KRC-56/2012/TR	T195(-17)C,T495(+283)C	-, -
KRC/2013	KRC-70A/2012/TR	T175(-37)C	-
	KRC-S5/2013/TR	T175(-37)C	-
	KRC-S8/2013/TR	T201(-11)G	Cap Site
	KRC-S11/2013/TR	T175(-37)C	-
	KRC-S12/2013/TR	G148(-64)A,T395(+184)C	Gre-Tre3,Das-Boxc
KRC/2014	KRC-S15/2013/TR	T175(-37)C	-
	KRC-4/2014/TR		
	KRC-5/2014/TR	T175(-37)C	-
KRC/2015	KRC-9/2014/TR	T175(-37)C	-
	KRC-K2/2015/TR	T175(-37)C	
	KRC-K3/2015/TR		
	KRC-10/2015/TR	T175(-37)C	-
P/2014	KRC-13/2015/TR	G148(-64)A,T395(+184)C	Gre-Tre3,Das-Boxc
	P-5/2014/TR	T224(+13)C,C399(+188)T,T506(+295)C	-,Das-Boxc,-
	P-6/2014/TR	A69(-143)T,A117(-95)G	Nfkb-Like,Nfkb-Like-Cat Box
	P-8/2014/TR	C111(-101)A,T175(-37)C,T241(+30)C	Nfkb-Like,-,-
P/2015	P-14/2014/TR	T175(-37)C,T241C	-, -
	P-15/2015/TR	T224(+13)C,C399(+188)T,T506(+295)C	-,Das-Boxc,-
	P-31/2015/TR	C111(-101)A,T175(-37)C,T241(+30)C	Nfkb-Like,-,-
	P-34/2015/TR	C111(-101)A,T175(-37)C,T241(+30)C	Nfkb-Like,-,-
CP/2016	CP-1/2016/TR	T224(+13)C,C399(+188)T,T506(+295)C	,
	CP-2/2016/TR	C371(+160)T	Das
	CP-5/2016/TR	A376(+165)G	Das-Box B
	CP-44/2016/TR	T224(+13)C,C399(+188)T,T506(+295)C	-,Das-Boxc,-
	CP-64/2016/TR	T224(+13)C,C399(+188)T,T506(+295)C	-,Das-Boxc,-
CKR/2016	CKR-6/2016/TR		
	CKR-7/2016/TR	T335(+124)A	-
	CKR-8/2016/TR	T335(+124)A	-
	CKR-9/2016/TR		
	CKR-11/2016/TR	T335(+124)A	-

3.3. BLV'lerin pX Gen Bölgesi Yönünden Sonuçları

3.3.1. pX gen bölgesi PCR sonuçları

pX gen bölgesi eldesi için, BLV *env* gen bölgesi pozitif tespit edilen örneklerden seçilen 73 adet örnek ile BLV pX gen bölgesini hedef alan ve birbirleriyle eklemeli olarak örtüşecek şekilde tasarlanmış üç primer çifti PCR işlemi için kullanıldı. Toplamda 33 örnek üç farklı primer çifti ile gerçekleştirilen PCR işlemleri sonucunda pozitif tespit edildi (Şekil 3.7) ve dizin analizi için uygun nitelikte olduğu tespit edilen 99 adet ampliconun (33 örnek) dizin bilgisi hizmet alımı yoluyla gerçekleştirildi. Hizmet alımı ile dizin bilgileri sağlanan dizinler BLAST web sayfası kullanılarak GenBank'ta yer alan diğer BLV pX gen bölgeleri ile doğrulandı ve eklemeli olarak birleştirildi. Elde edilen dizinlerin GenBank'a kaydı yapılarak "accession" numaraları alındı (Çizelge 3.5).



Şekil 3.7. BLV pX gen bölgesi (pX1, pX2, pX3) PCR jel görüntüsü.

[M: DNA merdiveni (100 bp), [1-6: Örnekler, Pozitif Kontrol (pX1;609 bp, pX2;669 bp pX3; 478 bp), N: Negatif Kontrol].

3.3.2. pX Gen Bölgesi Moleküler Analiz Sonuçları

3.3.2.1. pX Gen Bölgesi/Tax Geni Filogenetik Analizi

Çalışmada elde edilen yerel viruslar ile GenBank'ta bulunan diğer ülkelere ait suşların BLV *tax* gen dizinlerinin filogenetik analizi Maximum Likelihood metodu, Tamura-Nei parametresi artı gama dağılımı ve 1000 bootstrap analizi ile gerçekleştirildi. Filogenetik ağaçta kullanılan, çalışmada elde edilen yerel viruslar ve GenBank'ta bulunan diğer ülkelere ait suşlar ile ilgili bilgiler Çizelge 3.5' te sunuldu. Bu çalışmada dizin bilgileri elde edilen yerel viruslar ile GenBank veri tabanından erişim sağlanan diğer ülkelerdeki BLV *tax* gen bölgesi dizinleri (1-10 genotip, genotip 7 hariç) ile yapılan filogenetik analiz sonucunda, bu çalışmadaki yerel virusların *env* gen bölgesi filogenetik analiz sonuçları ile benzer olarak G1'de yer aldığı gözlemlendi (Şekil 3.8).

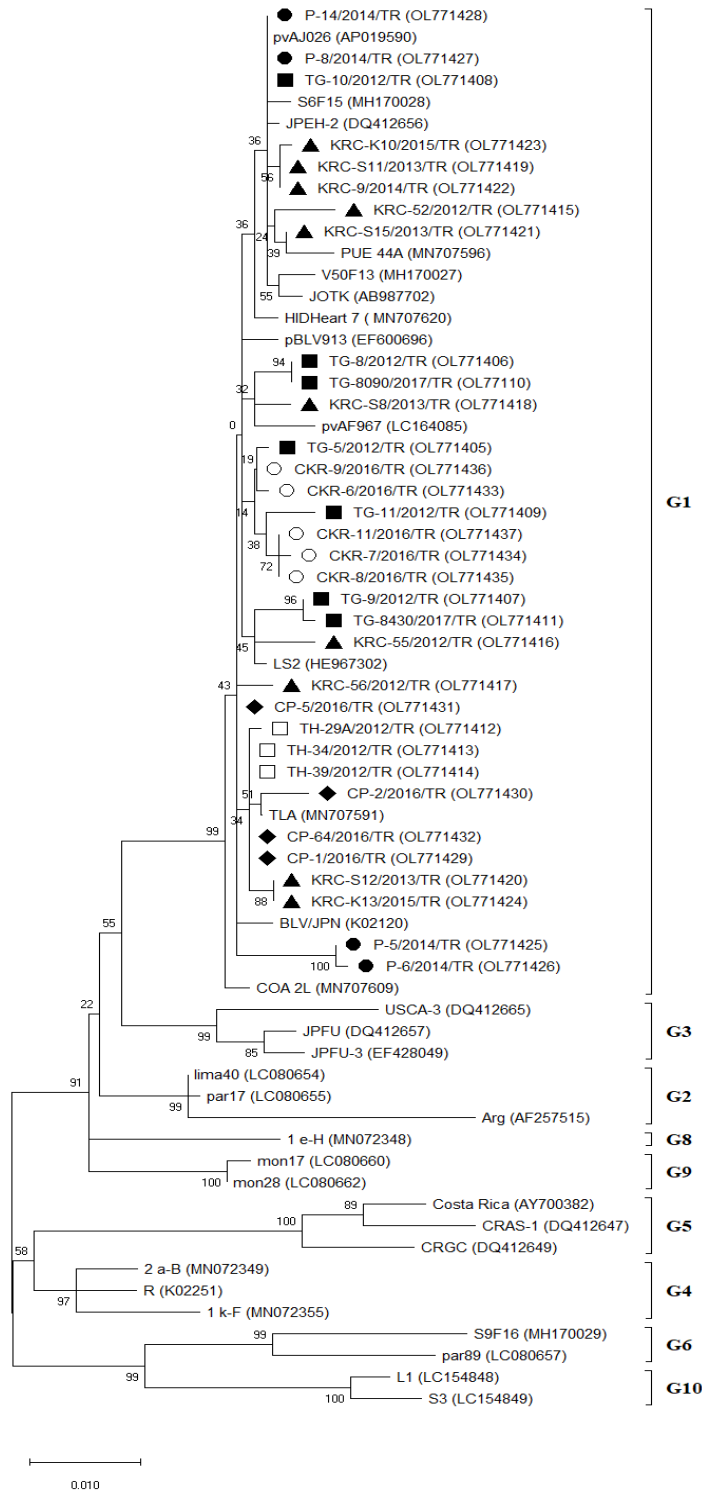
Ayrıca, çalışmada elde edilen 33 örneğe ait *tax* gen dizinlerinin, K02120 referans suşu ile birbirleri arasında ve filogenetik ağaçta kullanılan ve G1'de yer alan diğer ülkelere ait dizinler ile aa benzerlik oranları incelendi. Çalışmada elde edilen 33 örneğe ait *tax* gen dizinlerinin benzerlik oranları K02120 referans suşu ile %98,7-99,67, kendi aralarında %98,05 – 100, filogenetik ağaçta kullanılan ve G1'de yer alan diğer ülkelere ait dizinlerle de %97,4 - 100 olarak tespit edildi.

Çizelge 3.5. Çalışmada elde edilen Tax gen bölgesi dizinleri GenBank'a kaydedilen BLV'ler ve filogenetik analiz için kullanılan GenBank'ta kayıtlı diğer BLV suşlarına ilgili bilgiler.

Genotip	Örnek adı	'Accession' no	Referans	Ülke
G1	BLV/JPN	K02120	Sagata ve ark.,1985	Japonya
G1	TG-5/2012/TR	OL771405	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-8/2012/TR	OL771406	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-9/2012/TR	OL771407	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-10/2012/TR	OL771408	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-11/2012/TR	OL771409	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-8090/2017/TR	OL771410	Bu çalışma	Türkiye
G1	TG-8430/2017/TR	OL771411	Bu çalışma	Türkiye
G1	TH-29A/2012/TR	OL771412	Bu çalışma	Türkiye

Çizelge 3.5. Devam. Çalışmada elde edilen Tax gen bölgesi dizinleri GenBank’a kaydedilen BLV’ler ve filogenetik analiz için kullanılan GenBank’ta kayıtlı diğer BLV suşlarına ilgili bilgiler.

Genotip	Örnek adı	'Accession' no	Referans	Ülke
G1	TH-34/2012/TR	OL771413	Bu çalışma	Türkiye
G1	TH-39/2012/TR	OL771414	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-52/2012/TR	OL771415	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-55/2012/TR	OL771416	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-56/2012/TR	OL771417	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S8/2013/TR	OL771418	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S11/2013/TR	OL771419	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S12/2013/TR	OL771420	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-S15/2013/TR	OL771421	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-9/2014/TR	OL771422	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-K10/2015/TR	OL771423	Bu çalışma	Türkiye
G1	KRC-K13/2015/TR	OL771424	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-5/2014/TR	OL771425	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-6/2014/TR	OL771426	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-8/2014/TR	OL771427	Bu çalışma	Türkiye
G1	P-14/2014/TR	OL771428	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-1/2016/TR	OL771429	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-2/2016/TR	OL771430	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-5/2016/TR	OL771431	Bu çalışma	Türkiye
G1	CP-64/2016/TR	OL771432	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-6/2016/TR	OL771433	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-7/2016/TR	OL771434	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-8/2016/TR	OL771435	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-9/2016/TR	OL771436	Bu çalışma	Türkiye
G1	CKR-11/2016/TR	OL771437	Bu çalışma	Türkiye
G1	pvAF967	LC164085	Murakami ve ark., 2016	Japonya
G1	PUE_44A	MN707596	Montero ve ark., 2021	Meksika
G1	V50F13	MH170027	Dao ve ark., 2018	Vietnam
G1	COA_2L	MN707609	Montero ve ark., 2021	Meksika
G1	JOTK	AB987702	Oguma ve ark., 2017	Japonya
G1	LS2	HE967302	Moratorio ve ark., 2013	Uruguay
G1	pBLV913	EF600696	Polat ve ark., 2016	Paraguay
G1	pvAJ026	AP019590	Dube ve ark., 2000	Arjantin
G1	TLA	MN707591	Montero ve ark., 2021	Meksika
G1	HIDHeart_7	MN707620	Montero ve ark., 2021	Meksika
G1	JPEH-2	DQ412656	Zhao ve ark., 2007	Japonya
G1	S6F15	MH170028	Dao ve ark., 2018	Vietnam
G2	par17	LC080655	Polat ve ark., 2016	Paraguay
G2	Arg	AF257515	Dube ve ark., 2000	Arjantin
G2	lima40	LC080654	Polat ve ark., 2016	Peru
G3	USCA-3	DQ412665	Zhao ve ark., 2007	USA
G3	JPFU	DQ412657	Zhao ve ark., 2007	Japonya
G3	JPFU-3	EF428049	Zhao ve ark., 2007	Japonya
G4	R	K02251	Rice ve ark., 1984	-
G4	2_a-B	MN072349	NCBI	Rusya
G4	1_k-F	MN072355	NCBI	Rusya
G5	Costa Rica	AY700382	McGirr ve Buehring, 2006	Kostarika
G5	CRGC	DQ412649	Zhao ve ark., 2007	Kostarika
G5	CRAS-1	DQ412647	Zhao ve ark., 2007	Kostarika
G6	S9F16	MH170029	Dao ve ark., 2018	Vietnam
G6	par89	LC080657	Polat ve ark., 2016	Paraguay
G8	1_e-H	MN072348	NCBI	Rusya
G9	mon28	LC080662	Polat ve ark., 2016	Bolivya
G9	mon17	LC080660	Polat ve ark., 2016	Bolivya
G10	L1	LC154848	Polat ve ark., 2017	Myanmar
G10	S3	LC154849	Polat ve ark., 2017	Myanmar



Şekil 3.8. Bu çalışmadaki yerel viruslar ile GenBank'taki diğer ülkelere ait BLV tax gen bölgesi dizinleri (genotip 1-10, genotip 7 hariç) ile yapılan filogenetik analiz. Çalışmadaki yerel BLV'lerin adlandırması "İşletme kodu-Örnek Adı/Örnekleme Yılı/Ülke" şeklindedir. Yerel BLV'ler: ■ : TG, □ : TH, ▲ : KRC, ● : P, ◆ : CP, ○ : CKR.

3.3.2.2. pX Gen Bölgesi/Tax geni Amino Asit Dizin Sonuçları

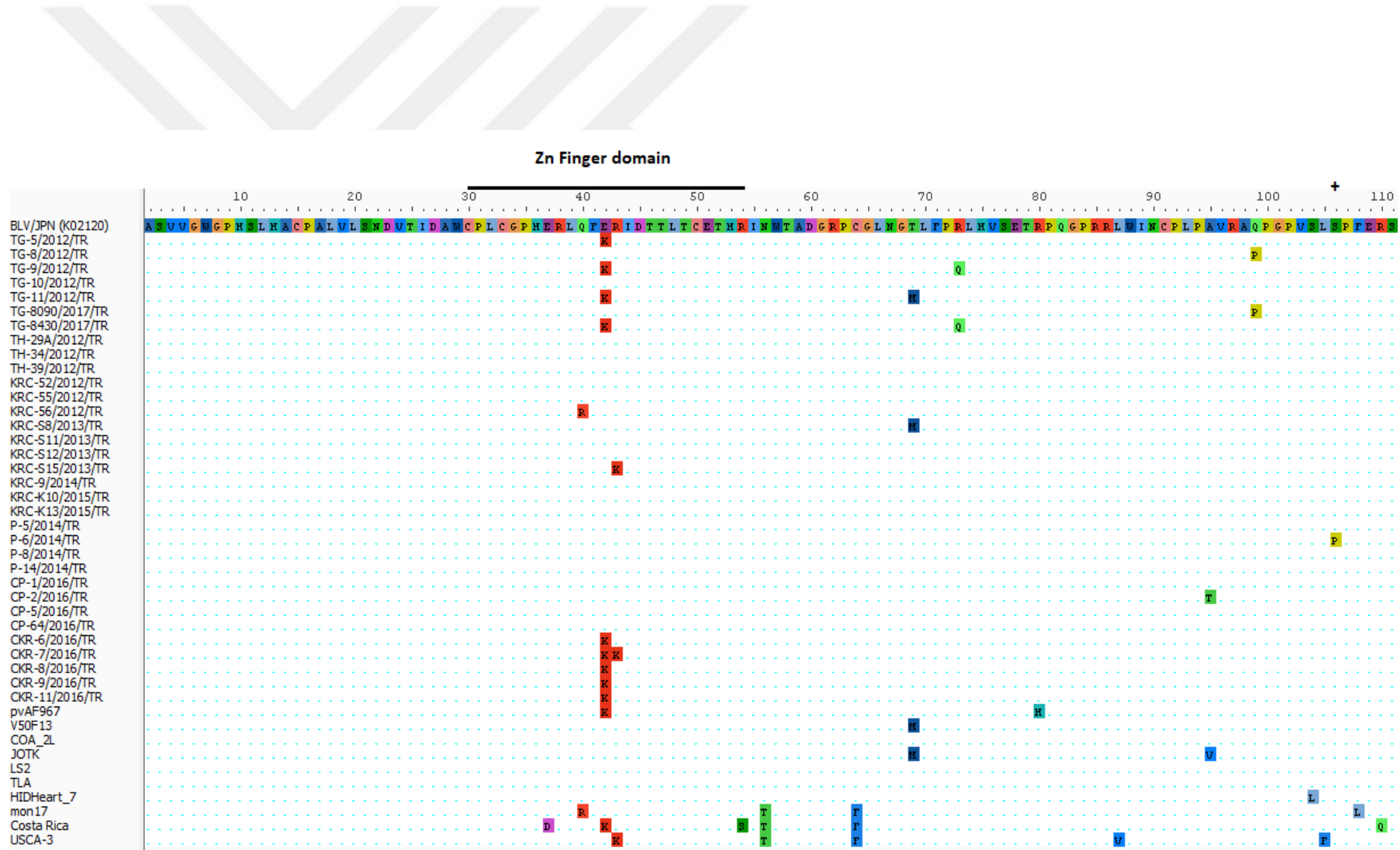
Bu çalışmada dizin bilgileri elde edilen BLV'lerin pX gen bölgesi/tax geni amino asit dizinlerinin K02120 referans suşu rehberliğinde GenBank'ta kayıtlı bazı BLV suşlarının dizinleri ile karşılaştırılması Şekil 3.9'da sunuldu. Çalışmadaki örneklerden elde edilen tax gen dizinleri BLV K02120 referans suşu ile karşılaştırıldığında, yerel virusların dizinlerinde bir kısım amino asit değişimine yol açan mutasyonların olduğu gözlemlendi. Çalışmadaki yerel virusların tax geni fonksiyonel bölgelerinde bulunan amino asit değişimleri ise Çizelge 3.6'da sunuldu. Tax geni fonksiyonel bölgelerinde bulunan amino asit değişimleri detaylı olarak incelendi ve çeşitli araştırmacılar tarafından (Niewiesk ve ark.,1995; Pluta ve ark., 2020; Pluta ve ark., 2021 ve Zyrianova ve ark., 2020) Tax proteininin işlevinde etkili olduğu bildirilen bölgelerde bulunan bazı amino asit değişimleri değerlendirildi. Bu bölgelerden;

'Zinc finger' bölgesinde; Q40R aa değişikliği; KRC-56/2012/TR'de, E42K aa değişikliği 9 örnekte (TG-5/2012/TR, TG-8/2012/TR, TG-11/2012/TR, TG-8430/2017/TR, CKR-6/2016/TR, CKR-7/2016/TR, CKR-8/2016/TR, CKR-9/2016/TR, CKR-11/2016/TR), R43K aa değişikliği iki örnekte (KRC-S15/2013/TR, CKR-7/2016/TR) tespit edildi.

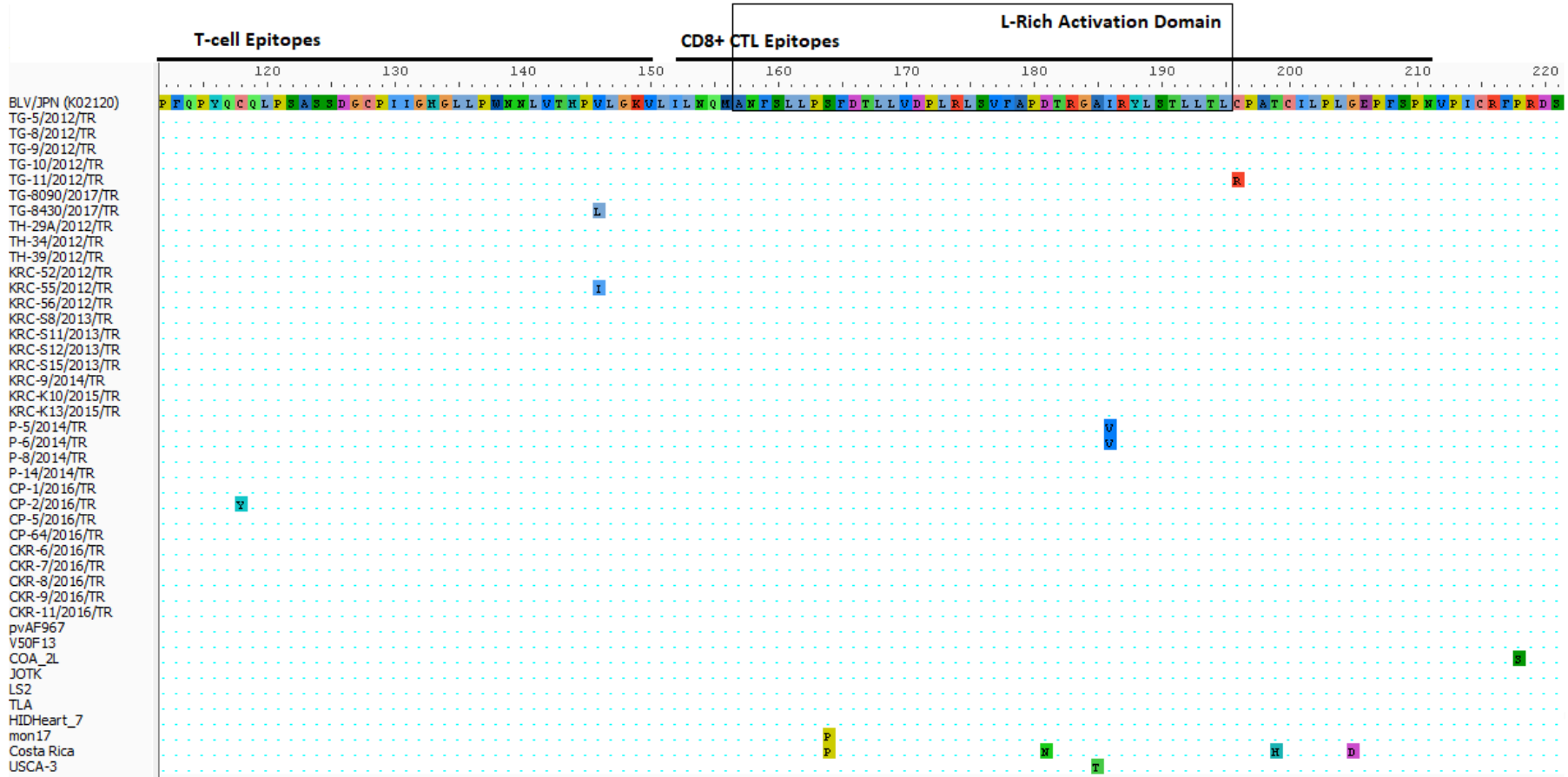
'Tcell epitope' bölgesinde; C118Y aa değişikliği CP-2/2016/TR'de, V146L aa değişikliği TG-8430/2017/TR'de, V146I aa değişikliği ise KRC-55/2012/TR'de tespit edildi.

'CD8+ CTL epitope' bölgesinde; I186V aa değişikliği iki örnekte (P-5/2014/TR, P-6/2014/TR), C196R aa değişikliği TG-11/2012/TR'de tespit edildi.

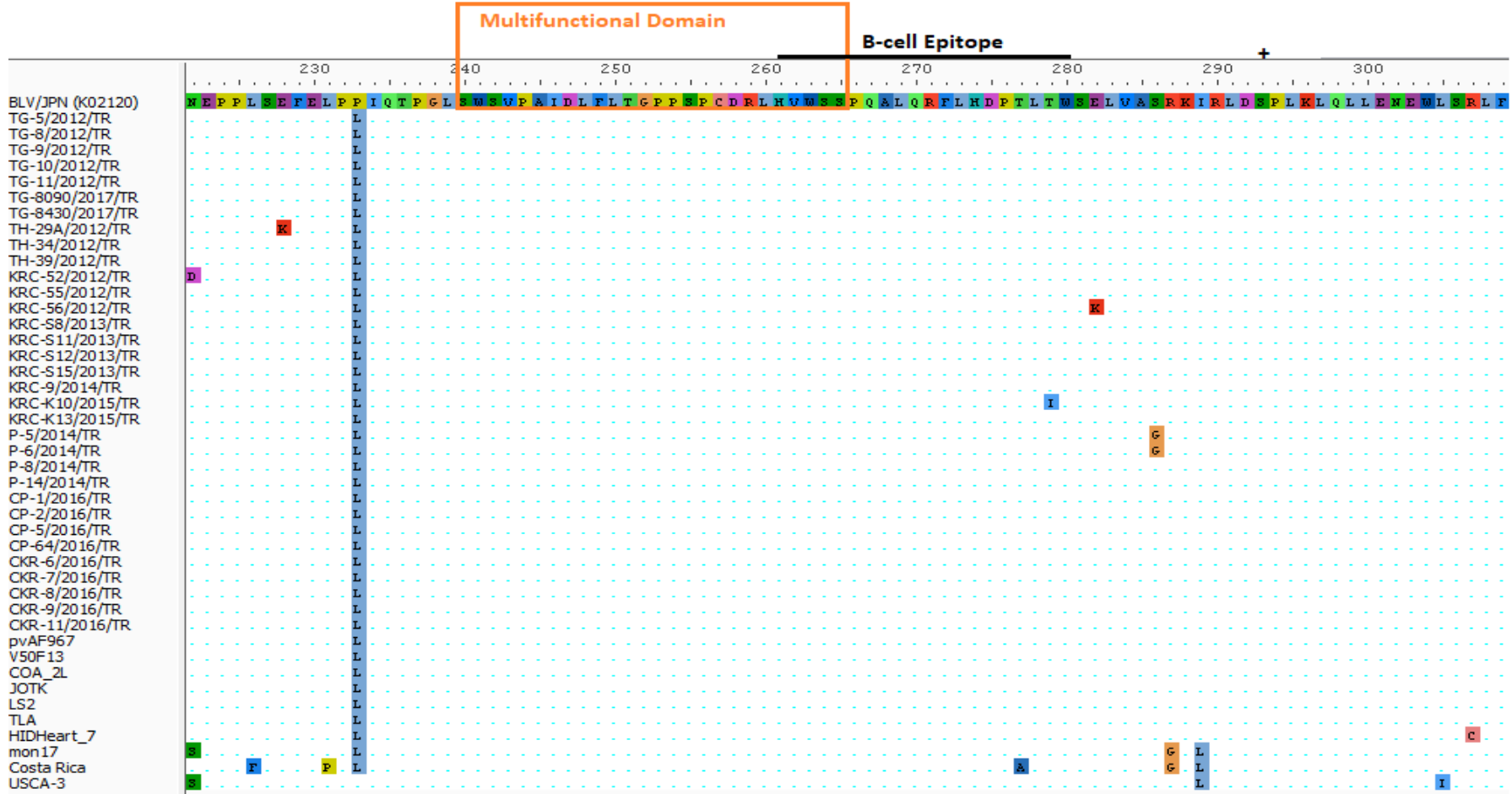
Tax geninde fonksiyonel olarak belirlenen bölgelerin haricinde de amino asit değişimlerinin varlığı çalışmadaki yerel viruslarda saptandı (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer referans suşların BLV tax gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması. (Fonksiyonel olarak önemli bölgeler olan ‘Zn finger domain’, ‘T-cell epitopes’, ‘B-cell epitope’ ve ‘CD8+ CTL epitopes’ siyah çizgilerle, ‘Leucine(L)-rich activation domain’ ve ‘Multifunctional domain’ kare içinde, fosforilasyon bölgeleri ise + ile işaretlenmiştir).



Şekil 3.9. Devam. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer referans suşların BLV tax gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması. (Fonksiyonel olarak önemli bölgeler olan ‘Zn finger domain’, ‘T-cell epitopes’, ‘B-cell epitope’ ve ‘CD8+ CTL epitopes’ siyah çizgilerle, ‘Leucine(L)-rich activation domain’ ve ‘Multifunctional domain’ kare içinde, fosforilasyon bölgeleri ise + ile işaretlenmiştir).



Şekil 3.9. Devam. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer referans suşların BLV tax gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması. (Fonksiyonel olarak önemli bölgeler olan ‘Zn finger domain’, ‘T-cell epitopes’, ‘B-cell epitope’ ve ‘CD8+ CTL epitopes’ siyah çizgilerle, ‘Leucine(L)-rich activation domain’ ve ‘Multifunctional domain’ kare içinde, fosforilasyon bölgeleri ise + ile işaretlenmiştir).

Çizelge 3.6. Tax gen aa dizin bilgilerinden hazırlanan aa değişikliklerin genomda bulunduğu fonksiyonel bölgeler ve pozisyonları.

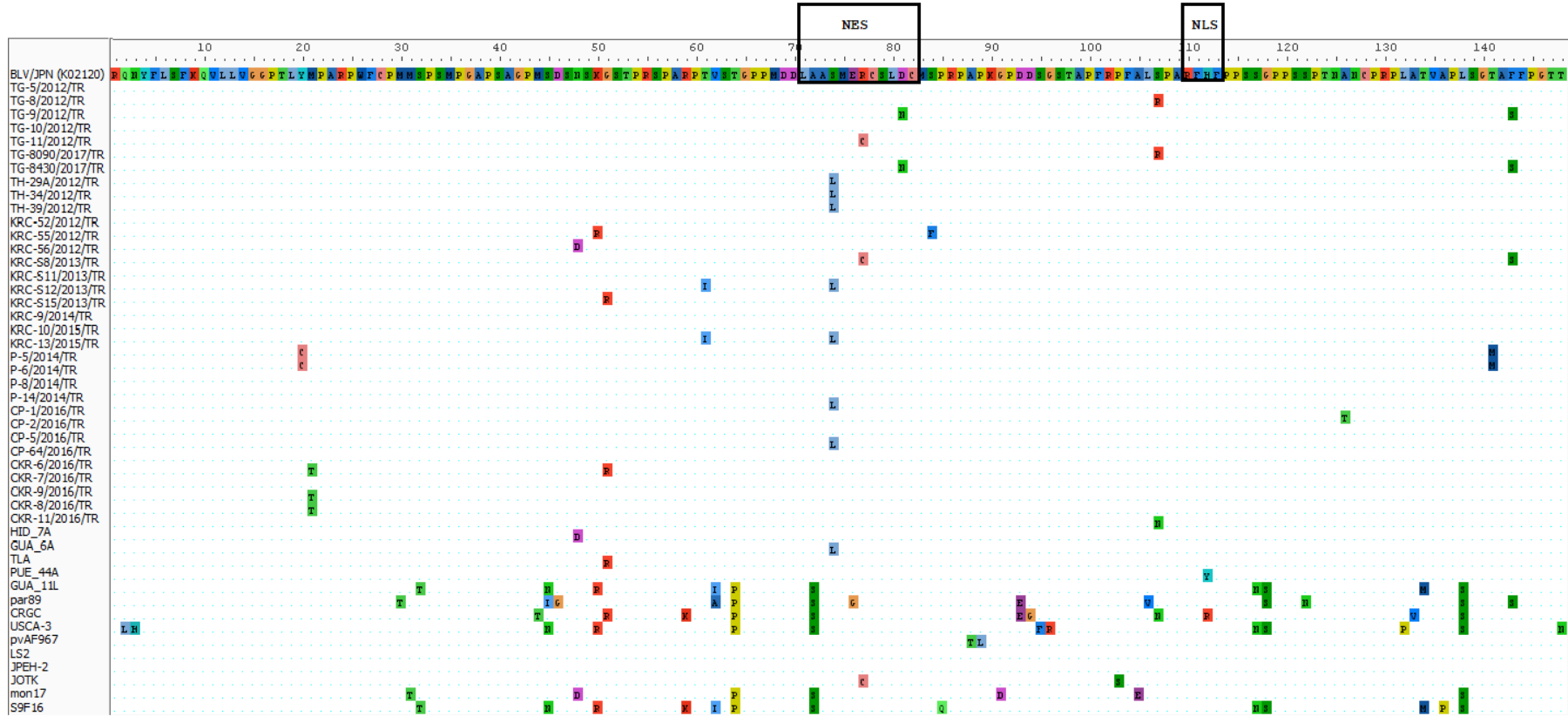
İşletme	Örnek Adı	Pozisyon (aa)	Fonksiyonel Bölge
TG/2012	TG-5/2012/TR	E42K,P233L	Zn finger domain',-
	TG-8/2012/TR	E42K,Q99P,P233L	Zn finger domain',-,-
	TG-9/2012/TR	R73Q,P233L	-, -
	TG-10/2012/TR	P233L	-
	TG-11/2012/TR	E42K,T69M,C196R,P233L	Zn finger domain',-, 'CTL epitope'+ 'L rich domain', -
TG/2017	TG-8430/2017/TR	E42K,R73Q,V146L,P233L	Zn finger domain',-, 'Tcell epitope', -
	TG-8090/2017/TR	Q99P,P233L	-, -
TH/2012	TH-29A/2012/TR	E228K,P233L	-, -
	TH-34/2012/TR	P233L	-
	TH-39/2012/TR	P233L	-
KRC/2012	KRC-52/2012/TR	N222D,P233L	-, -
	KRC-55/2012/TR	V146I,P233L	T cell epitope', -
	KRC-56/2012/TR	Q40R,P233L,E282K	Zn finger domain',-,-
KRC/2013	KRC-S8/2013/TR	T69M,P233L	-, -
	KRC-S11/2013/TR	P233L	-
	KRC-S12/2013/TR	P233L	-
	KRC-S15/2013/TR	R43K,P233L	Zn finger domain', -
KRC/2014	KRC-9/2014/TR	P233L	
KRC/2015	KRC-K10/2015/TR	P233L,T279I	-, 'B cell epitope '
	KRC-K13/2015/TR	P233L	-
P/2014	P-5/2014/TR	I186V,P233L,S286G	CTL epitope'+ 'L rich domain',-,- phosphorylation site', 'CTL epitope'+ 'L rich domain',-,-
	P-6/2014/TR	S106P,I186V,P233L,S286G	
	P-8/2014/TR	P233L	-
	P-14/2014/TR	P233L	-
CP/2016	CP-1/2016/TR	P233L	-
	CP-2/2016/TR	A95T,C118Y,P233L	-, 'Tcell epitope', -
	CP-5/2016/TR	P233L	-
	CP-64/2016/TR	P233L	-
CKR/2016	CKR-6/2016/TR	E42K,P233L	Zn finger domain', -
	CKR-7/2016/TR	E42K,R43K,P233L	Zn finger domain', 'Zn finger domain', -
	CKR-8/2016/TR	E42K,P233L	Zn finger domain', -
	CKR-9/2016/TR	E42K,P233L	Zn finger domain', -
	CKR-11/2016/TR	E42K,P233L	Zn finger domain', -

3.2.3. pX Gen Bölgesi/*rex* geni Amino Asit Dizin Sonuçları

Bu çalışmada dizin bilgileri elde edilen BLV'lerin pX gen bölgesi/*rex* geni amino asit dizinleri, K02120 referans suşu rehberliğinde GenBank'ta kayıtlı bazı BLV suşlarının aa dizinleri ile birlikte karşılaştırılarak meydana gelen mutasyonlar incelendi. Çalışmada elde edilen yerel virusların ve diğer referans suşların BLV *rex* gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması Şekil 3.10, yer alan suşlara ait bilgiler de Çizelge 3.7'de sunuldu.

Çalışmadaki örneklerden elde edilen *rex* gen aa dizinleri BLV referans suşu K02120 ile karşılaştırıldığında, yerel virusların aa dizinlerinde çeşitli mutasyonların olduğu tespit edildi. Yerel virusların *rex* geninde, araştırmacılar tarafından (Choi ve Hope, 2005) Rex proteininin işlevinde etkili olduğu bildirilen NES bölgesinde yer alan ve çalışmadaki viruslarda tespit edilen amino asit değişimleri detaylı olarak incelendiğinde; **S74L** değişimi yedi örnekte; TH-29A/2012/TR, TH-34/2012/TR, TH-39/2012/TR, CP-1/2016/TR, CP-64/2016/TR, KRC-S12/2013/TR, KRC-13/2015/TR, **R77C** değişimi iki örnekte; TG-11/2012/TR, KRC-S8/2013/TR, **D81N** değişimi de iki örnekte; TG-9/2012/TR, TG-8430/2017/TR tespit edildi. Yerel viruslarda bulunan amino asit değişimleri ve değişimlerin yer aldığı fonksiyonel bölgeler Çizelge 3.8'de sunuldu.

Ayrıca, çalışmada elde edilen 33 örneğe ait *rex* gen dizinlerinin, K02120 referans suşuyla, kendi aralarında ve Şekil 3.10'da yer alan diğer ülkelere ait dizinler ile aa benzerlik oranları incelendi. Çalışmada elde edilen 33 örneğe ait *rex* gen dizinlerinin aa benzerlik oranları K02120 referans suşu ile % 98,64-100, kendi aralarında % 97,29 – 100, Şekil 3.10'da yer alan diğer ülkelere ait dizinler ile de % 87,83 – 100 olarak tespit edildi.



Şekil 3.10. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer referans suşların BLV rex gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması.

Çizelge 3.7. Çalışmada elde edilen yerel virusların ve diğer referans suşların BLV rex gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılmasında yer alan suşlara ait bilgiler.

Örnek adı	'Accession' no	Referans	Ülke
BLV/JPN	K02120	Sagata ve ark., 1985	Japonya
TG-5/2012/TR	OL771405	Bu çalışma	Türkiye
TG-8/2012/TR	OL771406	Bu çalışma	Türkiye
TG-9/2012/TR	OL771407	Bu çalışma	Türkiye
TG-10/2012/TR	OL771408	Bu çalışma	Türkiye
TG-11/2012/TR	OL771409	Bu çalışma	Türkiye
TG-8090/2017/TR	OL771410	Bu çalışma	Türkiye
TG-8430/2017/TR	OL771411	Bu çalışma	Türkiye
TH-29A/2012/TR	OL771412	Bu çalışma	Türkiye
TH-34/2012/TR	OL771413	Bu çalışma	Türkiye
TH-39/2012/TR	OL771414	Bu çalışma	Türkiye
KRC-52/2012/TR	OL771415	Bu çalışma	Türkiye
KRC-55/2012/TR	OL771416	Bu çalışma	Türkiye
KRC-56/2012/TR	OL771417	Bu çalışma	Türkiye
KRC-S8/2013/TR	OL771418	Bu çalışma	Türkiye
KRC-S11/2013/TR	OL771419	Bu çalışma	Türkiye
KRC-S12/2013/TR	OL771420	Bu çalışma	Türkiye
KRC-S15/2013/TR	OL771421	Bu çalışma	Türkiye
KRC-9/2014/TR	OL771422	Bu çalışma	Türkiye
KRC-10/2015/TR	OL771423	Bu çalışma	Türkiye
KRC-13/2015/TR	OL771424	Bu çalışma	Türkiye
P-5/2014/TR	OL771425	Bu çalışma	Türkiye
P-6/2014/TR	OL771426	Bu çalışma	Türkiye
P-8/2014/TR	OL771427	Bu çalışma	Türkiye
P-14/2014/TR	OL771428	Bu çalışma	Türkiye
CP-1/2016/TR	OL771429	Bu çalışma	Türkiye
CP-2/2016/TR	OL771430	Bu çalışma	Türkiye
CP-5/2016/TR	OL771431	Bu çalışma	Türkiye
CP-64/2016/TR	OL771432	Bu çalışma	Türkiye
CKR-6/2016/TR	OL771433	Bu çalışma	Türkiye
CKR-7/2016/TR	OL771434	Bu çalışma	Türkiye
CKR-9/2016/TR	OL771435	Bu çalışma	Türkiye
CKR-8/2016/TR	OL771436	Bu çalışma	Türkiye
CKR-11/2016/TR	OL771437	Bu çalışma	Türkiye
HID_7A	MN707601	Montero ve ark., 2021	Meksika
GUA_6A	MN707605	Montero ve ark., 2021	Meksika
TLA	MN707592	Montero ve ark., 2021	Meksika
PUE_44A	MN707596	Montero ve ark., 2021	Meksika
GUA_11L	MN707603	Montero ve ark., 2021	Meksika
par89	LC080657	Polat ve ark., 2016	Paraguay
CRGC	DQ412649	Zhao ve ark., 2007	Kostarika
USCA-3	DQ412665	Zhao ve ark., 2007	USA
pvAF967	LC164085	Murakami ve ark., 2016	Japonya
LS2	HE967302	Moratorio ve ark., 2013	Uruguay
JPEH-2	DQ412656	Zhao ve ark., 2007	Japonya
JOTK	AB987702	Oguma ve ark., 2017	Japonya
mon17	LC080660	Polat ve ark., 2016	Bolivya
S9F16	MH170029	Dao ve ark., 2018	Vietnam

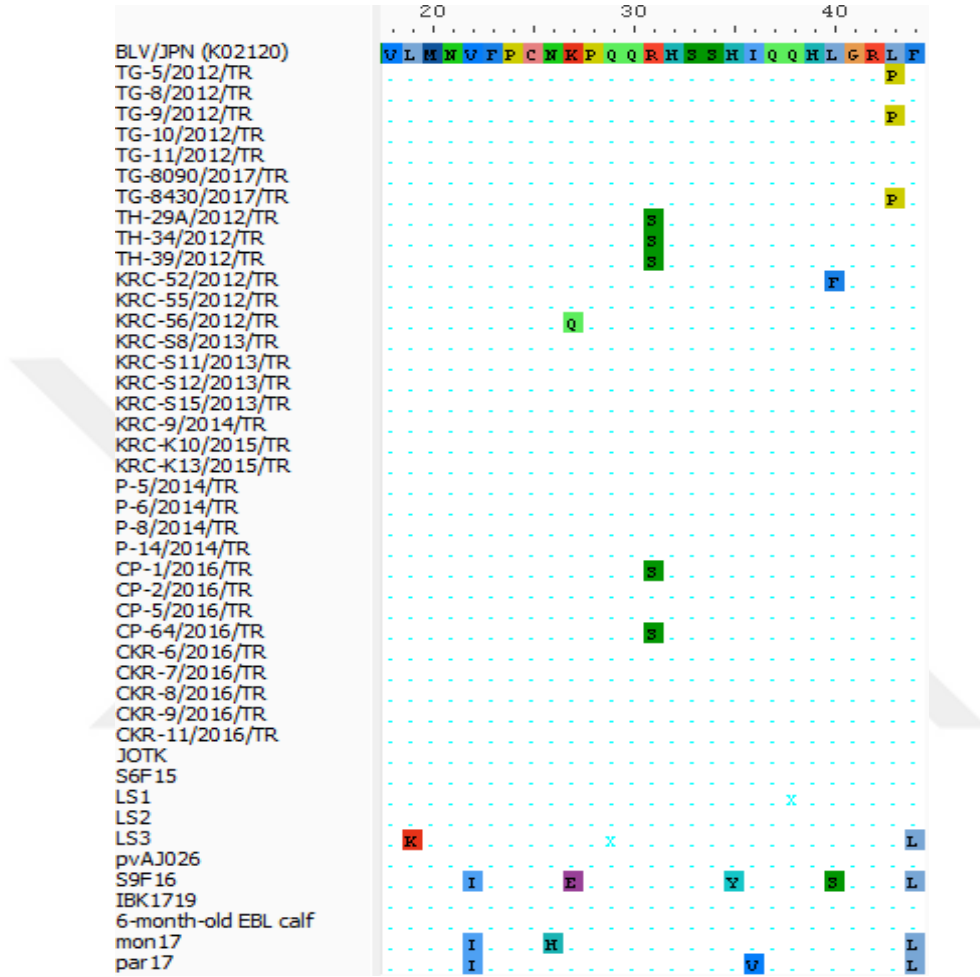
Çizelge 3.8. Rex gen aa dizin bilgilerinden özetle hazırlanan aa değişikliklerin genomda bulunduğu fonksiyonel bölgeler ve pozisyonları.

İşletme	Örnek Adı	Pozisyon(Aa)	Fonksiyonel Bölge
TG/2012	TG-5/2012/TR		-
	TG-8/2012/TR	S107R	-
	TG-9/2012/TR	D81N,F143S	Nuclear export signal (NES)
	TG-10/2012/TR		
	TG-11/2012/TR	R77C	Nuclear export signal (NES)
TG/2017	TG-8430/2017/TR	D81N,F143S	Nuclear export signal (NES)
	TG-8090/2017/TR	S107R	-
TH/2012	TH-29A/2012/TR	S74L	Nuclear export signal (NES)
	TH-34/2012/TR	S74L	Nuclear export signal (NES)
	TH-39/2012/TR	S74L	Nuclear export signal (NES)
KRC/2012	KRC-52/2012/TR		
	KRC-55/2012/TR	K50R,S84F	-
	KRC-56/2012/TR	N48D	-
KRC/2013	KRC-S8/2013/TR	R77C,F143S	Nuclear export signal (NES)
	KRC-S11/2013/TR		
	KRC-S12/2013/TR	T60I,S74L	Nuclear export signal (NES)
	KRC-S15/2013/TR	G51R	--
KRC/2014	KRC-9/2014/TR		
KRC/2015	KRC-10/2015/TR		
	KRC-13/2015/TR	T60I,S74L	Nuclear export signal (NES)
P/2014	P-5/2014/TR	Y20C,T141M	-
	P-6/2014/TR	Y20C,T141M	-
	P-8/2014/TR		
	P-14/2014/TR		
CP/2016	CP-1/2016/TR	S74L	Nuclear export signal (NES)
	CP-2/2016/TR	A126T	-
	CP-5/2016/TR		
	CP-64/2016/TR	S74L	Nuclear export signal (NES)
CKR/2016	CKR-6/2016/TR		
	CKR-7/2016/TR	M21T,G51R	-
	CKR-8/2016/TR	M21T	-
	CKR-9/2016/TR		
	CKR-11/2016/TR	M21T	-

3.3.2.4. pX Gen Bölgesi/R3 ve G4 genleri Amino Asit Dizin Sonuçları

Bu çalışmada dizin bilgileri elde edilen BLV'lerin pX gen bölgesi/R3/G4 gen amino asit dizinleri, K02120 referans suşu rehberliğinde GenBank'ta kayıtlı bazı BLV suşlarının gen dizinleri ile birlikte karşılaştırılması R3 için Şekil 3.11'de, G4 için Şekil

3.12’de sunuldu. Karşılaştırmada kullanılan suşlara ait bilgiler ise Çizelge 3.9’da sunuldu.



Şekil 3.11. Çalışmadaki yerel virusların ve diğer referans suşların BLV pX/R3 gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılması.

R3 gen bölgesi aa dizinleri K02120 referans suşu rehberliğinde incelendiğinde, fonksiyonel herhangi bir bölge tanımlanmamakla birlikte, beş örnekte (TH-29A/2012/TR, TH-34/2012/TR, TH-39/2012/TR, CP-1/2016/TR, CP-64/2016/TR) **R31S** değişimi dikkat çekici bulundu.

Çizelge 3.9. Çalışmada elde edilen yerel virusların ve diğer referans suşların BLV R3/G4 gen aa dizinlerinin K02120 rehberliğinde karşılaştırılmasında yer alan suşlara ait bilgiler.

Gen Bölgesi	Örnek adı	'Accession' no	Referans	Ülke
R3/G4	BLV/JPN	K02120	Sagata ve ark., 1985	Japonya
R3/G4	TG-5/2012/TR	OL771405	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	TG-8/2012/TR	OL771406	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	TG-9/2012/TR	OL771407	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	TG-10/2012/TR	OL771408	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	TG-11/2012/TR	OL771409	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	TG-8090/2017/TR	OL771410	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	TG-8430/2017/TR	OL771411	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	TH-29A/2012/TR	OL771412	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	TH-34/2012/TR	OL771413	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	TH-39/2012/TR	OL771414	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	KRC-52/2012/TR	OL771415	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	KRC-55/2012/TR	OL771416	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	KRC-56/2012/TR	OL771417	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	KRC-S8/2013/TR	OL771418	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	KRC-S11/2013/TR	OL771419	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	KRC-S12/2013/TR	OL771420	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	KRC-S15/2013/TR	OL771421	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	KRC-9/2014/TR	OL771422	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	KRC-10/2015/TR	OL771423	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	KRC-13/2015/TR	OL771424	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	P-5/2014/TR	OL771425	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	P-6/2014/TR	OL771426	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	P-8/2014/TR	OL771427	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	P-14/2014/TR	OL771428	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	CP-1/2016/TR	OL771429	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	CP-2/2016/TR	OL771430	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	CP-5/2016/TR	OL771431	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	CP-64/2016/TR	OL771432	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	CKR-6/2016/TR	OL771433	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	CKR-7/2016/TR	OL771434	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	CKR-9/2016/TR	OL771435	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	CKR-8/2016/TR	OL771436	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	CKR-11/2016/TR	OL771437	Bu çalışma	Türkiye
R3/G4	LS1	HE967301	Moratorio ve ark., 2013	Uruguay
R3/G4	LS2	HE967302	Moratorio ve ark., 2013	Uruguay
R3/G4	LS3	HE967303	Moratorio ve ark., 2013	Uruguay
R3/G4	JOTK	AB987702	Oguma ve ark., 2017	Japonya
R3/G4	mon17	LC080660	Polat ve ark., 2016	Bolivya
R3/G4	par17	LC080655	Polat ve ark., 2017	Myanmar
R3/G4	S9F16	MH170029	Dao ve ark., 2018	Vietnam
R3/G4	S6F15	MH170028	Dao ve ark., 2018	Vietnam
R3/G4	pVAJ026	AP019590	Dube ve ark., 2000	Arjantin
R3/G4	IBK1719	LC552983	Nishimori ve ark., 2021	Japonya
R3/G4	6-month-old EBL calf	AB934283	NCBI	Japonya

Çalışmada elde edilen 33 örneğe ait R3 gen dizinlerinin, K02120 referans suşuyla, kendi aralarında ve Şekil 3.11’de yer alan diğer ülkelere ait dizinler ile aa benzerlik oranları incelendi. Çalışmada elde edilen 33 örneğe ait R3 gen dizinlerinin

aa benzerlik oranları K02120 referans suşuyla %96,29-100, kendi aralarında %92,59–100, Şekil 3.11’de yer alan diğer ülkelere ait dizinler ile de % 77,77-%100 olarak tespit edildi.

G4 gen bölgesi aa dizinleri K02120 referans suşu rehberliğinde incelendiğinde; LTR gen bölgesi ile örtüşen kısımdan kodlanan G4 geninin ‘Leader peptide’ bölgesinde, KRC-52/2012/TR’de **F8L** değişimi, KRC-56/2012/TR’de **F22S** değişimi, BLV pX gen bölgesi dizinlerinde kodlanan ve fonksiyonel bölge olarak tanımlanan arjininden zengin ‘ARR’ bölgesinde; KRC-S15/2013/TR’de **A65V** aa değişimi gözlemlendi. Ayrıca, KRC-56/2012/TR’de 50. ve 51. aa’ler arasında 3 aa insersiyonu (LLP) tespit edildi. TG-8/2012/TR ve TG-8090/2017/TR örneklerinde ise 49. ve 50. pozisyonlardaki kodonların nükleotitlerinde meydana gelen delesyon nedeniyle bu kodonlardan aa sentezlenmediği tespit edildi. pX gen bölgesi/G4 gen dizin bilgileri elde edilen 33 örneğin 16 tanesinde fonksiyonel bir bölge olmamasına rağmen ısrarcı olarak 52. aminoasitte **H>L** değişimi gözlemlendi. Ayrıca bahsedilen H>L değişiminin diğer ülkelere ait dört suşta daha olduğu tespit edildi (Şekil 3.12).

Çalışmada elde edilen 33 örneğe ait G4 gen dizinlerinin kendi aralarında, K02120 referans suşu ve Şekil 3.12’de yer alan diğer ülkelere ait dizinler ile aa benzerlik oranları incelendi. G4 gen dizinlerinin aa benzerlik oranları K02120 referans suşuyla %96,19-100, kendi aralarında %93,33–100, Şekil 3.12’de yer alan diğer ülkelere ait dizinler ile de %92,38–100 olarak tespit edildi.

Çalışmada elde edilen yerel virusların LTR, Tax, G4 genlerinin fonksiyonel/fonksiyonel olmayan bölgelerinde yer alan ve BLV’nin patogenezi ya da lenfosarkom oluşumu ile ilişkilendirilen nt ve aa değişimleri Çizelge 3.10’da sunuldu.

Çizelge 3.10. Çalışmada elde edilen bir kısım yerel virusun LTR, Tax ve G4 geni bazı fonksiyonel olan/olmayan bölgelerinde yer alan nt ve aa değişimlerinin birlikte gösterimi.

GEN BÖLGESİ		LTR					TAX		G4
ÖRNEKLER		'Nfkb-Like'*			Gre-Tre3**	TATA *	'CTL epitope**'		Delesyon**
İŞLEİME KODU	ÖRNEK ADI	A69T	C111A	A117G	G148A	T175C	I186V	C196R	49-50 aa
TG/2012	TG-5/2012/TR	-	-	-	+	-	-	-	-
	TG-8/2012/TR	-	-	-	-	-	-	-	+
	TG-9/2012/TR	-	-	-	+	-	-	-	-
	TG-10/2012/TR	-	-	-	-	+	-	-	-
	TG-11/2012/TR	-	-	-	-	-	-	+	-
TG/2017	TG-8090/2017/TR	-	-	-	-	-	-	-	+
	TG-8430/2017/TR	-	-	-	+	-	-	-	-
TH/2012	TH-29A/2012/TR	-	-	-	-	-	-	-	-
	TH-34/2012/TR	-	-	-	-	-	-	-	-
	TH-39/2012/TR	+	-	-	-	-	-	-	-
KRC/2012	KRC-52/2012/TR	-	-	-	+	-	-	-	-
	KRC-55/2012/TR	-	-	-	+	-	-	-	-
	KRC-56/2012/TR	-	-	-	-	-	-	-	-
KRC/2013	KRC-S8/2013/TR	-	-	-	-	-	-	-	-
	KRC-S11/2013/TR	-	-	-	-	+	-	-	-
	KRC-S12/2013/TR	-	-	-	+	-	-	-	-
	KRC-S15/2013/TR	-	-	-	-	+	-	-	-
KRC/2014	KRC-9/2014/TR	-	-	-	-	+	-	-	-
KRC/2015	KRC-K10/2015/TR	-	-	-	-	+	-	-	-
	KRC-K13/2015/TR	-	-	-	+	-	-	-	-
P/2014	P-5/2014/TR	-	-	-	-	-	+	-	-
	P-6/2014/TR	+	-	+	-	-	+	-	-
	P-8/2014/TR	-	+	-	-	+	-	-	-
	P-14/2014/TR	-	-	-	-	+	-	-	-
CP/2016	CP-1/2016/TR	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP-2/2016/TR	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP-5/2016/TR	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP-64/2016/TR	-	-	-	-	-	-	-	-
CKR/2016	CKR-6/2016/TR	-	-	-	-	-	-	-	-
	CKR-7/2016/TR	-	-	-	-	-	-	-	-
	CKR-8/2016/TR	-	-	-	-	-	-	-	-
	CKR-9/2016/TR	-	-	-	-	-	-	-	-
	CKR-11/2016/TR	-	-	-	-	-	-	-	-

* : Yüksek transkripsiyon ile ilişkilendirilen bölgeler/mutasyonlar.

** : Düşük transkripsiyon ile ilişkilendirilen/ lenfosarkom suşlarında olabileceği bildirilen mutasyonlar.

4. TARTIŞMA

BLV, birçok ülkede yaygın olarak bulunmakta ve ülkeler arası ticaret ile de yayılarak önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. BLV Türkiye'de uzun süredir varlığını sürdürmektedir ve 1991'den beri BLV enfeksiyonunun prevalansını belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır. Ancak Türkiye'deki BLV 'lerin genetik karakterizasyonu hakkındaki bilgi ise sınırlıdır. Bu çalışmada, Türkiye'deki BLV genotip(ler)i ve genetik değişkenliği hakkında bilgi edinmek amacıyla; Türkiye'nin farklı illerinde bulunan organize işletmelerde yetiştirilen, 2012-2017 yılları arasında temin edilmiş ve ELISA ile BLV pozitif bulunan 179 tanı materyali, BLV proviral DNA'sı yönünden test edilmiştir. Bu örneklerden 126 tanesi PCR testi ile *env* gen yönünden pozitif bulunmuş, 53 tanesi ise muhtemelen aradan geçen zaman ve saklama koşullarına bağlı nükleik asit kaybı nedeniyle, bu çalışmada BLV yönünden PCR ile negatif bulunmuştur.

Bugüne kadar Türkiye'de BLV'lerin moleküler karakterizasyonunu üzerine bildiren çalışmalar (Alkan ve ark., 2011; Alkan ve ark., 2021; Değirmenci, 2011 ve Doğan ve ark., 2020) iki farklı genotipin (G1 ve G4) varlığını ortaya koymuştur. Bu çalışmada kullanılan örneklerin bir kısmı (n=25) ile ilgili *env* gp51 gen bölgesi kısmi dizinlerinin sunulduğu çalışma (Alkan ve ark., 2021) verilerine benzer olarak, bu çalışmada BLV *env* gen bölgesi dizinleri elde edilen 57 yerel virusun filogenetik analizi, yerel virusların G1'de yer aldığını göstermiştir (Şekil 3.2). Ayrıca çalışmadaki yerel viruslar ve diğer ülkelere ait BLV suşların LTR ve Tax gen bölgesi dizinleri ile yapılan filogenetik analizlerde de yerel virusların, *env* gen bölgesi dizinleri ile yapılan filogenetik analiz ile benzer olarak, Japonya, USA, Vietnam ve Uruguay gibi G1'de yer alan BLV suşları ile birlikte yer aldığı görülmüştür (Şekil 3.5; Şekil 3.8). BLV'lerin genotiplendirme çalışmalarında her ne kadar *env* gen bölgesi dizinleri kullanılsa da, diğer bazı çalışmalarda da (Pluta ve ark., 2018 ve Pluta ve ark., 2021) bildirildiği gibi LTR ve *tax* gen bölgeleri içinde benzer kümelenmenin olduğu gözlenmiştir. Bir ülkede hatta bir sürüde birden fazla genotipin varlığı daha önce

birçok çalışmada rapor edilmiştir (Ochirkhuu ve ark., 2016 ve Yu ve ark., 2019). Farklı ülkelerden yapılan araştırmalar, G1'in en baskın genotip olduğunu, G4'ün ise ikinci en yaygın genotip olduğunu ortaya koymuştur. Türkiye'ye hayvan ithalatının tarihi göz önüne alındığında bu çalışmadaki örneklerde dünyada en yaygın genotip olarak bildirilen BLV G1'in tespiti, ayrıca diğer bir çalışma da süt sığırcılığı için çok önemli bir bölge olan Marmara Bölgesi'nde ikinci en yaygın genotip olan G4'ün tespiti (Değirmenci, 2011), enfeksiyon kaynağının canlı hayvan ithalatı ile ilgili olabileceği ihtimalini yükseltmektedir. G1 hemen hemen tüm kıtalara dağılmıştır ve özellikle hala BLV enfeksiyonu prevalansının yüksek olduğu Güney ve Kuzey Amerika'da oldukça yaygındır. Ayrıca G1 Japonya, Kore, Filipinler, Tayland ve Moğolistan gibi Asya ülkelerinde de yaygındır. Küresel Tarım Bilgi Ağı Raporu'nda belirtildiği gibi, uzun süredir Avrupa, ABD ve ayrıca Güney Amerika'dan (Brezilya, Uruguay vb.) Türkiye'ye canlı hayvan ithal edilmesi ve bu ülkelerde farklı genotiplerin (genotip 1, 2, 4, 5, 6, 7 ve 9) tespiti ile ilgili bildirilen çalışmalar (Camargos ve ark., 2007; Fechner ve ark., 1997; Moratorio ve ark., 2010 ve Zhao ve Buehring, 2007) nedeniyle genotip tespiti ile ilgili çalışmaların sürdürülmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Bir sürü veya ülkede dolaşan genotip(ler)in tespitine ek olarak, virusun evrimini anlamak için genetik karakterizasyon çok önemlidir. Env gp51 glikoproteini nötralizan antikörlerin oluşumunu uyarır ve N'-den C-terminal ucuna kadar G, H, F, E-E', B-B', D-D' ve A olarak adlandırılan yedi epitop içerir ve bunlardan üçü (G, H ve F) virus nötralizasyonu ve sınırlı oluşumu inhibisyonunun ana belirleyicileri olan konformasyonel epitoplardır. Bu çalışmadaki BLV viruslarının Env gp51 moleküler karakterizasyonu ile fonksiyonel olan/olmayan bölgelerde bazı mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar sonucu meydana gelen aa değişimleri ise; P94T, Q95K, G96R, P112A, D128E, N129H, F146S, H148Y/L, G154R, S189G olarak gözlenmiştir (Şekil 3.3). Elde edilen dizinlerde konformasyonel (F ve G) ve lineer (B ve E) epitopların karşılaştırılması, B ve G'nin korunduğunu ortaya çıkarmıştır. F epitopunda KRC-2/2014/TR'de Q95K değişimi gözlenmiş; E epitopunda ise birçok araştırmacı (Ochirkhuu ve ark., 2016; Polat ve ark., 2015; Rola-Luszczak ve ark., 2013 ve Yang ve ark., 2019) tarafından da bildirilen S189G amino asit değişimi TG-10/2012/TR, TG-18/2012/TR ve TG-8304/2017/TR'de gözlenmiştir (Şekil 3.3).

BLV gp51'de bulunan üç nötralizasyon alanının (ND1, ND2 ve ND3) BLV-nötralizasyon alanlarından ND1 ve ND3 korunurken, ND2 'de 2 farklı pozisyonda üç amino asit değişimi F146S, H148Y ve H148L tespit edilmiştir (Şekil 3.3). TG-11/2012/TR'de tespit edilen F146S değişimi araştırmacılar tarafından çoğunlukla Uruguay suşlarında rapor edilmiştir (Moratorio ve ark., 2010 ve Rola-Łuszczak ve ark., 2013). Yedi yerel virusta tespit edilen H148Y değişimi ise daha önce Genbank'a veri girişi yapılan diğer Türkiye yerel viruslarından MH286354'te gözlenmiştir. Bu mutasyonların enfektiviteyi etkilemedeki rolü bilinmemekle birlikte, env gp51'in yüzeyinde yer aldıkları için, viral füzyonu ve BLV'nin in vivo enfektivitesini etkileyebilecekleri düşünülmektedir (Gatot ve ark., 2002 ve Pluta ve ark., 2017). BLV gp51 ayrıca, BLV ile enfekte olmuş sığırlarda proliferatif tepkilerin indüklenmesinde rol oynayan CD4+ T hücre epitopu ve CD8+ T hücre epitopu içerir (Pluta ve ark., 2017). CD4+ T hücre epitopunda yer alan P94T değişimi KRC-2/2014/TR'de, G96R değişimi KRC-K2/2015/TR ve CP-44/2016/TR'de tespit edilmiştir. CD8+T hücre epitopunda ise CP-67/2016/TR'de G154R değişimi gözlenmiştir (Şekil 3.3). CD8+ T hücre epitopu, in vivo viral füzyon ve enfektivite için kritik olan çinko bağlayıcı peptit ile de örtüştüğünden, bu bölgedeki herhangi bir amino asit değişikliğinin BLV enfektivitesini değiştirebileceği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Pluta ve ark., 2017).

BLV genomunun çoğu korunmuş görünse de, bazı bölgelerde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Şimdiye kadar mevcut görüş, dizin varyasyonlarının BLV patolojisinden gelen mutasyonel baskıdan ziyade izolatın coğrafi kökeninin bir yansıması olduğu yönündedir. Bununla birlikte, farklı izolatları ayırt eden az sayıdaki nokta mutasyonlarının fonksiyonel önemi olup olmadığı net değildir. Bu mutasyonların çoğu, viral promotör ve güçlendiricileri içeren BLV LTR bölgesinde bulunmuştur (Murakami ve ark., 2019 ve Pluta ve ark., 2020).

Yapılan bir çalışma (Zhao ve ark., 2007a) ile BLV 5' LTR dizinlerinde önemli bazı değişiklikler tespit edilmiş ve çeşitli ülkelere ait BLV'lerin yedi genetik gruba ayrıldığı; ayrıca Japonya'da yapılan bu çalışmada kullanılan BLV izolatlarının ABD'deki bazı izolatlarla LTR gen diziliminin aynı olduğu ve birlikte konsensus grubunu oluşturduğu bildirilmiştir. BLV LTR'nin kümelenmesindeki farklı coğrafi bölgelerden gelen yüksek düzeyde ilişkili dizilerin, hayvan transportundan kaynaklanıyor olabileceği ve Japon hayvan karantina servisi tarafından yasaklanana kadar büyükbaş hayvanların ABD'den Japonya'ya sıklıkla ithal edildiği gerçeğiyle tutarlı olduğu bildirilmiştir. Çalışmadaki verilere dayanılarak, coğrafi kümelenmenin, BLV'nin promotör dizileri içinde meydana gelebileceğini ilk kez gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2007a). Sonraki çalışmalar ile de LTR gen dizinlerinin filogenetik ağaçta coğrafik bölgelere göre, env gen bölgesi dizinleri ile oluşturulan genotipler ile uyumlu şekilde kümelendiğini bildirilmiştir (Pluta ve ark., 2020 ve Pluta ve ark., 2021).

BLV genomundaki LTR gen bölgesi; U3, R ve U5 olarak adlandırılan üç bölgeden oluşur. U3 bölgesi, Tax varlığında deksametazona duyarlılık sağlayan GRE ve ETS transkripsiyon faktör ailesi proteinleri için bağlanma bölgesi olan PU.1/Spi-B elementi gibi birkaç yanıt elementi içerir (Pluta ve ark., 2020). Zhao ve ark. (2007a), yaptığı çalışmadaki suşlarda gözlemlenen, GRE bölgesinde yer alan G148A değişiminin potansiyel olarak BLV glukokortikoid yanıtına zarar verebileceğini bildirmiştir. Moratorio ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada da, üç BLV lenfosarkom izolatının (LS1, LS2, LS3) 5' LTR genom dizileri, mevcut tam BLV genom dizileriyle karşılaştırılmış ve LS1 ile diğer hücre tiplerinden izole edilen örneklerin, GRE bağlanma bölgesinde, aynı konumunda değişiklik olduğu saptanmıştır. Tax yokluğunda GRE'nin mutasyonunun, bazal LTR aktivitesini önemli ölçüde azalttığı, bu değişimin de, konakçı immün yanıtı tarafından tanınmayı önlemek için bir strateji olarak lenfosarkom suşlarında viral transkripsiyonun daha iyi baskılanmasına yol açmış olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmadaki yerel viruslarda bahsedilen çalışmalar ile benzer olarak GRE bölgesinde G148A değişimi yedi yerel virusta; (TG-5/2012/TR, TG-9/2012/TR, TG-8430/2017/TR, KRC-52/2012/TR, KRC-55/2012/TR, KRC-S12/2013/TR, KRC-13/2015/TR) tespit edilmiştir (Şekil 3.6).

LTR U3 bölgesi ayrıca, promotör "CAT" kutusunu ve "TATA" kutularını içerir. TATA box bölgesindeki nükleotit değişikliklerinin BLV transaktivasyonu üzerine etkisini inceleyen ters genetik yaklaşım ile yapılan bir çalışmada, TATA box bölgesinde 175. nükleotitte yer alan spontan bir mutasyonun, viral transaktivasyonu değiştirerek viral üretkenliği değiştirebileceği, T175C mutasyonunun viral üretkenliği önemli ölçüde artırırken, C175T mutasyonunun ise tam tersi etkiye sahip olduğunu bildirmiştir (Murakami ve ark., 2019). Bu çalışmadaki yerel viruslarda ise T(175)C değişimi 15 yerel virusta (TG-10/2012/TR, TG-18/2012/TR, TG-8304/2017/TR, KRC-70A/2012/TR, KRC-S5/2013/TR, KRC-S11/2013/TR, KRC-S15/2013/TR, KRC-5/2014/TR, KRC-9/2014/TR, KRC-2/2015/TR, KRC-10/2015/TR, P-8/2014/TR, P-14/2014/TR, P-31/2015/TR, P-34/2015/TR) tespit edilmiştir (Şekil 3.6). T(175)C mutasyonu barındıran virusların, yüksek oranda bulaşıcı olabilecekleri ve BLV enfeksiyonunu kontrol etmede engel teşkil edeceklerinden izlenmeleri gerektiği de araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Murakami ve ark., 2019).

BLV ile enfekte sığırlarda viral yayılma düzeyi, kan hücrelerindeki proviral kopya sayısı olarak tanımlanan proviral yük (PVL) ile değerlendirilebilmektedir. PL'deki PVL, asemptomatik BLV ile enfekte sığırlardan önemli ölçüde daha yüksektir. PVL, uzun süreler boyunca stabil kalabilir veya hastalığın ilerlemesi ile artabilir (Pluta ve ark., 2021). Yapılan çalışmalar, BLV bulaşabilirliğinin PVL ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. PVL ayrıca, konak genomunda immun yanıtındaki farklılıklar ve tek nükleotit polimorfizmi gibi konak faktörleriyle ilişkilendirilmiştir (Juliarena ve ark., 2016 ve Murakami ve ark., 2019). Ancak başka bir çalışmada, G4 genindeki küçük delesyon mutasyonuna sahip bir BLV varyantının in vitro olarak daha düşük virus üretimi ile sonuçlandığı, ayrıca bu süreçte stabil PVL'ye sahip olduğu bildirilmiştir (Murakami ve ark., 2016). Bu nedenle, BLV bulaşabilirliğinin sadece bir nokta mutasyonla değil, aynı zamanda viral genomdaki sınırlı mutasyonlarla da değişeceği tahmin edilmektedir.

LTR U3 gen bölgesi, transkripsiyonun aktivasyonunda rol oynayan NF- κ B bağlanma bölgesi ile ana düzenleyici elementler döngüsel AMP-yanıt elementleri

(CRE)'ni içeren üç tekrarlı 21-bp'lik Tax-responsive elementler (TRE) içerir. Pluta ve ark. (2020)'nın yaptığı çalışmada, BLV ile doğal olarak enfekte olan sığırların periferik kan lökositlerinden elde edilen BLV gen dizinleri, referans pBLV344 suşu ile karşılaştırıldığında, çalışmadaki 15 LTR varyantından altısında artan bir promotör aktivitesi gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu varyantların, U3 bölgesinin ortasında 'NF-κB like' bölgesi ve örtüşen TRE sitesinde; A(-137)G, A(-135)G ve A(-134)G değişiklikleri; PU.1/Spi-B bölgesi ve örtüşen NF-κB bölgesinde; C(-83)T; CRE3'te C(-53)A mutasyonlarını barındırdığı tespit edilmiştir. 'NF-κB like' bölgesindeki mutasyonların bir baskılayıcı için bağlanma bölgelerini yok etmesi ve transkripsiyonu arttırmasının mümkün olabileceği ve çalışmadaki 'NFκB like' bölgelerindeki değişiklikleri içeren varyantların Tax varlığında ve yokluğunda artan promotör aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ise benzer olarak yerel viruslardan 3 tanesinde (TH-37/2012/TR, TH-39/2012/TR, P-6/2014/TR) 'NFκB like' bölgesinde A(-143)T değişimi gözlenmiştir. NFκB sahasında üç yerel virusta; (P-8/2014/TR, P-31/2015/TR, P-34/2015/TR) C(-101)A değişimi ve bir yerel virusta (P-6/2014/TR) 'NFκB like' ve örtüşen CAT Box bölgesinde A(-95)G değişimi gözlenmiştir (Şekil 3.6).

Lökosit sayısı ve PVL ile Tax, miRNA ve LTR dizi polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla yapılan başka bir çalışmada (Pluta ve ark., 2021), persiste lenfositoz (44 inek), lenfoma (bir inek) ve aleukemik form (üç inek) gelişen BLV ile enfekte sığırlardan 48 adet kan örneği toplanmıştır. Daha sonra her numune için proviral kopya sayısı belirlenerek örnekler düşük ve yüksek PL olarak iki gruba ayrılmıştır. Ancak çalışmada bulunan örneklerde ki sekans değişimi çeşitliliğine rağmen, farklı PL seviyelerine açıkça ilişki kurulacak spesifik Tax, miRNA veya LTR dizilerini tanımlayamadıklarını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, düşük ve yüksek PL sığır gruplarına karşılık gelen dizilerde LTR gen bölgesinde gözlenen farklılıklar düşük PL grubu için; G(-142)A, T(-11)C, T(-65)C, A(-4)G değişiklikleri, yüksek PL grubu için; sıklıkla A(+187)C olmak üzere G(-133)C/A, C(+160)T, C(+183)T, T(-122)A, A(+150)C, C(+185)T değişikliklerinin tespit edildiği bildirilmiştir (Pluta ve ark.,2021). Bu çalışmadaki örneklerde düşük PL grubundaki değişiklikler ile aynı bölgelerde bulunan A(-143)T, G(-64)A ve T(-11)G değişiklikleri ve yüksek PL

grubunda tespit edilenler ile aynı bölgelerde bulunan C(+160)T, T(+184)C, C(+188)T değişiklikleri ve tüm örneklerde (+187) pozisyonunda C nükleotiti gözlenmiştir (Şekil 3.6).

Bir kodonun aynı genomik segment içinde üç okuma çerçevesi yapması mümkün olan üç nükleotit pozisyonu vardır. Örtüşen okuma çerçeveleri birçok organizma türünde gözlemlenebilse de, bunlar muhtemelen nispeten küçük bir genomun en verimli kullanımını sağlamak için en yaygın olarak viruslarda bulunmaktadır. Örtüşen bir dizideki bir nükleotit değişikliği, birden fazla gene etki ederek dizideki tüm genlerin evrimini etkileyebilir. BLV, örtüşen okuma çerçeveleri ile dört düzenleyici proteini kodlayan genlerin 3' kısımlarını bulunduran bir pX bölgesi içerir. Bu bölge; Tax, Rex ve iki yardımcı protein R3 ve G4'ü içerir (Arainga ve ark., 2012). Tax proteininin, dört BLV düzenleyici proteini arasında en çok korunan protein olduğu yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır (Zhao ve ark., 2007b). BLV ile aynı cinste olan primat T hücre lösemi virusları I ve II'de de Tax'ın Rex'ten daha fazla korunduğu bildirilmiştir (Salemi ve ark., 2000). Bu, Tax'ın deltaretroviral davranış için en önemli düzenleyici protein olabileceği yönündeki görüşü doğrulamaktadır. BLV Tax hem viral hem hücrel genlerin transkripsiyonunu aktive etmekte hem de enfekte hücrelerde DNA onarım yollarının inhibisyonu yoluyla onkojenik transformasyonu mümkün kılabilir (Zhao ve ark., 2007b).

BLV Tax proteininin fonksiyonel alanları üzerine yapılan önceki çalışmalar, varsayılan bir 'Zinc finger domain' (amino asitler 30-53), bir transaktivasyon alanı 'L-rich domain' (157 ila 197 amino asitler) ve iki fosforilasyon bölgesi (amino asitler 106 ve 293) tanımlamıştır (Moratorio ve ark., 2013). BLV Tax'ın 240 ve 265 amino asitleri ('multifunctional domain') arasında en az bir amino asit ikamesine sahip TaxD247G ve TaxS240P dahil olmak üzere bir dizi mutantın BLV LTR dizisinde bir CRE motifini devreye sokarak transaktivasyon aktivitesinde önemli bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bir S(240)P değişimi, vahşi tip proteine kıyasla viral LTR-yönelimli transkripsiyonu azaltmak için gelişmiş bir yetenek sergilerken, D(247)G değişiminin in vitro viral ekspresyonu ve yayılmayı arttırdığı bildirilmiştir (Tajima ve Aida, 2000).

Bu çalışmadaki yerel suşların Tax bölgesinde ise bahsedilen değişiklikler tespit edilmemiştir.

N-terminal ‘zinc finger’ motifi, Tax yapısının ayrılmaz bir unsuru olup viral ve hücresel promotörlerin Tax transaktivasyonunda yer alır. ‘Zinc finger’ proteinlerinin çok çeşitli genlerin düzenlenmesine katıldığı ve DNA tanıma, RNA paketlenme, transkripsiyonel aktivasyon, apoptoz, kanser ilerlemesi ve diğerleri gibi çeşitli hücre süreçlerinde yer aldığı bilinmektedir. Proteinlerin bu özellikleri, Tax proteinlerinin işlevlerini hatırlatır. Tax, CREB/ATF ailesinin üyeleri de dahil olmak üzere hücresel transkripsiyon faktörlerini LTR’de bulunan üç kusurlu korunmuş 21 baz çifti tekrarına aktive ederek viral genlerin LTR’ye yönelik transkripsiyonunu aktive eder. Pluta ve ark.(2021) PVL ile Tax, miRNA ve LTR dizi polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla farklı PL seviyelerine sahip hayvanlarda yaptığı çalışmada, farklı PL seviyelerine açıkça ilişki kurulacak spesifik Tax, miRNA veya LTR dizilerini tanımlayamamışlar ancak Tax bölgesinde düşük PL grubuna ait örneklerde; F(178)Y, I(246)T, F(249)L, R(43)K, V(212)I değişimlerini, yüksek PL grubuna ait örneklerde ise E(42)K, V(142)A, A(198)T, E(51)K, I(131)V, Q(117)R değişimlerini baskın olarak da; I(214)T, T(221)S, L(233)P ve S(281)P değişimlerini bildirmişlerdir. Bahsedilen değişikliklerden ‘Zinc finger’ alanında yer alan E(42)K ve R(43)K değişimleri bu çalışmadaki yerel viruslarda da gözlenmiştir. Düşük PL grubuna ait örneklerde bildirilen R(43)K değişimi iki örnekte (KRC-S15/2013/TR2, CKR-7/2016/TR), yüksek PL grubuna ait örneklerde bildirilen E(42)K değişimi 9 örnekte (TG-5/2012/TR, TG-8/2012/TR, TG-11/2012/TR, TG-8430/2017/TR, CKR-6/2016/TR, CKR-7/2016/TR, CKR-8/2016/TR, CKR-9/2016/TR, CKR-11/2016/TR), Tax aa dizinlerinde 221. konumda S aminoasiti ise tüm örneklerde gözlenmiştir (Şekil 3.9). Bahsedilen polimorfizmlerin, BLV ile enfekte olmuş hücrelerin hücre büyümesinin farklı uyarımı yoluyla ve güçlü bir bağışıklık gözetimi varlığında viral replikasyon ve patogeneze ile ilgili viral özelliklerin değişmesine neden olabileceği bildirilmiştir.

Tax geninin 111 ve 150 pozisyonları arasındaki amino asitler bir T hücresi epitopu olarak işlev görür. Bu epitoplardaki değişikliklerin potansiyel olarak sitotoksik

T-lenfosit (CTL) kaçış mutantları ile sonuçlanabileceği; ayrıca bu durumun, virusun bağışıklık sisteminden kaçması için bir strateji olabileceği bildirilmiştir (Pluta ve ark., 2020 ve Sakakibara ve ark., 1998). Pluta ve ark. (2020), enfekte sığırlardan elde edilen periferik kan lökositlerinden ekstrakte edilen proviral DNA örneklerinde genomik varyasyonun BLV transaktivasyonu ile bağlantısını daha iyi anlamak için LTR ve Tax gen bölgeleri dizinlerini incelediği çalışmada, yüksek transaktivasyon aktivitesine sahip örneklerde T-hücresi epitop bölgesinde S(124)F/P, I(130)L, S(140)N, L(141)V ve V(124)A değişikliklerinin görüldüğünü bildirmiştir. Bu çalışmadaki yerel viruslarda, bahsedilen bölgede, 186. aminoasitte iki örnekte (P-5/2014/TR,P-6/2014/TR) I>V değişimi gözlenmiştir (Şekil 3.9).

Yapılan bir çalışmada, 233P-Tax geni taşıyan BLV enfeksiyonu ile EBL gelişimi için kuluçka süresinin 233L-Tax için olduğundan önemli ölçüde daha uzun olduğunu, EBL geliştirme riskinin, 233L-Tax geni taşıyan BLV ile enfekte olanlarda 233P-Tax ile enfektelerden daha yüksek olabileceği sonucuna varılmıştır (Inoue ve ark.,2013). Bu nedenle, 233L-Tax protein varyantını kodlayan geni taşıyan BLV ile enfekte olmuş sığırların, EBL'nin neden olduğu ekonomik kaybı en aza indirmek için tercihen elimine edilmesi gerekliliği başka araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Ochiai ve ark., 2020). Bu çalışmadaki yerel virusların elde edilen tüm *tax* gen dizinlerinin 233L-Tax protein varyantını kodladıkları tespit edilmiştir (Şekil 3.9).

Tax geni aa dizinlerinde doğal olarak meydana gelen bir E(303)K değişikliğinin ise, LTR promotörünün in vitro transkripsiyonel aktivitesinin azalmasına neden olduğu ve BLV ile indüklenen B hücreli tümörde sessiz BLV fenotipini indüklediği bildirilmiştir (Moratorio ve ark., 2013 ve Van Den Broeke ve ark., 1999). Bu çalışmadaki yerel viruslarda ise bahsedilen değişikliğe rastlanmamıştır.

BLV'ye karşı hücrel bağışıklık, BLV replikasyonunun baskılanmasına katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte, BLV ile enfekte olmuş sığırlarda viral proteinlere karşı antikorların kalıcılığı, viral gen ekspresyonunun düşük düzeyde olmasına rağmen sürekli olduğunu göstermektedir. Yapısal proteinlerin (zarf gp51 ve kapsit p24) yanı

sıra Tax, güçlü bir CD8+ sitotoksik T lenfosit (CTL) ve CD4+ yardımcı T lenfosit yanıtının hedefidir. HTLV-1 Tax CTL epitoplarındaki mutasyonlar, in vivo olarak Tax karşıtı CTL yanıtından kaçış ile ilişkilendirilmiştir ve Niewiesk ve ark. (1995), bunun hastalık patogeneze katkıda bulunabileceğini öne sürmüştür. Bu nedenlerden dolayı, bu bölgedeki mutasyonların bir şekilde konakta virus yayılmasını teşvik etmesinin mümkün olabileceği bildirilmiştir (Pluta ve ark., 2021). Bu çalışmadaki yerel viruslarda da CTL epitop bölgesinde C196R değişimi bir örnekte (TG-11/2012/TR) ve I186V değişimi iki örnekte (P-5/2014/TR, P-6/2014/TR) tespit edilmiştir (Şekil 3.9).

BLV pX gen bölgesinden kodlanan Rex proteinleri, intron içeren viral RNA'nın taşınmasını kolaylaştırmaktadır. Rex proteinleri, nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ve nükleer dışı aktarma sinyali (NES) kullanarak çekirdek ve sitoplazma arasında transportu sağlar. NES bölgesindeki bir sistein kalıntısının C(86)A alanine mutasyonunun NES fonksiyonunu parsiyel olarak bozduğu, ancak fonksiyonunu tam olarak engellemediği bildirilmiştir (Choi ve ark., 2005 ve Henderson ve ark., 2000). Bu çalışmadaki yerel virusların NES bölgesinde; S74L değişimi 7 yerel virusta (TH-29A/2012/TR, TH-34/2012/TR, TH-39/2012/TR, KRC-S12/2013/TR, KRC-13/2015/TR, CP-1/2016/TR, CP-64/2016/TR), R77C değişimi iki yerel virusta (TG-11/2012/TR, KRC-S8/2013/TR), D81N değişimi ise farklı iki yerel virusta (TG-9/2012/TR, TG-8430/2017/TR) gözlenmiştir (Şekil 3.10). NES işlevine lösin, izolösin, sistein, fenilalanin ve triptofan dahil olmak üzere uygun şekilde hidrofobik amino asitlerin de aracılık ettiği bildirilmiştir (Choi ve ark., 2005). Bu çalışmadaki yerel viruslarda bu bölgede tespit edilen değişimlerin *rex* fonksiyonu üzerindeki etkileri için ise bir kanaat oluşturulamamıştır.

BLV de kodlanan G4 proteini amino asit dizisi, 'Leader peptide' (1-24 aa), 'myb-like motif' (MYB) ve proteinin ortasında yer alan arginin açısından zengin bir bölgeyi 'arginine-rich region' (ARR) içerir (Dube ve ark., 2009). Bu çalışmada dizin bilgileri incelenen BLV G4 geni 'Leader peptide' bölgesinde KRC-52/2012/TR'de F8L değişimi, KRC-56/2012/TR'de F22S değişimi, arginin açısından zengin a-sarmalında (ARR) KRC-S15/2013/TR'de A65V değişimi tespit edilmiştir. Moratorio ve ark. (2013), farklı çiftliklerden üç sığıra ait B hücreli lenfosarkomlardan elde edilen

BLV izolatlarının tam genomunun ayrıntılı karakterizasyonunu gerçekleştirmiş ve BLV LS1 örneğinde G4 amino asit dizinlerinde A29V değişimini gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki G4 gen dizin bilgileri elde edilen örneklerden TG-8430/2017/TR'de de A29T değişimi tespit edilmiştir (Şekil 3.12). G4 proteininin N terminalinden 48-51 amino asitlerin delesyon mutasyonuna sahip bir BLV varyantının in vitro olarak daha düşük virus üretimi ile sonuçlandığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Murakami ve ark., 2016). Bu çalışmadaki yerel viruslardan TG-8/2012/TR ve TG-8090/2017/TR'de ise 49. ve 50. pozisyonlardaki kodonların nükleotitlerinde meydana gelen delesyon nedeniyle bu kodonlardan aa sentezlenmediği tespit edilmiştir (Şekil 3.12).

BLVpX bölgesi/ R3 gen bölgesinde tanımlanan herhangi bir fonksiyonel bölge tespit edilmemiştir. Çalışmadaki yerel virusların R3 gen bölgesinde beş yerel virusta (TH-29A/2012/TR, TH-34/2012/TR, TH-39/2012/TR, CP-1/2016/TR, CP-64/2016/TR) tespit edilen R31S değişiminin R3 geninde herhangi bir etki meydana getirdiğine dair bilgi bulunmamaktadır (Şekil 3.11). Önceki çalışmalar, R3/G4'teki delesyonların BLV yayılımının etkinliğine müdahale ettiğini ve patogenezi sınırladığını gösterse de, Florins ve ark. (2007), bir R3/G4 mutanti ile enfekte olmuş 20 koyundan birinin 7 yıllık latent dönemden sonra lenfoma geliştirdiğini göstermiştir, bu da silinen dizilerin patogeneze için kesin olarak gerekli olmayabileceğini düşündürmektedir. BLV enfeksiyonu için bir model olarak ineği kullanan çalışmalarda bu bulguların biyolojik önemini ele almak için çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Tax, rex, R3, G4 gen bölgelerindeki aa değişimleri incelenen diğer bazı çalışmalarda ise, pX bölgesinde bulunan benzerlikler nedeniyle, hastalığın klinik evreleri (AL, PL ve tümör oluşumu) ile ilgili ilişki kurulamadığı bildirilmiştir (Montero ve ark., 2021 ve Panei ve ark., 2013). Yapılan çalışmalar ile Tax gen bölgesinde yapılan ve hastalığın farklı klinik evrelerinde ya da farklı proviral yüke sahip hayvanlarda bildirilen birçok değişimin BLV patogenezinde çeşitli etkilere sahip olabileceği, araştırmacılar tarafından bildirilmiş ya da yorumlanmış olsa da net bir kanıya varılamamıştır.

BLV genom karakterizasyonuna yönelik çalışmalar, BLV genotiplerinin saptanması ve moleküler epidemiyolojik durumun ortaya konulması, virusun evrimsel süreci ve enfeksiyonun patogeneziyle ilgili verilerin elde edilmesi, BLV enfeksiyonunun önlenmesi için aşı geliştirilmesi çalışmaları yanı sıra, insanlarda enfeksiyon yapan bazı retroviruslarla ilgili çalışmalarda da BLV'nin örnek oluşturmaları nedeniyle önem taşımaktadır. BLV genomunun bazı bölgelerinde meydana gelen değişiklikler ve enfeksiyonun klinik evreleri ile ilgili olarak literatürde bazı değişimlere vurgu yapılıyor ise de bu konuda bir netlik bulunmamaktadır. Ancak, LTR gen bölgesi- GRE'nin mutasyonu, araştırmacılar tarafından bildirildiği gibi bazal LTR aktivitesini önemli ölçüde azaltır ve bu bölgedeki değişimler, konakçı immün yanıtı tarafından tanınmayı önleme stratejisi olarak lenfosarkom suşlarında viral transkripsiyonun daha iyi baskılanmasına izin verebilme olasılığını yükseltir. Viral ekspresyonun baskılanmasının, dönüşmüş bir B hücre klonunun kontrolsüz büyümesine ve hastalığın başlamasına, ayrıca konakçı immün yanıtı tarafından tanınmadan kaçmasına yol açan çok adımlı bir süreç olduğu ve tümör ilerlemesi ve BLV ile enfekte olmuş tümör hücrelerinin proliferasyonu için kritik olduğu düşünülmektedir (Merimi ve ark., 2007 ve Moratorio ve ark., 2013).

BLV genom karakterizasyon çalışmalarının biyolojinin birçok alanı için önemi gözönünde tutularak, yapılan bu çalışma ile Türkiye'nin farklı bölgelerinde yerleşik işletmelerde bulunan süt sığırlarını enfekte eden BLV'nin env gen bölgesi, LTR gen bölgesi, pX gen bölgesi (Tax, Rex, R3 ve G4) moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan retrospektif örnekler, 6 farklı işletmede bulunan hayvanlara ait kan örnekleridir ve çalışmadaki yerel virusların tespit edildiği sığırlardaki enfeksiyonun klinik evreleri (PL, AL veya lenfosarkom oluşumu) ya da hematolojik bulguları ile ilgili veriler bulunmamaktadır. Bununla birlikte çalışılan yerel viruslarda meydana gelen mutasyonlar literatür verileri (Moratorio ve ark., 2013; Murakami ve ark., 2016; Murakami ve ark., 2019; Pluta ve ark., 2020 ve Pluta ve ark., 2021) eşliğinde incelendiğinde; LTR aktivitesini önemli ölçüde azaltabileceği ve lenfosarkom suşlarında (LS1, LS2, LS3) yer aldığı bildirilen G148A değişimi (yedi örnek) ile düşük transkripsiyon aktivitesi ile ilişkilendirilen G4 gen bölgesi 49-50 amino asitlerindeki delesyonu içeren virusların (iki örnek) saptandığı hayvanların,

yüksek transkripsiyon ile ilişkilendirilen LTR T175C mutasyonu (yedi örnek), LTR ‘Nfkb like’ bölgesi (dört örnek) ve Tax CTL bölgesindeki (üç örnek) mutasyonları içeren virusların saptandığı hayvanların farklı olması dikkat çekici bulunmuş (Çizelge 3.10), ancak bu değişimlerin, araştırmacılar tarafından da bildirildiği üzere, BLV’nin patogenezi ile hastalığın klinik evrelerinin tespiti konusundaki farklılığı kesin olarak ortaya koyan değişimler olarak değerlendirilebilmesi için çalışmaların sürdürülmesine ihtiyaç duyulduğu kanaatine varılmıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

BLV azalan üreme verimliliğine, süt üretimine, kilo kaybına, yaşam süresine ve karkas değerine, artan teşhis ve veteriner bakımına atfedilen büyük ekonomik kayıplardan sorumludur. Çoğunlukla süt çiftliklerindeki yönetim uygulamaları nedeniyle BLV, süt sığırlarında besi hayvanlarına göre daha yaygın olarak tespit edilir ancak her iki sektör üzerinde de olumsuz ekonomik etkileri vardır (Phiri ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında, çeşitli primer çiftleri kullanılarak ELISA ile BLV pozitif tespit edilen retrospektif örneklerde *env*, LTR ve pX gen bölgesi (Tax, Rex, R3 ve G4) dizinlerinin elde edilmesi; gerek ülkesel ve gerekse uluslararası bilgi birikimine katkı sağlanması ve çalışılan gen bölgesi ya da bölgelerindeki mutasyonlara bağlı olarak enfeksiyonun epidemiyolojisinde ve patogenetik mekanizmalar konusunda yaklaşımda bulunulması ve temel bilgi kazanımına katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Çalışmada elde edilen veriler ile;

1. BLV *env* gen hedef alan PCR yöntemi ile test edilen 179 tanı materyalinden 126 adedi pozitif tespit edilerek 57 örneğin dizin bilgileri hizmet alımı yolu ile sağlanmıştır.
2. Çalışmada elde edilen 57 örneğe ait kısmi *env* gen aa dizinlerinin K02120 referans suşu ile benzerlik oranları; %98,59– 100, kendi aralarındaki benzerlik oranları; %97,18– 100, filogenetik ağaçta kullanılan ve G1’de yer alan Türkiye ve diğer ülkelere ait dizinler ile de %91,48 – 100 olarak tespit edilmiştir.
3. Elde edilen dizinlerin filogenetik analizine dayanarak, BLV’lerin G1’de sınıflandığı gözlenmiştir. Bu çalışma, Türkiye’nin çeşitli coğrafi bölgelerinde bulunan sürülerdeki BLV’lerin genotiplerini ve moleküler karakterizasyonunu sunmakta, Türkiye’deki BLV hakkındaki bilgilerimizi güncellemekte ve ayrıca gelecekteki epidemiyolojik çalışmalara katkıda bulunmaktadır. Ancak, Türkiye’ye belirli aralıklarla Avrupa, ABD ve Güney Amerika gibi farklı genotipleri barındıran ülkelere canlı hayvan ithal edilmesi nedeniyle genotip tespiti ile ilgili çalışmaların sürdürülmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

4. Çalışma ile Türkiye'deki BLV'lerin LTR ve pX gen bölgeleri (Tax, Rex, R3 ve G4) moleküler karakterizasyonları ilk defa gerçekleştirilmiştir.
5. Çalışmada elde edilen 48 örneğe ait kısmi LTR gen bölgesi dizinlerinin benzerlik oranları; K02120 referans suşu ile %98,84 – 99,62, kendi aralarında %98,98 - 100, filogenetik ağaçta kullanılan ve G1'de yer alan diğer ülkelere ait dizinler ile de %98,69 - 100 olarak tespit edilmiştir.
6. Çalışmada elde edilen 33 örneğe ait tax gen aa dizinlerinin benzerlik oranları K02120 referans suşu ile %98,7-99,67, kendi aralarında %98,05 – 100 filogenetik ağaçta kullanılan ve G1'de yer alan diğer ülkelere ait dizinler ile de %97,4 - 100 olarak tespit edilmiştir.
7. Çalışmada elde edilen 33 örneğe ait *tax*, *rex*, R3 ve G4 gen dizinleri incelendiğinde araştırmacılar tarafından transaktivasyon ve patogenezi ile ilgili olduğu bildirilen mutasyonlardan bir kısmı tespit edilmiş olsa da bu mutasyonlar ile transaktivasyon ve proviral yük arasındaki ilişki vb. tespitler için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.
8. Bu çalışmadaki yerel virusların tespit edildiği sığırlardaki enfeksiyonun klinik evreleri (PL ve AL veya lenfosarkom oluşumu) ile ilgili bir bilgi sahibi olunamadığından, saptanan mutasyonlar ile ilgili çıkarımlarda bulunulmuştur. Ancak, LTR aktivitesini önemli ölçüde azaltabileceği ve lenfosarkom suşlarında yer aldığı bildirilen G148A değişimi (yedi örnek) ile düşük transkripsiyon aktivitesi ile ilişkilendirilen G4 gen bölgesi 49-50 amino asitlerindeki delesyonu içeren virusların (iki örnek) saptandığı hayvanların, yüksek transkripsiyon ile ilişkilendirilen LTR T175C mutasyonu (yedi örnek), LTR 'Nfkb like' bölgesi (dört örnek) ve Tax CTL bölgesindeki (üç örnek) mutasyonları içeren virusların saptandığı hayvanların farklı olması dikkat çekici bulunmuştur (Çizelge 3.10); bununla birlikte, araştırmacılar tarafından da bildirildiği üzere, bu değişimlerin BLV'nin patogenezi ile hastalığın klinik evrelerinin tespiti konusundaki farklılığı kesin olarak ortaya koyan değişimler olarak değerlendirilebilmesi için çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.
9. Retrovirusların biyolojisinin karmaşıklığı, BLV nedenli ekonomik kayıpların boyutu ve zoonotik potansiyeli dikkate alınarak, BLV enfeksiyonunun

moleküler epidemiyolojisi ve patogeneiz mekanizmasının farklı örneklerde ve farklı yöntemler ile araştırılmasına ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.



ÖZET

Bovine Leukemia Virusun Env, LTR ve pX Gen Bölgelerinin Moleküler Analizi

Bu çalışmada, ülkemizdeki sığırlarda tespit edilen Bovine Leukemia Virus'un (BLV), *env*, LTR ve pX gen bölgesi dizinlerinin elde edilerek, var olan genotiplerin saptanmasının yanısıra, çalışmadaki virus dizinlerinin diğer BLV suşlarının dizinleri ile karşılaştırılması sonucunda tespit edilen mutasyonların, farklı enfeksiyon tablolarının oluşumu ve olası patogenetik mekanizmalar üzerine etkisiyle ilgili değerlendirmeler yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Türkiye'nin çeşitli illerindeki sığır işletmelerinden temin edilen ve önceki çalışmalarda ELISA ile BLV'ye karşı antikor varlığı saptanan hayvanlara ait 179 retrospektif kan örneği moleküler analizler için kullanılmıştır. Örnekler, sahada sirküle olan genotip(ler)i ve olası mutasyonları tespit etmek amacıyla PCR ile *env* gen bölgesi yönünden test edilmiştir. BLV *env* gen bölgesi pozitif tespit edilen 126 adet örneğin 57'sinin kısmi *env* gen dizinleri elde edilerek yapılan filogenetik analizler sonucunda, çalışmadaki tüm yerel virusların genotip 1 (G1)'de yer aldıkları tespit edilmiştir. LTR ve pX gen bölgesi yönünden test edilen ve pozitif bulunan örneklerden ise 48 örneğin LTR gen bölgesi, 33 örneğin pX gen bölgesi dizinleri elde edilmiştir. Elde edilen nükleik asit ve amino asit dizinleri incelenerek yerel viruslarda saptanan, transaktivasyon ve patogeneze ile ilgili olduğu bildirilen mutasyonlara yönelik değerlendirmeler yapılmıştır. Araştırmacılar tarafından bildirilen bu değişimlerin bir kısmının bu çalışmadaki yerel viruslarda da var olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile Türkiye'deki BLV'lerin LTR ve pX gen bölgesinin moleküler analizi ilk defa bildirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Bovine Leukemia Virus, Env Gen, LTR Gen, Moleküler Karakterizasyon, pX Gen.

SUMMARY

Molecular Analysis of Env, LTR and pX Gene Regions of Bovine Leukemia Virus

In this study, besides from determining genotypes by obtaining sequence data from the *env*, LTR, and pX gene regions of Bovine Leukemia Virus (BLV), the aim of this study was to detect mutations by comparing sequence data from other BLVs and to evaluate their effects on the formation of different infection patterns and possible pathogenetic mechanisms. For this purpose, total of 179 retrospective blood samples from cattle which were obtained from livestock farms in various provinces of Turkey and whose antibodies against BLV had previously been detected by ELISA in earlier studies were used. These samples were tested for the *env* gene region by PCR to detect the genotype(s) circulating in the field and possible mutations. Out of 126 *env* positive samples, 57, were sequenced and their phylogenetic analysis revealed that all local viruses were clustered in genotype 1 (G1). Subsequently, LTR gene region of 48 samples and pX gene region of 33 samples were sequenced from the positive samples. By examining the nucleic acid and amino acid sequences, evaluations were made for the mutations detected in local viruses, which were reported to be related to transactivation and pathogenesis. It was determined that some of these changes reported by the researchers were also present in the local viruses in this study. This study reports the molecular analysis of the LTR and pX gene region of BLVs in Turkey for the first time.

Keywords: Bovine Leukemia Virus, Env Gene, LTR Gene, Molecular Characterization, pX Gene.

KAYNAKLAR

- ACAR A, GÜR S (2013). A Serological investigation of Enzootic Bovine Leukosis Virus (EBLV) infection in Cattle in Afyonkarahisar Province. *Kocatepe Veterinary Journal*, **6(1)**: 33–40.
- ADAM E, KERKHOF S, MAMMERICKX M, KETTMANN R, BURNY A, DROOGMANS L, WILLEMS L (1994). Involvement of the cyclic AMP-responsive element binding protein in bovine leukemia virus expression in vivo. *Journal of Virology*, **68(9)**: 5845–5853.
- AIDA Y, MURAKAMI H, TAKAHASHI M, TAKESHIMA SN (2013). Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Frontiers in Microbiology*, **4**: 1–11.
- AKÇA Y, BURGU İ, GÜR S, BİLGE DAĞALP S (2004). A study on investigation of occurrence of some virus infection in Buffaloes in Turkey. *Revue de Medecine Veterinaire*, **155(5)**: 268–271.
- AKÇA Y, ALKAN F, BİLGE DAĞALP S, KARAOĞLU T, ÖZKUL A, BURGU İ, KAADEN OR (1996). The investigation of bovine leukosis virus (BLV) specific antibodies in milk and serum samples from dairy cattle using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Agar Jel Immunodiffusion (AGID) test. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.*, **43**: 53-59.
- ALKAN F, KARAYEL-HACIOĞLU İ, DURAN YELKEN S, COŞKUN N (2021). The genotype determination and molecular characterization of bovine leukemia virus in turkey. *Veterinarski Arhiv*, **91(3)**: 237–247.
- ALKAN F, OĞUZÖĞLU TÇ, TİMURKAN MÖ, KARAPINAR Z (2011). Characterisation of env and gag gene fragments of bovine leukemia viruses (BLVs) from cattle in Turkey. *Archives of Virology*, **156(10)**: 1891–1896.
- ARAINA 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**:121.
- ASHRAFI F, NASSIRI M, JAVADMANESH A, RAHIMI H, REZAEI SA (2020). Epigenetics evaluation of the oncogenic mechanisms of two closely related bovine and human deltaretroviruses: A system biology study. *Microbial Pathogenesis*, **139**: 103845.
- BARTLETT PC, SORDILLO LM, BYREM TM, NORBY B, GROOMS DL, SWENSON CL, ZALUCHA J, ERSKINE EJ (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*, **244**: 914–922.
- BARTLETT PC, RUGGIERO VJ, HUTCHINSON HC, DROSCH CJ, NORBY B, SPORER KRB, TAXIS TM (2020). Current developments in the epidemiology and control of enzootic bovine leukosis as caused by bovine leukemia virus. *Pathogens*, **9(12)**:1058.
- BATMAZ H, ÇARLI KT, ŞEN A, KENNERMAN E, MİNBAY A, YILMAZ Z, CANER V, BAKLACI C (1999). Güney Marmara Bölgesi'nde Enzootik Bovine Leukosis'in Prevalansı ve Bazı Bakım-Yetiştirme Koşullarının İncelenmesi *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, **23(2)**: 261-268.
- BİLGE-DAĞALP S, CAN-SAHNA K, YILDIRIM Y, KARAOĞLU T, ALKAN F, BURGU İ (2008). Effects of bovine leukosis virus (BLV) infection on the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and

- bovine herpes virus 1 (BHV1) seroprevalences in dairy herds in Turkey. *Revue de Medecine Veterinaire*, **159(7)**: 385–390.
- BRONSON EC, ANDERSON JN (1994). Nucleotide composition as a driving force in the evolution of retroviruses. *Journal of Molecular Evolution*, **38(5)**: 506–532.
- BRUCK C, MATHOT S, PORTETELLE D, BERGE C, FRANSSEN JD, HERION P, BURNY A (1982). Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51. *Virology*, **122**: 342–352.
- BUEHRING GC, PHILPOTT SM, CHOI KY (2003). Humans have antibodies reactive with bovine leukemia virus. *Aids Res. Hum. Retrovir*, **19**: 1105–1113.
- BUEHRING GC, SANS HM (2020). Breast cancer gone viral? Review of possible role of bovine leukemia virus in breast cancer, and related opportunities for cancer prevention. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **17(1)**: 209.
- BUEHRING GC, SHEN HM, SCHWARTZ DA, LAWSON JS (2017). Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. *PLoS One*, **12(6)**: 1–12.
- BUEHRING GC, SHEN HM, JENSEN HM, JIN DL, HUDES M, BLOCK G (2015). Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. *PLoS One*, **10(9)**: 1–13.
- BULUT H, GÜLAÇTI İ, SÖZDUTMAZ İ (2009). Doğal Enfekte Bir Sürüde ELISA ve Nested-PCR ile Sığırların Lösemi Virüs Enfeksiyonunun Belirlenmesi. *F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg*, **23(1)**: 39–42.
- BURGU İ, ALKAN F, KARAOĞLU T, BİLGE-DAĞALP S, CAN-SAHNA K, GÜNGÖR B, DEMİR B (2005). Control and eradication programme of enzootic bovine leucosis (EBL) from selected dairy herds in Turkey. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr*, **112(7)**: 271–274.
- BURGU İ, AKÇA Y, ALKAN F, KERİM URMAN H, ALÇIĞIR G, RÜGER KAADEN O, BERKİN Ş, ATASEVER A (1990). Türkiye’de Enzootik Sığır Lökozu’nun Seroepidemiolojisi Ve Patolojisi *A.Ü. Vet. Fak. Derg*, **37(1)**: 32–45.
- BUXTON BA, HINKLE NC, SCHULTZ RD (1985). Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by stable flies, horn flies, and tabanids. *Am. J. Vet. Res*, **46**: 123–126.
- CAMARGOS MF, PEREDA A, STANCEK D, ROCHA MA, DOSREIS JK, GREISER-WILKE I, LEITE RC (2007). Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of bovine leukemia virus. *Virus Genes*, **34**: 343–350.
- CERIANI MC, LENDEZ PA, CUESTA LM, FARIAS MVN, BUEHRING GC, DOLCINI GL (2018). Bovine leukemia virus presence in breast tissue of Argentinian women. Its association with cell proliferation and prognosis markers. *Multidisciplinary Cancer Investigation*, **2(4)**: 16–24.
- CERÓN TÉLLEZ F, GONZÁLEZ MÉNDEZ AS, TÓRTORA PÉREZ J L, LOZA-RUBIO E, RAMÍREZ ÁLVAREZ H (2020). Lack of association between amino acid sequences of the bovine leukemia virus envelope and varying stages of infection in dairy cattle. *Virus Research*, **278**: 197866.
- CHOI EA, HOPE TJ (2005). Mutational Analysis of Bovine Leukemia Virus Rex: Identification of a Dominant-Negative Inhibitor. *Journal of Virology*, **79(11)**: 7172–7181.

- COPELAND TD, OROSZLAN S, KALYANARAMAN VS, SARNGADHARAN MG, GALLO RC (1983). Complete amino acid sequence of human T-cell leukemia virus structural protein p15. *FEBS Letters*, **162(2)**: 390–395.
- DAO TD, BUI VN, OMATSU T, KATAYAMA Y, MIZUTANI T, OGAWA H, IMAI K (2018). Application of the SureSelect target enrichment system for next-generation sequencing to obtain the complete genome sequence of bovine leukemia virus. *Archives of Virology*, **163(11)**: 3155–3159.
- DE BROGNIEZ A, BOUZAR AB, JACQUES JR, COSSE JP, GILLET N, CALLEBAUT I, REICHERT M, WILLEMS L (2015). Mutation of a single envelope N-Linked glycosylation site enhances the pathogenicity of bovine leukemia virus. *J Virol*, **89(17)**: 8945–8956.
- DEĞİRMENCİ H (2011). Enzootic Bovine Leukosis Virus İnfeksiyonunun Marmara Bölgesinde Serolojik Ve Moleküler Yöntemler İle Araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- DOĞAN F, BİLGE DAĞALP S, DİK B, FARZANİ TA, ALKAN F (2020). Detection of genotype 1 bovine leukemia virus from a C.schultzei pool: Do Culicoides spp. have a role on the transmission of bovine leukemia virus? *Infection, Genetics and Evolution*, **85**: 104469.
- DUBE S, ABBOTT L, DUBE DK, DOLCINI G, GUTIERREZ S, CERIANI C, POIESZ BJ (2009). The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain. *Virology Journal*, **6**: 1–11.
- DUBE S, DOLCINI G, ABBOTT L, MEHTA S, DUBE D, GUTIERREZ S, POIESZ BJ (2000). The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. *Virology*, **277(2)**: 379–386.
- DURKIN K, ROSEWICK N, ARTES M, HAHAU V, GRIEBEL P, ARSIC N, VAN DEN BROEKE A (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)**: 1–16.
- FECHNER, H, KURG A, GEUE L, BLANKENSTEIN P, MEWES G, EBNER D, BEIER D (1996). Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl. Veterinarmed B*, **43**: 621–630.
- FECHNER H, BLANKENSTEIN P, LOOMAN AC, ELWERT J, GEUE L, ALBRECHT C, KURG A, BEIER D, MARQUARDT O, EBNER D (1997). Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*, **237**: 261–269.
- FELMER R, MUÑOZ G, ZÚÑIGA J, RECABA M (2005). Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. *Veterinary Microbiology*, **108(1–2)**: 39–47.
- FLORINS A, GILLET N, BOXUS M, KERKHOFS P, KETTMANN R, WILLEMS L (2007). Even Attenuated Bovine Leukemia Virus Proviruses Can Be Pathogenic in Sheep. *Journal of Virology*, **81(18)**: 10195–10200.
- FOIL LD, SEGER CL, FRENCH DD, ISSEL CJ, MCMANUS JM, OHRBERG CL, RAMSEY RT (1988). Mechanical transmission of bovine leukemia virus by horse flies (Diptera: Tabanidae). *J. Med. Entomol*, **25**: 374–376.
- GAO A, KOUZNETSOVA VL, TSIGELNY I F (2020). Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, **149**:104417.

- GATEI MHNAIF HM, KUMAR S, BOYLE DB, DANIEL RCW, GOOD MF, LAVIN MF (1993). Infection by vaccination with recombinant vaccinia virus expressing bovine leukemia virus envelope glycoproteins: correlation of protection with CD4 T-cell response to gp51 peptide 51–70. *J. Virol*, **67**: 1803–1810.
- GATOT JS, CALLEBAUT I, VAN LINT C, DEMONTÉ D, KERKHOF P, PORTETELLE D, KETTMANN R (2002). Bovine Leukemia Virus SU Protein Interacts with Zinc, and Mutations within Two Interacting Regions Differently Affect Viral Fusion and Infectivity In Vivo. *Journal of Virology*, **76**(16): 7956–7967.
- GILDEN RV, LONG CW, HANSON M, TONI R, CHARMAN H P, OROSZLAN S, MILLER JM, VAN DER MAATEN MJ (1975). Characteristics of the major internal protein and RNA dependent DNA polymerase of bovine leukemia virus. *J. gen. Virol*, **29**: 305 - 314.
- GILLET NA, WILLEMS L (2016). Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. *Retrovirology*, **13**:75.
- GILLET NA, HAMAIDIA M, DE BROGNIEZ A, GUTIÉRREZ G, RENOTTE N, REICHERT M, WILLEMS L (2016). Bovine Leukemia Virus Small Noncoding RNAs Are Functional Elements That Regulate Replication and Contribute to Oncogenesis In Vivo. *PLoS Pathog*, **12**(4):e1005588.
- GILLET N, FLORINS A, BOXUS M, BURTEAU C, NIGRO A, VANDERMEERS F, WILLEMS L (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, **16**(4): 18.
- GOFF SP (2013). Fields Virology. 6th Ed. KNIPE DM, HOWLEY PM. Lippincot Williams & Wilkins. Chapter 47, *Retroviridae*. P.: 1424-1473.
- GREGORY L, CARRILLO GAETA N, ARAÚJO J, MATSUMIYA THOMAZELLI L, HARAKAWA R, IKUNO AA, PITUCO EM (2017). Bovine leukaemia virus genotypes 5 and 6 are circulating in cattle from the state of São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, **66**(12): 1790–1797.
- GUTIÉRREZ G, RODRÍGUEZ SM, VILOR A, GILLET N, DEBROGNIEZ A, TRONO K, WILLEMS L (2015). An efficient vaccine against bovine leukemia virus. *Retrovirology*, **12**: P3.
- HAKIOGLU F (1962). The first report on hematological research in terms of leukocyte in Karacabey stud cattle. *Türk Vet. Dern. Derg*, **186**: 167-175.
- HENDERSON BR, ELEFThERIOU A (2000). A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export sig- nals. *Exp. Cell Res*, **256**: 213–224.
- HIRSCH C, CAMARGOS MF, BARBOSA-STANCIOLI EF, FONSECA JÚNIOR AA, RAJÃO DS, HEINEMANN MB, LEITE RC (2015). Genetic variability and phylogeny of the 5' long terminal repeat from Brazilian bovine leukemia virus. *Genetics and Molecular Research*, **14**(4): 14530-14538.
- ICTV (2020). International Committee on Taxonomy of Viruses. Erişim Adresi: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/]. Erişim Tarihi: 10/10/2021.
- INOUE E, MATSUMURA K, SOMA N, HIRASAWA S, WAKIMOTO M, ARAKAKI Y, OKAZAKI K (2013). L233P mutation of the Tax protein strongly correlated with leukemogenicity of bovine leukemia virus. *Veterinary Microbiology*, **167**(3–4): 364–371.
- JEWELL NA, MANSKY LM (2005). Packaging of heterologous RNAs by a minimal bovine leukemia virus RNA packaging signal into virus particles. *Archives of Virology*, **150**(6): 1161–1173.

- JIMBA M, TAKESHIMA N, MATOBA K, ENDOH D, AIDA Y (2010). BLV-CoCoMo-qPCR: quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. *Retrovirology*, **7**: 91.
- JULIARENA MA, BARRIOS CN, CERIANI MC, ESTEBAN EN (2016). Hot topic: bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J. Dairy. Sci*, **99** (6): 4586–4589.
- JULIARENA MA, LENDEZ PA, GUTIERREZ SE, FORLETTI A, RENSETTI DE, CERIANI MC (2013). Partial molecular characterization of different proviral strains of bovine leukemia virus. *Archives of Virology*, **158**(1): 63-70.
- JULIARENA MA, BARRIOS CN, LUTZELSCHWAB CM, ESTEBAN EN, GUTIÉRREZ SE (2017). Bovine leukemia virus: Current perspectives. *Virus Adaptation and Treatment*, **9**:13-26.
- KABEYA H, OHASHI K, ONUMA M (2001). Host Immune Responses in the Course of Bovine Leukemia Virus Infection. *Journal of Veterinary Medical Science*, **63**(7): 703–708.
- KABEYA H, OHASHI K, OHISHI K, SUGIMOTO C, AMANUMA H, ONUMA M (1996). An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukaemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep. *Vaccine*, **14**(12):1118-1122.
- KABIRI M, SANKIAN M, HOSSEINPOUR M, TAFAGHODI M (2018). The novel immunogenic chimeric peptide vaccine to elicit potent cellular and mucosal immune responses against HTLV-1. *Int J Pharm*, **549**(1-2): 404-414.
- KALE M, KALE (AKCAN) SA (2005). Sığır Löykozis Enfeksiyonunun Kontrolü, Eradikasyonu ve Ekonomik Açıdan Önemi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg*, **11**(2): 195-200.
- KANNAGI M, HASEGAWA A, NAGANO Y, IINO T, OKAMURA J, SUEHIRO Y (2019). Maintenance of long remission in adult T-cell leukemia by Tax-targeted vaccine: a hope for disease-preventive therapy. *Cancer Sci*, **110**(3): 849-857.
- KANNAGI M, SHIDA H, IGARASHI H, KURUMA K, MURAI H, AONO Y, HARADA S (1992). Target Epitope in the Tax Protein of Human T-Cell Leukemia Virus Type I Recognized by Class I Major Histocompatibility Complex-Restricted Cytotoxic T Cells. *Journal Of Virology*, **66**(5): 2928-2933.
- KATOH I, LKAWA Y, YOSHINAKA Y (1989). Retroviruses protease characterized as a dimeric aspartic proteinase. *J Virol*, **63**: 2226-2232.
- KATOH I, YASUNAGA T, YOSHINAKA Y (1993). Bovine leukemia virus RNA sequences involved in dimerization and specific gag protein binding: close relation to the packaging sites of avian, murine, and human retroviruses. *Journal of Virology*, **67**(4): 1830–1839.
- KERKHOF S, HEREMANS H, BURNY A, KETTMANN R, WILLEMS L (1998). In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J Virol*, **72**(3): 2554-2559.
- KETTMANN R, PORTETELLE D, MAMMERICKX M (1976) Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. *Proc Natl Acad Sci*, **73**: 1014-1018.
- KINCAID RP, BURKE JM, SULLIVAN CS (2012). RNA virus microRNA that mimics a b-cell oncomiR. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **109**(8): 3077–3082.
- KOBAYASHI S, TSUTSUI T, YAMAMOTO T, HAYAMA Y, KAMEYAMA KI, KONISHI M, MURAKAMI K (2010). Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *BMC Veterinary Research*, **6**: 1–6.

- KONISHI M, ISHIZAKI H, KAMEYAMA KI, MURAKAMI K, YAMAMOTO T (2018). The effectiveness of colostral antibodies for preventing bovine leukemia virus (BLV) infection in vitro. *BMC Veterinary Research*, **14**(1): 1–9.
- KUCZEWSKI AET (2019). The development of a bovine leukemia virus control program. (Unpublished doctora thesis). University of Calgary, Calgary, AB.
- KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K (2018): MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, **35**(6): 1547-1549.
- KURG A, SOMMER G, METSPALU A (1995). An RNA Stem-Loop Structure Involved in the Packaging of Bovine Leukemia Virus Genomic RNA in Vivo. *Virology*, **211**(2): 434-442.
- LADRONKA RM, AINSWORTH S, WILKINS MJ, NORBY B, BYREM TM, BARTLETT PC (2018). Prevalence of Bovine Leukemia Virus Antibodies in US Dairy Cattle. *Vet Med Int*, **4**: 1-8.
- LARSSON A (2014). AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, **30**: 3276-3278.
- LASSAUZET ML, JOHNSON WO, THURMOND MC, STEVENS F (1989). Protection of colostral antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **53**(4): 424–430.
- LEE E, KIM EJ, RATTHANOPHART J, VITOONPONG R, KIM BH, CHO IS, SHIN YK (2016). Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. *Infection, Genetics and Evolution*, **41**: 245-254.
- LEISERING A (1871). Hypertrophy der Malpighischen Körperchen der Milz. *Bericht über das Veterinarwesen im Königreich Sachsen*, **16**: 15–16.
- LICURSI M, INOSHIMA Y, WU D, YOKOYAMA T, GONZALEZ ET, SENTSUI H (2003). Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Vet. Microbiol*, **96**: 17–23.
- MACLACHLAN NJ, DUBOVI EJ (2011). Fenner's Veterinary Virology. FENNER F. 5th Ed. Elsevier. P.: 243-274.
- MAMMERICKX M, PALM R, PORTETELLE D, BURNY A (1988). Experimental transmission of leukosis in sheep: latency period of the tumoral disease. *Leukemia*, **2**: 103-107.
- MAMOUN RZ, ASTIER-GIN T, KETTMANN R, DESCHAMPS J, REBEYROTTE N, GUILLEMAIN B J (1985). The pX region of the bovine leukemia virus is transcribed as a 2.1-kilobase mRNA. *Journal of Virology*, **54**(2): 625–629.
- JULIARENA MA, GUTIERREZ SE, CERIANI C (2007). Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *Am J Vet Res*, **68**(11): 1220-1225.
- MCGIRR KM, BUEHRING GC (2005). Tax and rex sequences of bovine leukaemia virus from globally diverse isolates: Rex amino acid sequence more variable than tax. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, **52**(1): 8–16.
- MCGIRR KM, BUEHURING GC (2006). Tax & rex: Overlapping genes of the deltaretrovirus group. *Virus Genes*, **32**(3): 229–239.

- MERIMI M, KLENER P, SZYNAL M, CLEUTER Y, BAGNIS C, KERKHOFS P, VAN DEN BROEKE, A (2007). Complete suppression of viral gene expression is associated with the onset and progression of lymphoid malignancy: observations in Bovine Leukemia Virus-infected sheep. *Retrovirology*, **4**(1): 1–9.
- MILLER J, MILLER L, OLSON C, GILLETTE K (1969). Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst*, **43**: 1297–1305.
- MILLER JM, VAN DER MAATEN MJ (1976). Serologic detection of bovine leukemia virus infection. *Veterinary Microbiology*, **1**: 195–202.
- MOLTENI E, AGRESTI A, MENEVERI R, MAROZZI A, MALCOVATI M, BONIZZI L, POLI G, GINELLI E (1996). Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukaemia virus (BLV). *Zentralbl Veterinarmed B*, **43**(4): 201–211.
- MONTERO MACHUCA N, TÓRTORA PÉREZ JL, GONZÁLEZ MÉNDEZ AS, GARCÍA-CAMACHO AL, MARÍN FLAMAND E, RAMÍREZ ÁLVAREZ H (2021). Genetic analysis of the pX region of bovine leukemia virus genotype 1 in Holstein Friesian cattle with different stages of infection. *Archives of Virology*, 1–12.
- MONTI G, SCHRIJVER R, BEIER D (2005). Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. *Archives of Virology*, **150**(3): 443–458.
- MORATORIO G, OBAL G, DUBRA A, CORREA A, BIANCHI S, BUSCHIAZZO A, CRISTINA J, PRITSCH O (2010). Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Arch. Virol*, **155**: 481–489.
- MORATORIO G, FISCHER S, BIANCHI S, TOMÉ L, RAMA G, OBAL G, CRISTINA J (2013). A detailed molecular analysis of complete Bovine Leukemia Virus genomes isolated from B-cell lymphosarcomas. *Veterinary Research*, **44**(1): 1–11.
- MOUSAVI S, HAGHPARAST A, MOHAMMADI G, TABATABAEIZADEH SE (2014). Prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in the northeast of Iran. *Veterinary Research Forum*, **5**(2): 135–139.
- MURAKAMI H, TODAKA H, UCHIYAMA J, SATO R, SOGAWA K, SAKAGUCHI M, TSUKAMOTO, K (2019). A point mutation to the long terminal repeat of bovine leukemia virus related to viral productivity and transmissibility. *Virology*, **537**: 45–52.
- 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.
- NAGY DW, TYLER JW, KLEIBOEKER SB (2007). Timing of seroconversion and acquisition of positive polymerase chain reaction assay results in calves experimentally infected with bovine leukemia virus. *American Journal of Veterinary Research*, **68**(1): 72–75.
- NIERMANN GL, BUEHRING GC (1997). Hormone regulation of bovine leukemia virus via the long terminal repeat. *Virology*, **239**(2): 249–258.
- NIEWIESK S, DAENKE S, PARKER CE, TAYLOR G, WEBER J, NIGHTINGALE S, BANGHAM CR (1995). Naturally occurring variants of human T-cell leukemia virus type I Tax protein impair its recognition by cytotoxic T lymphocytes and the transactivation function of Tax. *Journal of Virology*, **69**(4): 2649–2653.

- NISHIMORI A, ANDOH K, MATSUURA Y, KUMAGAI A, HATAMA S (2021). Establishment of a simplified inverse polymerase chain reaction method for diagnosis of enzootic bovine leukosis. *Arch Virol*, **166** (3): 841-851.
- OCHIAI C, KATAGIRI Y, KOBAYASHI S, NAITOH I, YONEYAMA S, TOMITA K, MURAKAMI K (2020). Development of a microchip electrophoresis-based, high-throughput PCR-RFLP method to type Tax 233 variants of bovine leukemia virus in Japan. *Archives of Virology*, **165**(12): 2961–2966.
- OCHIRKHUU N, KONNAI S, ODBILEG R, NISHIMORI A, OKAGAWA T, MURATA S, OHASHI K (2016). Detection of bovine leukemia virus and identification of its genotype in Mongolian cattle. *Archives of Virology*, **161**(4): 985-991.
- OGUMA K, SUZUKI M, SENTSU H. (2017). Enzootic bovine leukosis in a two-month-old calf. *Virus Res*, **233**:120–124.
- OHASHI T, HANABUCHI S, KATO H, TATENO H, TAKEMURA F, TSUKAHARA T, KANNAGI M (2000). Prevention of Adult T-Cell Leukemia-Like Lymphoproliferative Disease in Rats by Adoptively Transferred T Cells from a Donor Immunized with Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax-Coding DNA Vaccine. *Journal of Virology*, **74**(20): 9610–9616.
- OIE (2018) Enzootic bovine leukosis. In: OIE (ed) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Erişim 15.12.2018 <http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- OOSHIRO M, KONNAI S, KATAGIRI Y, AFUSO M, ARAKAKI N, TSUHA O, MURATA S, OHASHI K (2013). Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. *Vet. Rec*, **173**: 527.
- OTLU S, AYDIN F, GENÇ O, GÜLER MA, GÖKÇE G (2001). Kars yöresi sığırlarında bovine leukaemia virus enfeksiyonu üzerinde serolojik ve hematolojik araştırmalar. *Türk J Vet Anim Sci*, **25**: 105-110.
- OTT SL, JOHNSON R, WELLS SJ (2003). Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, **61**(4): 249–262.
- ÖZGÜNLÜK I, YILDIRIM Y, ALKAN F (2005). Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) kapsamındaki bölgede halk elinde yetiştirilen sığırlarda bovine leukemia virus (BLV) enfeksiyonunun seroprevalansı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **52**: 109–112.
- PANDEY GS, SIMULUNDU E, MWIINGA D, SAMUI KL, MWEENE AS, KAJIHARA M, MANGANI A, MWENDA R, NDEBE J, KONNAI S, TAKADA A (2017). Clinical and subclinical bovine leukemia virus infection in a dairy cattle herd in Zambia. *Arch. Virol*, **162**: 1051-1056.
- PANEI CJ, LARSEN AE, FUENTEALBA NA, METZ GE, ECHEVERRÍA MG, GALOSI CM, VALERA AR (2019). Study of horn flies as vectors of bovine leukemia virus. *Open Veterinary Journal*, **9**(1): 33–37.
- PANEI CJ, SERENA MS, METZ GE, BRAVI ME, GONZÁLEZ ET, ECHEVERRÍA MG (2013). Analysis of the pX region of bovine leukemia virus in different clinical stages of Enzootic Bovine Leukemia in Argentine Holstein cattle. *Virus Research*, **171**(1): 97–102.
- PHIRI MM, KAIMOYO E, CHANGULA K, SILWAMBA I, CHAMBARO HM, KAPILA P, KAJIHARA M, SIMUUNZA M, MUMA JB, PANDEY GS, TAKADA A, MWEENE AS, CHITANGA S, SIMULUNDU E (2019). Molecular detection and characterization of genotype 1 bovine leukemia virus from beef cattle in the traditional sector in Zambia. *Arch Virol*, **164**(10): 2531-2536.

- PLUTA A, BLAZHKO NV, NGIRANDE C, JORIS T, WILLEMS L, KUŹMAK J (2021). Analysis of Nucleotide Sequence of Tax, miRNA and LTR of Bovine Leukemia Virus in Cattle with Different Levels of Persistent Lymphocytosis in Russia. *Pathogens*, **10**(2): 246.
- PLUTA A, ROLA-ŁUSZCZAK M, DOUVILLE RN, KUŹMAK J (2018). Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: Identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences. *Virology Journal*, **15**(1): 1-14.
- PLUTA A, ROLA-ŁUSZCZAK M, KUBIŚ P, BALOV S, MOSKALIK R, CHOUDHURY B, KUŹMAK J (2017). Molecular characterization of bovine leukemia virus from Moldovan dairy cattle. *Arch Virol*, **162**(6): 1563-1576.
- PLUTA A, WILLEMS L, DOUVILLE RN, KUŹMAK J (2020). Effects of naturally occurring mutations in bovine leukemia virus 5'-ltr and tax gene on viral transcriptional activity. *Pathogens*, **9**(10): 1–28.
- POLAT M, OHNO A, TAKESHIMA SN, KIM J, KIKUYA M, MATSUMOTO Y, MINGALA CN, ONUMA M, AIDA Y (2015). Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle. *Arch Virol*, **160**(1): 285-296.
- POLAT M, MOE HH, SHIMOIRI T, MOE KK, TAKESHIMA SN, AIDA Y (2017). The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle. *Arch Virol*, **162**(2): 425-437.
- POLAT M, TAKESHIMA SN, HOSOMICHI K, KIM J, MIYASAKA T, YAMADA K, ARAINGA M, MURAKAMI T, MATSUMOTO Y, DE LA BARRA DIAZ V, PANEI CJ, GONZÁLEZ ET, KANEMAKI M, ONUMA M, GIOVAMBATTISTA G, AIDA Y (2016). A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology*, **13**(1): 1-23.
- POWERS MA, RADKE K (1992). Activation of bovine leukemia virus transcription in lymphocytes from infected sheep: rapid transition through early to late gene expression. *Journal of Virology*, **66**(8): 4769–4777.
- PUENTES R, DE BRUN L, ALGORTA A, DA SILVA V, MANSILLA F, SACCO G, CAPOZZO AV (2016). Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Veterinary Research*, **12**(1): 1–7.
- ROLA-ŁUSZCZAK M, PLUTA A, OLECH M, DONNIK I, PETROPAVLOVSKIY M, GERILOVYCH A, KUŹMAK J (2013). The Molecular Characterization of Bovine Leukaemia Virus Isolates from Eastern Europe and Siberia and Its Impact on Phylogeny. *PloS One*, **8**(3): 1–8.
- RONIQUE KIERMER VÉ, VAN LINT C, BRICLET D, VANHULLE C, KETTMANN R, VERDIN E, DROOGMANS L (1998). An Interferon Regulatory Factor Binding Site in the U5 Region of the Bovine Leukemia Virus Long Terminal Repeat Stimulates Tax-Independent Gene Expression. *Journal Of Virology*, **72**(7): 5526-5534.
- ROSEWICK N, MOMONT M, DURKIN K, TAKEDA H, CAIMENT F, CLEUTER Y, VERNIN C, MORTREUX F, WATTEL E, BURNY A, GEORGES M, VAN DEN BROEKE A (2013). Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral microRNAs in B-cell leukemia/ lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110** (6): 2306–2311.
- RUIZ V, PORTA NG, LOMÓNACO M, TRONO K, ALVAREZ I (2018). Bovine Leukemia virus infection in neonatal calves. risk factors and control measures. *Frontiers in Veterinary Science*, **5**: 267.

- SAKAKIBARA N, KABEYA H, OHASHI K, SUGIMOTO C, ONUMA M (1998). Epitope Mapping of Bovine Leukemia Virus Transactivator Protein Tax. *Journal of Veterinary Medical Science*, **60(5)**: 599–605.
- SALEMI M, DESMYTER J, VANDAMME AM (2000). Tempo and mode of human and simian T-lymphotropic virus (HTLV/STLV) evolution revealed by analyses of full-genome sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **17(3)**: 374–386.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989). Molecular Cloning- Alaboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA,; 7-13.
- SCHWARTZ I, LÉVY DL (1994). Pathobiology of bovine leukemia virus. *Veterinary Research*, **25(6)**: 521–536.
- SCHWINGEL D, ANDREOLLA AP, ERPEN LMS, FRANDOLOSO R, KREUTZ LC (2019). Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. *Scientific Reports*, **9(1)**: 1–7.
- SOMURA Y, SUGIYAMA E, FUJIKAWA H, MURAKAMI K (2014). Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection. *Archives of Virology*, **159(10)**: 2693–2697.
- STOTT ML, THURMOND MC, DUNN SJ, OSBURN BI, STOTT JL, (1991). Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. *Journal of General Virology*, **72**: 307–315.
- SUNDARAM R, SUN Y, WALKER CM, LEMONNIERF A, JACOBSON S, KAUMAYAP T(2003). A novel multivalent human CTL peptide construct elicits robust cellular immune responses in HLA-A* 0201 transgenic mice: implications for HTLV-1 vaccine design *Vaccine*, **21**: 2767-2781.
- ŞEVİK M, AVCI O, İNCE ÖB (2015). An 8-year longitudinal sero-epidemiological study of bovine leukaemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Turkey and analysis of risk factors associated with BLV seropositivity. *Tropical Animal Health and Production*, **47(4)**: 715–720.
- TAGHADOSI C, KOJOURI G, AHADI A, HASHEMI BAHREMANI M, KOJOURI A (2019). Bovine Leukaemia Virus Tax Antigen Identification in Human Lymphoma Tissue: Possibility of onco-protein Gene Ttransmission. *Research in Molecular Medicine*, **7(2)**: 25–32.
- TAJIMA S, AIDA Y (2000). The Region between Amino Acids 245 and 265 of the Bovine Leukemia Virus (BLV) Tax Protein Restricts Transactivation Not Only via the BLV Enhancer but Also via Other Retrovirus Enhancers. *Journal of Virology*, **74(23)**: 10939–10949.
- TAJIMA S, IKAWA Y, AIDA Y (1998). Complete Bovine Leukemia Virus (BLV) Provirus Is Conserved in BLV-Infected Cattle throughout the Course of B-Cell Lymphosarcoma Development. *Journal Of Virology*, **72(9)**: 7569-7576.
- TAKESHIMA SN, OHNO A, AIDA Y (2019). Bovine leukemia virus proviral load is more strongly associated with bovine major histocompatibility complex class II DRB3 polymorphism than with DQA1 polymorphism in Holstein cow in Japan. *Retrovirology*, **16(1)**: 10–15.
- TAN MT, YILDIRIM Y, EROL N, GÜNGÖR AB (2006). The seroprevalence of bovine herpes virus type 1 (BHV-1) and bovine leukemia virus (BLV) in selected dairy cattle herds in Aydin Province, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **30(4)**: 353–357.
- TARIM VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI (2011, 22 OCAK). İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları Ve Bildirimine İlişkin Yönetmelik. Resmi Gazete. Erişim 20.12.2018, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/01/20110122-4.htm>.

- TRONO KG, PÉREZ-FILGUEIRA DM, DUFFY S, BORCA MV, CARRILLO C (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol*, **83(3)**: 235-248.
- USUI T, KONNAI S, TAJIMA S, WATARAI S, AIDA Y, OHASHI K, ONUMA M (2003). Protective Effects of Vaccination with Bovine Leukemia Virus (BLV) Tax DNA Against BLV Infection in Sheep. *J. Vet. Med. Sci*, **65(11)**: 1201-1205.
- UYSAI A, YILMAZ H, BİLAL T, BERRIATUA E, BAKİREL U, ARSLAN M, ZERİN M, TAN H (1998). Seroprevalence of enzootic bovine leukosis in Trakya district (Marmara region) in Turkey. *Prev Vet Med*, **37(1-4)**: 121-128.
- VAN DEN BROEKE A, BAGNIS C, CIESIOLKA M, CLEUTER Y, GELDERBLUM H, KERKHOF P, BURNY A (1999). In Vivo Rescue of a Silent tax -Deficient Bovine Leukemia Virus from a Tumor-Derived Ovine B-Cell Line by Recombination with a Retrovirally Transduced Wild-Type tax Gene. *Journal of Virology*, **73(2)**: 1054–1065.
- VOGES H (2012). New Zealand Dairy Enzootic Bovine Leukosis (EBL) Control Scheme. *Surveillance*, **39(3)**: 41.
- VONECHE V, CALLEBAUT I, KETTMANN R, BRASSEUR R, BUMY A, PORTETELLE D (1992). The 19-29 amino acid fragment of GP51 adopts an amphiphilic structure and plays a key role in the fusion events induced by bovine leukemia virus. *J Biol Chem*, **267**: 15193- 15197.
- WILLEMS L, KETTMANN R, BURNY A (1991). The amino acid (157-197) peptide segment of bovine leukemia virus p34tax encompass a leucine-rich globally neutral activation domain. *Oncogene*, **6**: 159–163.
- XIAO J, BUEHRING GC (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.
- XU X, KANG SH, HEIDENREICH O, BROWN DA, NERENBERG MI (1996). Sequence requirements of ATF2 and CREB binding to the human T-cell leukemia virus type 1 LTR R region. *Virology*, **218(2)**: 362–371.
- YANG Y, CHEN L, DONG M, HUANG W, HAO X, PENG Y, YANG Z (2019). Molecular characterization of bovine leukemia virus reveals existence of genotype 4 in Chinese dairy cattle. *Virology Journal*, **16(1)**: 1–7.
- YANG Y, KELLY PJ, BAI J, ZHANG R, WANG C (2016). First Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus Infections in the Caribbean. *PLoS One*. **11(12)**: e0168379.
- YILDIRIM Y, BURGU İ (2005). The seroprevalence of bluetongue (BT), IBR, PI-3, EBL and BVD infections in cattle in northeastern Anatolia. *Veterinary Journal of Ankara University*, **52(27)**: 113–117.
- YOON SS, BAE YC, LEE KH, HAN B, HAN HR (2005). Characteristics of bovine lymphoma caused by bovine leukemia virus infection in Holstein-Friesian dairy cattle in Korea. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **18(5)**: 728–733.
- YOSHINAKA Y, KATOH I, COPELAND TD, SMYTHERS GW, OROSZLAN S (1986). Bovine leukemia virus protease: purification, chemical analysis, and in vitro processing of gag precursor polyproteins. *J Virol*, **57(3)**: 826-832.
- YU C, WANG X, ZHOU Y, WANG Y, ZHANG X, ZHENG Y (2019). Genotyping bovine leukemia virus in dairy cattle of Heilongjiang, northeastern China. *BMC Veterinary Research*, **15(1)**: 1–9.

- ZANDOMENI RO, CARRERA-ZANDOMENI M, ESTEBAN E, FERRER JF (1991). The trans-activating C-type retroviruses share a distinct epitope(s) that induces antibodies in certain infected hosts. *J Gen Virol*, **72(9)**: 2113–2119.
- ZHANG R, JIANG J, SUN W, ZHANG J, HUANG K, GU X, WANG C (2016). Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. *Breast Cancer Research*, **18(1)**: 8–9.
- ZHAO X, BUEHRING GC (2007). Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: Possible effects of selection and escape. *Virology*, **366**: 150-165.
- ZHAO X, JIMENEZ C, SENTSUI H, BUEHRING GC (2007a). Sequence polymorphisms in the long terminal repeat of bovine leukemia virus: Evidence for selection pressures in regulatory sequences. *Virus Research*, **124(1–2)**: 113–124.
- ZHAO X, MCGIRR KM, BUEHRING GC (2007b). Potential evolutionary influences on overlapping reading frames in the bovine leukemia virus pXBL region. *Genomics*, **89(4)**: 502–511.
- ZYRIANOVA IM, KOVALCHUK SN (2020). Bovine leukemia virus tax gene/Tax protein polymorphism and its relation to Enzootic Bovine Leukosis. *Virulence*, **11(1)**: 80–87.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Raporu



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 20/02/2019
TOPLANTI NO : 2019-5
DOSYA NO : 2019-29
KARAR NO : 2019-5-51

Yürüttüğü Ankara Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Feray ALKAN'ın yaptığı araştırmacı olarak Arş. Gör. Selda DURAN YELKEN'in katıldığı "Bovine Leukemia Virusun Env, LTR ve pX Gen Bölgelerinin Moleküler Analizi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışma Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" nin 7-h maddesi kapsamında değerlendirilerek izne tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 04/03/2019-04/03/2021

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Fatih CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Doç. Dr. Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Dr. Öğr. Üyesi Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E
Uzm. Vet. Hek. Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Demeği	Serbest	E
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K