

# Genotipizacija virusa Epstein-Barr analizom sekvencije gena LMP-1

---

**Batović, Margarita**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:294826>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-06**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Margarita Batović

**GENOTIPIZACIJA VIRUSA EPSTEIN-BARR ANALIZOM  
SEKVENCIJE GENA *LMP-1***

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“, pod vodstvom dr. sc. Snježane Židovec Lepej, znanstvene savjetnice, naslovne docentice Prirodoslovno-matematičkog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Snježani Židovec Lepej na ukazanom povjerenju, pristupačnosti i strpljenju tijekom izrade i pisanja ovoga rada. Hvala i na pružanju mogućnosti za izradu ovog diplomskog rada u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“.*

*Zahvaljujem se i dr. sc. Ivani Grgić na pruženoj pomoći i susretljivošću u provedbi eksperimentalnog dijela ovog rada.*

*Veliko hvala kolegama Josipu i Ivani na pomoći u laboratoriju i ostalim savjetima.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji na ljubavi i strpljenju te prijateljima na podršci tijekom cjelokupnog studiranja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## GENOTIPIZACIJA VIRUSA EPSTEIN-BARR ANALIZOM SEKVENCIJE GENA *LMP-1*

Margarita Batović

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virus Epstein-Barr (EBV) ili humani gammaherpesvirus 4 je DNA virus koji pripada rodu *Lymphocryptovirus*. EBV se klasificira u podtipove prema genetskoj raznolikosti gena *LMP-1* koji kodira latentni membranski protein virusa te pokazuje viši stupanj polimorfizma u usporedbi s drugim genima ovog virusa. Cilj ovog rada bio je odrediti distribuciju podtipova virusa EBV temeljem sekvencije karboksi-terminalne regije gena *LMP-1*. U istraživanje je uključen 41 ispitanik s infektivnom mononukleozom uzrokovanom infekcijom virusom EBV. Podtipovi virusa EBV određeni su metodom Sangerovog sekvenciranja i filogenetske analize. Rezultati ovog istraživanja po prvi su puta dokazali prisutnost podtipova China 1, Mediterranean, B95-8 i North Carolina virusa EBV koji se temelje na sekvenci karboksi-terminalne regije gena *LMP-1*. Analizom sekvencija *LMP-1* gena dokazana je prisutnost delecija veličine 30 pb i 69 pb, kao i karakteristična tandemska ponavljanja veličine 33 pb. Detektirano je čak 60 aminokiselinskih promjena pojedinih *LMP-1* podtipova virusa u odnosu na EBV prototip B95-8. U ovom su radu otkrivene četiri nove supstitucije u izolatima podtipa Mediterranean, kao i u prototipu B95-8 virusa. Dokazana je i povezanost kinetike virusne replikacije i EBV *LMP-1* podtipova kao i negativna korelacija između dobi ispitanika i viremije. Rezultati ovog rada ukazuju na molekularnu raznolikost virusa Epstein-Barr u Hrvatskoj.

(58 stranica, 17 slika, 16 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: infektivna mononukleozna, podgenotipovi, molekularna filogenija, sekvenciranje

Voditelj: dr. sc. Snježana Židovec Lepej, znanstvena savjetnica, naslovna docentica

Ocjenitelji: dr. sc. Snježana Židovec Lepej, docent

dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

dr. sc. Silvija Černi, docent

Rad prihvaćen: 28.02.2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### EPSTEIN-BARR VIRUS GENOTYPING BASED ON *LMP-1* GENE SEQUENCING

Margarita Batović

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Epstein-Barr virus (EBV) or human gammaherpes virus 4 is a DNA virus belonging to the genus *Lymphocryptovirus*. Classification of EBV subtypes is based on genetic diversity of LMP-1 gene which is coding for the synthesis of latent membrane protein 1 and exhibits a higher degree of polymorphism in comparison to the other EBV genes. The main goal of this study was to determine the distribution of EBV subtypes based on the sequences of LMP-1 gene carboxy-terminal region. This study included 41 participants with infectious mononucleosis caused by EBV infection. EBV subtypes were determined by Sanger's method of sequencing and phylogenetic analysis. Results of this research showed, for the first time, the presence of China1, Mediterranean, B95-8 and North Carolina subtypes of EBV based on a carboxy-terminal LMP-1 gene sequence, while LMP-1 gene analysis showed the presence of 30 bp and 69 bp deletions and characteristic 33 bp tandem repeats. A total of 60 amino acid changes in individual viral LMP-1 subtypes compared to the B95-8 prototype strain were detected. Four new substitutions were discovered within Mediterranean and B95-8 subtypes. Furthermore, association between viral replication kinetics and EBV LMP-1 subtypes was also found. The results of this study indicate a molecular diversity of Epstein-Barr virus in Croatia.

(58 pages, 17 figures, 16 tables, 56 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: infectious mononucleosis, subgenotypes, molecular phylogeny, sequencing

Supervisor: associate professor Snježana Židovec Lepej, PhD, scientific advisor

Reviewers: Dr. Snježana Židovec Lepej, Asst. Prof.

Dr. Nada Oršolić, Prof.

Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Thesis accepted: 28.02.2019.

## POPIS KRATICA

AP1 – aktivatorski protein 1 (*activator protein 1*)

CD21 – receptor klastera diferencijacije 21 (*cluster od differentiation 21*)

CD40 – receptor klastera diferencijacije 40 (*cluster od differentiation 40*)

CD8 – receptor klastera diferencijacije 8 (*cluster of differentiaton 8*)

cDC – konvencionalna dendritička stanica (*conventional dendritic cell*)

CTAR – C-terminalna aktivacijska regija (*C-terminal activating region*)

ddNTP – dideoksinukleotid trifosfat

EA – rani antigen (*early antigen*)

EBER – EBV-kodirajuća mala molekula RNA (*EBV-encoded small RNA*)

EBNA1 – jezgreni antigen 1 virusa Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus nuclear antigen 1*)

EBNA2 – jezgreni antigen 2 virusa Epstein-Barr (*Epstein-barr virus nuclear antigen 2*)

EBV – virus Epstein-Barr

FRET – fluorescentni rezonantni prijenos elektrona (*fluorescence resonance energy transfer*)

gp350 – glikoprotein 350

HLA – humani leukocitni antigen (*human leukocyte antigen*)

IFN- $\alpha/\beta$  – interferon alfa/beta

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IgG – imunoglobulin klase G

IgM – imunoglobulin klase M

IL-1 – interleukin 1

IL-10 – interleukin 10

IL-6 – interleukin 6

IM – infektivna mononukleozna

JAK/STAT – Janus kinaza/prijenosnik signala i aktivator transkripcije (*Janus kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription*)

JNK – c-Janus N-terminalna kinaza (*c-Jun N-terminal kinase*)

LMP-1 – latentni membranski protein 1 (*latent membrane protein 1*)

Med – Mediterranean podtip

MRCa – najbliži zajednički predak (*most recent common ancestor*)

NF- $\kappa$ B – jezgreni faktor  $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*)

NK – prirodene stanice ubojice (*natural killer cells*)

NPC – nazofaringealni karcinom (*nasopharyngeal carcinoma*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (*polymerase chain reaction*)

pDC – plazmacitoidna dendritička stanica (*plasmacytoid dendritic cell*)

PI3K/AKT – fosfoinozimid 3-kinaza/protein kinaza B (*phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B*)

PRR – receptor za prepoznavanje molekularnih obrazaca (*pattern recognition receptor*)

PTLD – posttransplantacijska limfoproliferativna bolest (*posttransplant lymphoproliferative disease*)

RCA – nedavni zajednički predak (*recent common ancestor*)

RT – PCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time polymerase chain reaction*)

TES – transformacijsko efektorsko mjesto (*transformation effector site*)

TLR-3 – Toll-u sličan receptor 3 (*Toll-like receptor 3*)

TLR-9 – Toll-u sličan receptor 9 (*Toll-like receptor 9*)

TNF – faktor nekroze tumora (*tumor necrosis factor*)

TRAF – faktor povezan s receptorom za TNF (*TNF receptor-associated factor*)



UPGMA – metoda neponderiranog grupiranja parova s aritmetičkom sredinom (*unweighted pair group method with arithmetic mean*)

VCA – virusni kapsidni antigen (*viral capsid antigen*)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Virus Epstein-Barr .....	1
1.1.1. Struktura viriona i organizacija genoma .....	2
1.1.2. Podtipovi virusa Epstein-Barr .....	4
1.2. Replikacijski ciklus virusa EBV .....	6
1.2.1. Latentni ciklus .....	7
1.2.2. Latentni membranski protein 1 – LMP-1 .....	8
1.3. Imunosni odgovor na virus EBV .....	10
1.3. Infektivna mononukleoza .....	12
1.3.1. Antivirusni lijekovi i cjepivo .....	14
1.5. Molekularna filogenija.....	14
1.5.1. Filogenetsko stablo.....	15
1.5.2. Izrada filogenetskog stabla.....	16
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>20</b>
3.1. Ispitanici i biološki uzorci .....	20
3.2. Reagensi, otopine i dodatni materijal.....	20
3.2.1. Komplet reagensa i otopina za izolaciju DNA .....	20
3.2.2. Komplet reagensa i otopina za RT-PCR.....	21
3.2.3. Komplet reagensa i otopina za PCR amplifikaciju i ugniježđeni PCR.....	22
3.2.4. Komplet reagensa i otopina za reakciju sekvenciranja .....	23
3.2.5. Komplet reagensa i otopina za reakciju pročišćavanja i denaturacije amplikona.....	24
3.2.6. Uređaji, računalni programi i dodatni potrošni materijal.....	24
3.3. Izolacija DNA iz periferne krvi .....	25
3.4. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (RT-PCR).....	27

3.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR) i ugniježđeni PCR .....	29
3.6. Sekvenciranje karboksi-terminalnog kraja gena <i>LMP-1</i> .....	31
3.7. Računalna i filogenetska analiza rezultata .....	34
3.8. Statistička obrada podataka .....	35
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>36</b>
4.1. Demografski i virološki parametri ispitanika.....	36
4.2. Povezanost viremije sa spolom i dobi ispitanika.....	37
4.3. Karakterizacija sekvencija gena <i>LMP-1</i> .....	38
4.3.1. Filogenetsko stablo.....	38
4.3.2. Detekcija karakterističnih nukleotidnih delecija i ponavljanja gena <i>LMP-1</i> .....	41
4.3.3. Određivanje aminokiselinskih promjena gena <i>LMP-1</i> .....	42
4.4. Povezanost pojedinih podtipova gena <i>LMP-1</i> EBV i viremije u krvi .....	45
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>46</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>51</b>
<b>7. REFERENCE .....</b>	<b>52</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>58</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Virus Epstein-Barr

Virus Epstein-Barr (EBV) ili humani gammaherpesvirus 4 pripada porodici *Herpesviridae* i rodu *Lymphocryptovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses 2019). Michael Anthony Epstein i Iivonne Barr otkrili su EBV 1964. godine primjenom elektronske mikroskopije tijekom kultivacije limfoblasta izoliranih iz osobe oboljele od Burkittova limfoma (Slika 1a). EBV je prvi otkriveni onkogeni virus, a njegovo glavno biološko obilježje je uspostava doživotne latencije u B-limfocitima pri čemu dolazi do transformacije i imortalizacije zaraženih stanica. Onkogeni potencijal virusa EBV otkriven je u pokusima transformacije primarnih kultura B-limfocita u limfoblastne stanične linije (Pope 1967), kao i tijekom kokultivacije leukocita zdravih ljudi sa stanicama Burkittovog limfoma *in vitro* (Henle i sur. 1967).

U akutnoj fazi zaraze EBV zaražava B-limfocite u kojima, poput ostalih gammaherpesvirusa, uspostavlja latentnu infekciju te doživotno perzistira uz mogućnost kasnije aktivacije litičkog replikacijskog ciklusa te posljedične virusne replikacije. EBV se može replicirati i u stanicama višeslojnog pločastog epitela ždrijela, a zaražava i T-limfocite, monocite i NK-stanice pri čemu stanični virusni tropizam značajno utječe na patogenezu bolesti povezanih s ovim virusom (Mui i sur. 2017, Smatti i sur. 2017, IARC Group 2012).

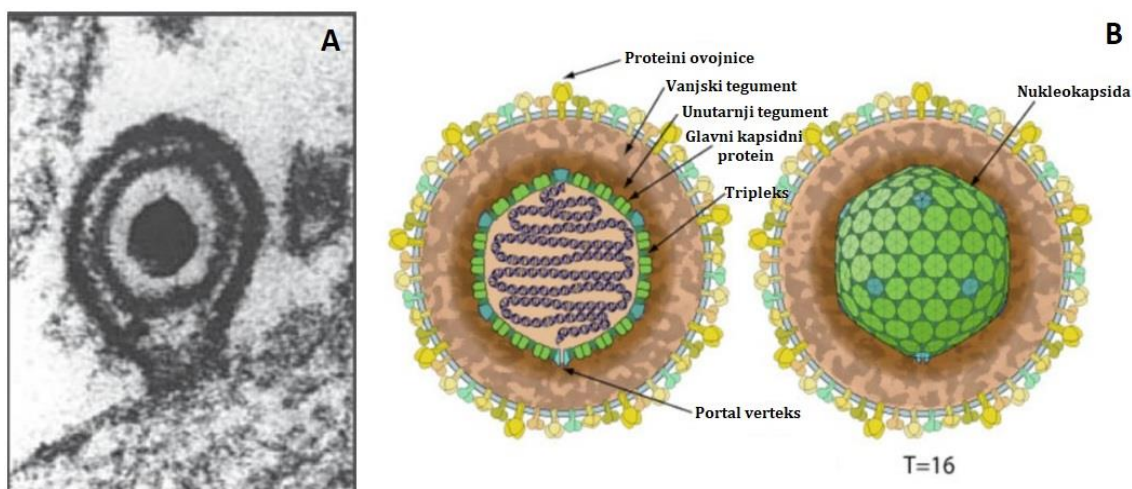
Procjenjuje se da je više od 90% svjetske populacije zaraženo virusom EBV (Lieberman 2014). U razvijenim državama s visokim standardom higijene, virusom EBV se najčešće zaražuju djeca u dobi od 2 do 4 godine te adolescenti u dobi od 14 do 18 godina što se dokazuje detekcijom antitijela specifičnih za virus (tzv. serokonverzija). Prevalencija EBV zaraze (tzv. seroprevalencija) povećava se s dobi te u djece iznosi do 70% (ovisno o dobnoj skupini), a u odraslih osoba oko 90% (Trottier i sur. 2012). U zemljama s niskim standardom higijene, do zaraze virusom EBV dolazi već u ranom djetinjstvu te se procjenjuje da su gotovo sva djeca seropozitivna do šeste godine života (Smatti i sur. 2018). Beader i sur. (2018) analizirali su prevalenciju antitijela specifičnih za EBV u 2022 osoba iz Hrvatske te pokazali da su antitijela klase IgG prisutna u 59.6% djece mlađe od 9 godina, dok je seroprevalencija IgG u dobnoj skupini od 30-39 godina iznosila čak 98.3%.

EBV se najčešće prenosi oralnim putem, no virus se još može prenijeti putem transfuzije krvi i krvnim pripravcima, kao i transplantacijom organa (Smatti i sur. 2017). Akutna infekcija najčešće je asimptomatska, no ponekad se prezentira u obliku benignih limfoproliferativnih bolesti poput infektivne mononukleoze, posebice u kasnom djetinjstvu i ranijoj odrasloj dobi (Choi i sur. 2018, Banko i sur. 2016a). Zbog svojeg onkogenog potencijala, EBV se etiološki povezuje i s malignim bolestima poput posttransplantacijske limfoproliferativne bolesti, Burkittovog limfoma, nazofaringelanog karcinoma i Hodgkinovog limfoma. Učestalost ovih malignih bolesti je viša u jugoistočnoj Aziji te sjevernoj i ekvatorijalnoj Africi (posebice Burkittovog limfoma), nego u ostalim područjima svijeta (Banko i sur. 2012).

#### 1.1.1. Struktura viriona i organizacija genoma

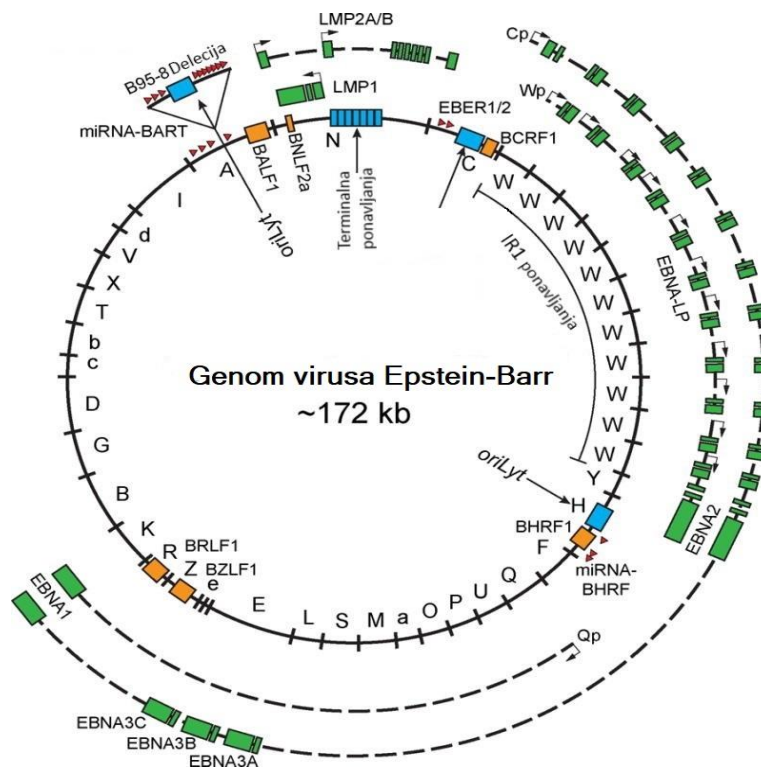
Epstein-Barr virion sastoji se od 172 kpb linearne dvolančane DNA molekule unutar ikosaedarske nukleokapside (T=16) koja je okružena ovojnicom koja sadrži različite virusne glikoproteine od kojih je posebno značajan gp350 koji se veže na stanični receptor CD21 tijekom zaraze B-limfocita. Između virusne ovojnice i kapside nalaze se proteini tegumenta (Slika 1b.) (Draborg i sur. 2012, Germi i sur. 2012). Virusna DNA se u jezgri stanice domaćina cirkularizira spajanjem terminalnih ponavljanja, zatim slaže u nukleosome i završava pakiranjem u malene kromosomske strukture nazvane episomima (Mui i sur. 2017). Osim u obliku mnogobrojnih episoma nalik plazmidima, EBV DNA se može i direktno ugraditi u kromosomsku DNA te perzistirati u obliku integrirane DNA (Smatti i sur. 2018).

EBV je prvi veliki herpesvirus čiji je genom potpuno sekvenciran 1984. godine kao genom laboratorijskog soja tj. prototipa B95-8 koji ima deleciju veličine 12 kb u usporedbi s genomom soja divljeg tipa virusa (Slika 2.) (Kwok i sur. 2016). Genom virusa EBV kodira više od 85 gena i 44 mikroRNA, a nomenklatura skoro stotinjak otvorenih okvira čitanja (ORFs) virusa zasnovana je prema mapi BamHI-restriksijskih fragmenata gdje je svaki pronađeni fragment virusa EBV poredan prema veličini u padajućem nizu, kao i razdijeljen na litičke i latentne gene. Genom virusa EBV sadrži i seriju 0.5-kb dugih direktnih terminalnih ponavljanja, kao i unutarnje ponavljajuće sekvencije koje služe za podjelu genoma na kratke i duge jedinstvene sekvencijske domene koje čine kodirajuće regije genoma (IARC Group 2012).



Slika 1. Struktura virusa Epstein-Barr; (A) Epstein-Barr virusni elektronski mikrograf i (B) Struktura Epstein-Barr viriona (Preuzeto i prilagođeno prema Young i Rickinson 2004 i [https://viralzone.expasy.org/176?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/176?outline=all_by_species))

Replikacija virusne DNA može započeti s tri različita ishodišta replikacije, *oriP*, *Raji ori* ili *oriLyt*. Za održavanje i replikaciju ekstrakromosomskih elementa u ljudskim stanicama potreban je *oriP* i protein EBNA1 *in trans* s tim da je replikacija DNA sinkronizirana s replikacijom kromosomske DNA. *Raji ori* je alternativno ishodište ovog tipa EBV replikacije, a *oriLyt* ishodište litičke DNA replikacije kojom se amplificira stotinjak dugih konkatemernih lanaca (Hammerschmidt i Sugden 2013). Većina proteina kodiranih genomom virusa EBV je uključena u metabolizam nukleotida radi održavanja replikacije virusne DNA ili u izgradnji strukturnih kompartimenata poput nukleokapside ili ovojnice (Smatti i sur. 2018).



Slika 2. Shema genoma episoma virusa Epstein-Barr. Slova na unutarnjoj strani cirkularnog genoma obilježavaju BamHI digestirane fragmente, *cis*-elementi (*oriP*, *oriLyt* i terminalna ponavljanja) su plavo obojeni, litički geni ranije aktivni u pre-latentnoj fazi zaraze su narančasto obojeni, kodirajući egzoni latentnih gena su zeleno obojeni, nekodirajuće RNA su prikazane kao crveni trokutići, a naznačeni su i sljedeći latentni promotori: W promotor (Wp), C promotor (Cp), Q promotor (Qp, samo u Latenciji tipa I) i LMP promotori te su njihove pre-mRNA prikazane kao isprekidane linije (Preuzeto i prilagođeno prema Price i Luftig 2014)

### 1.1.2 Podtipovi virusa Epstein-Barr

Tradicionalno se EBV može podijeliti na dva odvojena podtipa, Tip I i Tip II (poznati i kao EBV-1 i EBV-2), pri čemu je EBV-1 sveprisutan u svijetu, a ponajviše u Europi, Aziji i objema Americama, dok je EBV-2 najčešće nađen u nekim dijelovima Afrike i Nove Gvineje. Usprkos različitoj geografskoj rasprostranjenosti, EBV-1 i EBV-2 su vrlo slični u svojim genomskim sekvencijama i razlikuju se samo prema sekvencijama četiri latentna gena (*EBNA2*, *EBNA3A*, *EBNA3B* i *EBNA3C*) (Choi i sur. 2018, Tzellos i Farrell 2012). Razlike u većini gena različitih izolata virusa EBV manje su od 5%, uz iznimku *EBNA2* gena koji iskazuje samo 70% homologiju na nukleotidnoj i 54% na aminokiselinskoj razini. Pretpostavlja se da glavna razlika ovih dvaju tipova virusa proizlazi iz gena *EBNA2* čiji protein ima važnu ulogu u

transformaciji B-limfocita. EBV tipa 1 iskazuje veći potencijal transformacije ljudskih B-limfocita u limfoblastoidne stanične linije u usporedbi s tipom 2 ovog virusa, no molekularni mehanizmi koji pridonose razlici u transformacijskom potencijalu virusnih varijanti još nisu otkriveni (Münz 2015).

Tipovi 1 i 2 virusa EBV mogu se dodatno podijeliti u podtipove prema genetskoj raznolikosti gena *LMP-1* koji pokazuje viši stupanj polimorfizma u usporedbi s drugim EBV genima, osobito na svojem C-terminalnom dijelu. Klasificirano je sedam glavnih podtipova gena *LMP-1*: prototip BD5-8, Alaskan, China 1, China 2, , Mediterranean, s delecijom (Med +) ili bez nje (Med -), i North Carolina. Nedavno su otkriveni novi podtipovi iz različitih dijelova svijeta, uključujući i dva nova podtipa iz Tajlanda, Southeastern Asia 1 (SEA1) i Southeastern Asia 2 (SEA2), koji imaju jedinstvene aminokiselinske supstitucije (Smatti i sur. 2017). Ove varijante se definiraju temeljem prisutnosti delecije veličine 30 pb na C-kraju sekvencije, broju karakterističnih 11 aminokiselinskih (33 pb) ponavljanja kao i definiranim nukleotidnim i aminokiselinskim promjenama u odnosu na sekvenciju prototipa B95-8 (Banko i sur. 2016b).

Literaturni podatci pokazuju da se kod jedne osobe može detektirati više različitih podtipova virusa EBV, no značajnost koinfekcija različitim podtipovima u imunopatogenezi bolesti povezanih s ovim virusom za sada nije poznata (Münz 2015). Povećani onkogeni potencijal i niža imunogeničnost određenih podtipova virusa EBV može se povezati i s pojavom delecije veličine 30 pb koja povećava vrijeme poluživota glavnog onkoproteina LMP-1 (Banko i sur. 2016a). Primjerice, varijanta Cao gena *LMP-1* s delecijom 30 pb unutar CTAR2 regije virusa koja je izolirana iz B-limfocita stanica nazofaringealnog karcinoma iskazuje veći transformacijski potencijal u odnosu na prototip EBV-B95-8 i povezana je s većim rizikom od nastanka metastaza primarnog tumora. Smatra se i da delecija 69 pb na C-kraju gena *LMP-1* smanjuje aktivaciju transkripcijskog faktora AP1 te mijenja biologiju zaražene stanice (Münz 2015).

Podtipovi virusa EBV određeni temeljem sekvencije gena *LMP-1* imaju različitu distribuciju u pojedinim geografskim područjima, no značajno je istaknuti da je povezanost pojedinih podtipova virusa i patogeneze bolesti koje su etiološki vezane uz EBV nije dostatno istražena (Tzellos i Farrell 2012). Varijacije sekvencija gena *LMP-1* virusa EBV u Europi nedostatan su istražene. Correia i sur. (2017), Palser i sur. (2015) i Banko i sur. (2012) pokazali su veću zastupljenost podtipova B95-8 ili China1 u odnosu na druge podtipove u bolesnika iz

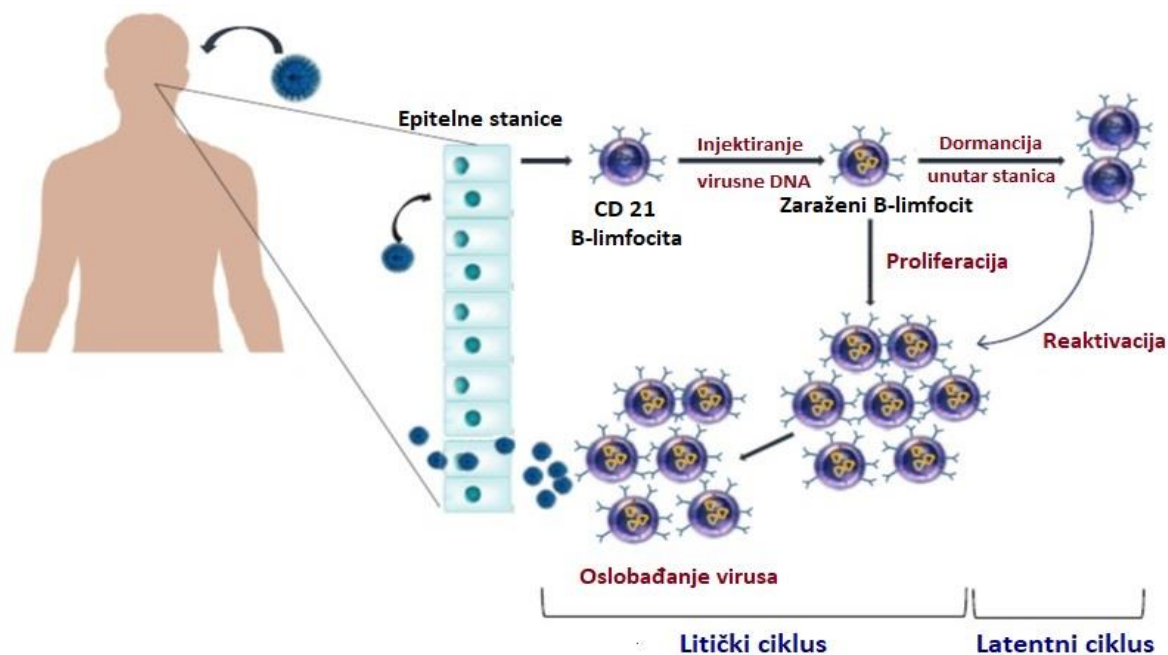


nekoliko europskih zemalja. Literaturni podatci o molekularnoj raznolikosti virusa EBV u Hrvatskoj nisu dostupni.

## 1.2. Replikacijski ciklus virusa EBV

Stanični receptor za EBV na B-limfocitima je molekula CD21 ili receptor za komplement tipa 2 (CR2) koja je, zajedno s molekulama CD19 i CD81, dio B-staničnog receptorskog kompleksa (Židovec Lepej i sur. 2019). Tijekom zaraze zrelih B-limfocita, virusni površinski gp350 veže se za molekulu CD21 na staničnoj membrani, a zatim slijedi vezanje virusnog gp42 s molekulama klase II glavnog sustava tkivne podudarnosti što omogućuje fuziju viriona i membrane ciljne stanice. EBV koristi i molekulu CD35 ili receptor za komplement tipa 1 (CR1) kao stanični receptor u CD21-negativnim stanicama (npr. nezrelim B-limfocitima). Tijekom infekcije epitelnih stanica koje ne ekspimiraju CD21, virusni BMRF-2 protein veže se za stanične  $\beta 1$  integrine, nakon čega slijedi interakcija virusnih proteina ovojnice gH/gL i staničnih integrina  $\alpha\beta 6/8$  čime se omogućuje fuzija ovojnice virusa i stanične membrane. Nakon fuzije viriona s membranom stanice te endocitoze, oslobađa se nukleokapsida čijom se razgradnjom virusni genom iz citoplazme transportira u jezgru u kojoj ostaje u obliku episoma ili se integrira u genom domaćina. Replikacija virusne DNA odvija se u jezgri, u sklopu litičke faze replikacijskog ciklusa virusa EBV (Slika 3.) (Odumade i sur., 2011).

Tijekom litičkog ciklusa virusa ekspimirana je većina gena virusa EBV pri čemu razlikujemo tri klase litičkih genskih produkata (vrlo rani (IE), rani (E) i kasni (L)) (Choi i sur. 2018). Transkripcijski faktori BZLF1 i BRLF1 aktiviraju rane litičke gene, a BZLF1 je ključan i za reaktivaciju litičkog ciklusa iz latentne faze (Tzellos i Farell 2012). Rani virusni proteini, poput BNLF2a, imaju kompleksne biološke funkcije u replikaciji virusa, modulaciji metabolizma zaražene stanice i sprječavanju procesiranja antigena. Kasni virusni proteini kodiraju sintezu strukturnih proteina poput VCA (virusni kapsidni antigen), a imaju i značajnu ulogu u izbjegavanju efektorskih mehanizama imunološkog sustava (npr. BCRF1). Tijekom litičke faze replikacijskog ciklusa virusa dolazi do proliferacije B-limfocita i diferencijacije u memorijske B-limfocite (Odumade i sur. 2011).



Slika 3. Reproductivni ciklus virusa Epstein-Barr u zdravom domaćinu (Preuzeto i prilagođeno prema Smatti i sur. 2018)

### 1.2.1. Latentni ciklus

Latencija je stanje perzistentne zaraze virusom bez virusne replikacije tj. formiranja viriona (Odumade i sur. 2011). Nakon akutne infekcije, EBV izbjegava efektorske mehanizme urođene i specifične imunosti ulaskom u latentnu fazu replikacije u B-limfocitima pri čemu dolazi do transkripcijske inaktivacije većine gena (Mui i sur. 2017). Geni virusa EBV eksprimirani tijekom primarne zaraze, tj. latencije tipa III uključuju šest jezgrenih antigena (EBNA-1, 2, 3A, 3B, 3C i LP (*leader protein*)) i tri latentna membranska proteina (LMP-1, 2A i 2B). U tumorskim stanicama (npr. nazofaringealnog karcinoma ili Burkittovog limfoma) dolazi do restrikcije ekspresije dodatnih gena te se uspostavlja latencija tipa II tijekom koje su transkripcijski aktivni samo geni koji kodiraju protein EBNA-1, dvije EBV-kodirajuće male RNA (EBER-1 i 2), microRNA molekule BART te LMP-1 i LMP-2A (Smatti i sur. 2018). Latentni membranski proteini su ekvivalentni signalima koji stanicama omogućuju preživljenje, tj. izbjegavanje apoptoze pri čemu LMP-1 prenosi signal koji je u zdravim stanicama posredovan molekulom CD40, dok LMP-2A prenosi signal koji inače nastaje vezanjem antigena za receptor B-limfocita (Draborg i sur. 2012). Faza latencije tipa 0 započinje u memorijskim B-limfocitima pri čemu nema ekspresije virusnih proteina, dok je za fazu

latencije tipa I u B-limfocitima koji se dijele karakteristična ekspresija samo gena *EBNA-1* (Smatti i sur. 2018).

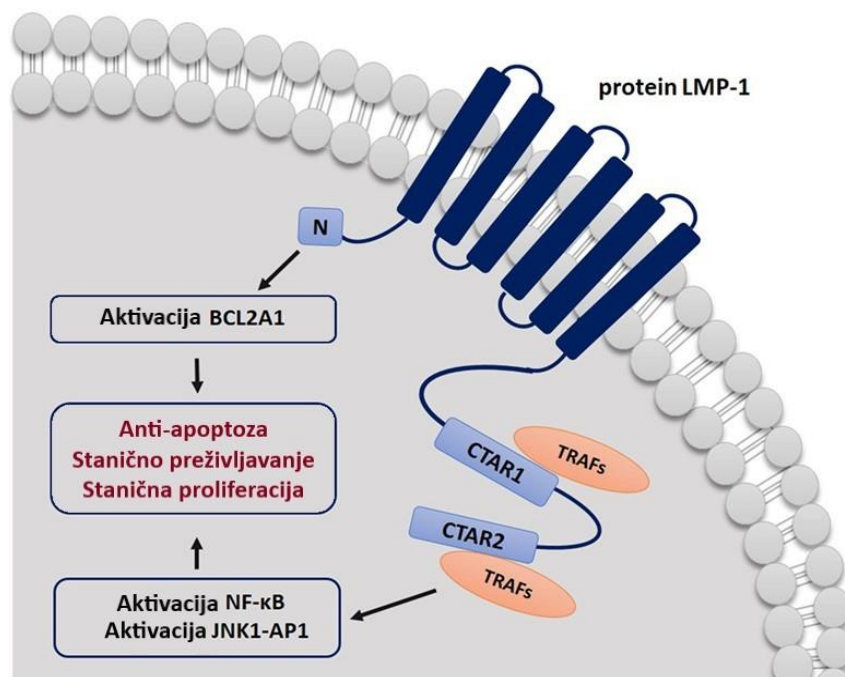
EBNA-2 je najvažniji EBV transkripcijski faktor koji kontrolira ekspresiju svih ostalih latentnih gena i blokira litičku replikaciju kako bi se izbjegla eliminacija virusa imunskim odgovorom domaćina te osigurala prisutnost latentno-zaraženih B-limfocita. EBNA-1 jedini je virusni antigen potreban za održavanje virusnog genoma upravo zbog svoje biološke značajnosti kao replikacijskog faktora tijekom latentne faze infekcije (Draborg i sur. 2012). Iako EBNA-1 suprimira reaktivaciju litičkog ciklusa, povremeno može doći do virusne reaktivacije u latentno zaraženim memorijskim B-stanicama što dovodi do novog virusnog ciklusa; njegove replikacije, zaraze novih stanica i oslobađanja u slinu (Smatti i sur. 2018, Kang i Kieff 2015). Fiziološki signali koji omogućuju reaktivaciju virusa te prelazak iz latentnog u litički ciklus nisu poznati, no pretpostavlja se da su posredovani B-staničnim receptorskim kompleksom (Draborg i sur. 2012).

#### 1.2.2. Latentni membranski protein 1 – LMP-1

Latentni membranski protein 1 (LMP-1) glavni je onkogeni protein virusa EBV (Banko i sur. 2016a). LMP-1 utječe na unutarstaničnu signalizaciju i rast stanice te modulira brojne procese u stanici poput stanične migracije, diferencijacije i tumorigeneze. Imitirajući biološku aktivnost molekule CD40, LMP-1 uzrokuje konstitutivnu aktivaciju puteva prijenosa signala u stanici koji su značajni za diferencijaciju i transformaciju B-limfocita u limfoblastoidne stanice putem ekspresije anti-apoptotskih proteina (El-Sharkawy i sur. 2018, Mui i sur. 2017).

LMP-1 je transmembranski protein koji se sastoji od 356 aminokiselina te sadrži kratki citoplazmatski N-terminus, šest transmembranskih domena i citoplazmatsku C-terminalnu domenu koja sadrži 200 pb (IARC Group 2012). Karboksi-terminalni rep proteina sadrži dvije signalne domene, karboksi-terminalne aktivirajuće regije (CTAR) 1 i 2, na koje se vežu stanični proteini poput transkripcijskog jezgrenog faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) čija je aktivacija povezana s inhibicijom apoptoze (Slika 4.) (Banko i sur. 2012). U glavne funkcionalne proteinske domene ubraja se i šest transmembranskih domena (TM1-6) koje posreduju u povezivanju lipidnih splavi, konstitutivnoj agregaciji i signalizaciji, kao i dva transformacijska efektorska mjesta (TES1 i TES2) koja posreduju u signalizaciji faktora nekroze tumora (tumor necrosis factor, TNF) (Kang i Kieff 2015).

Za onkogenu ulogu ovog proteina ključna je njegova sposobnost transformacije naivnih mirujućih B-limfocita, poticanjem ekspresije anti-apoptotskih gena *A20* i *bcl-2* te gena koji kodiraju biljege stanične aktivacije, u proliferirajuće limfoblastoidne stanice putem CTAR domena (El-Sharkawy i sur. 2018, Banko i sur. 2016a). Najvažniji putevi prijenosa signala u onkogenezi potaknutoj virusom EBV su PI3K/AKT i JAK/STAT koji svojom aktivacijom pridonose neograničenom replikativnom potencijalu zaraženih stanica, inhibiciji apoptoze i razvoju upalnih procesa u tumorskom tkivu (Mui i sur. 2017). Navedeni signalni putevi pridonose i genomskoj nestabilnosti, inhibirajući mehanizme popravka DNA i aktivirajući kinazu JNK, NF- $\kappa$ B i p38 signalne puteve. Onkogena aktivnost proteina LMP-1 posredovana je i indukcijom protoonkogenog *c-Myc*, kao i poticanjem diferencijacije živčanih zametnih stanica u stanice slične matičnim stanicama karcinoma (Mui i sur. 2017, Kang i Kieff 2015).



Slika 4. Shematski prikaz mehanizma kojim latentni membranski protein 1 (LMP-1) utječe na transdukciju staničnih signala. CTAR1 i CTAR2 regije vežu se za TRAF proteine i aktiviraju NF- $\kappa$ B i JNK-AP-1 puteve transdukcije signala, LMP-1 može blokirati apoptotske signale stanice aktivacijom proteina BCL2A1 (Preuzeto i prilagođeno prema Smatti i sur. 2018)

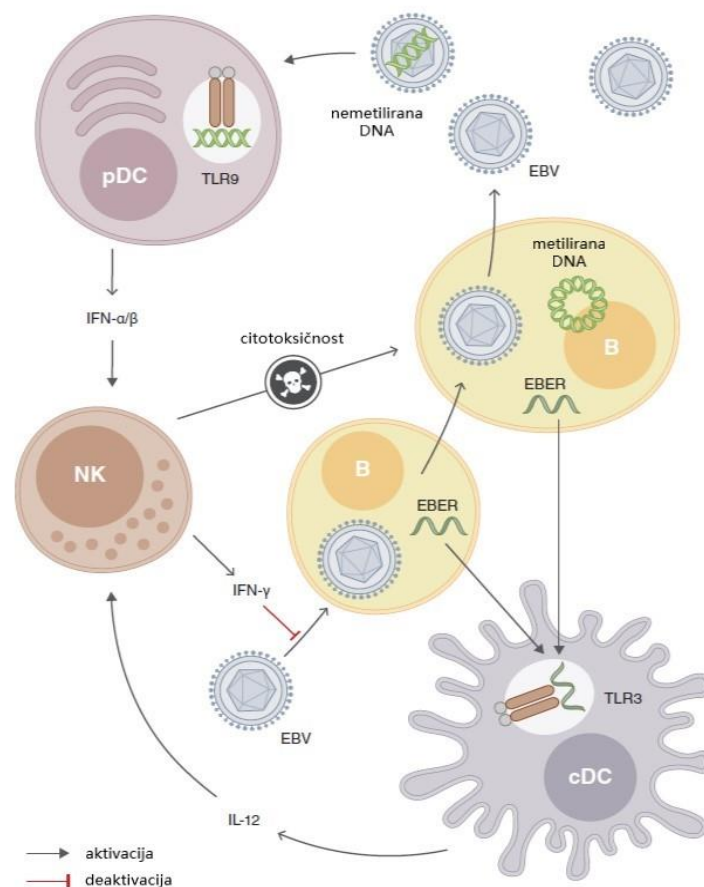
### 1.3. Imunosni odgovor na virus EBV

Prepoznavanje molekularnih struktura virusa EBV putem receptora za prepoznavanje molekularnih obrazaca (pattern recognition receptor, PRR) prvi je korak u započinjanju nespecifičnog tj. urođenog imunskog odgovora na EBV (Chijioke i sur. 2013). U tom procesu važnu ulogu imaju TLR-3 i TLR-9 (Toll-u slični receptori) koji su eksprimirani na dendritičkim stanicama, monocitima i B-limfocitima. Dosadašnja istraživanja pokazuju da TLR3 prepoznaje EBER, dok TLR9 prepoznaje nemetilirane CpG motive u DNA virusa EBV (Slika 5.) (Lunemann i sur. 2015). Prepoznavanje molekularnih obrazaca virusa EBV u stanici potiče transdukciju signala te transkripcijsku aktivaciju brojnih gena značajnih za aktivaciju staničnih mehanizama urođene, ali i specifične imunosti, posebice citokina (Chijioke i sur. 2013, Lunemann i sur. 2015).

U akutnoj EBV zarazi sintetiziraju se velike koncentracije proupalnih citokina poput faktora tumorske nekroze alfa ( $TNF\alpha$ ), interleukina-1 (IL-1) i IL-6 kao i imunosupresivnog citokina IL-10. NK-stanice također imaju značajnu ulogu u urođenoj imunoreakciji na EBV (Slika 5). Tijekom akutne infekcije, u perifernoj krvi zaraženih osoba povećava se ukupan broj NK-stanica koje ubijaju virusom-zaražene ciljane stanice. Iako je poznato da se tijekom akutne EBV zaraze povećava broj diferenciranih NK-stanica koje iskazuju NKG2C receptor, biološka značajnost pojedinih aktivacijskih i inhibicijskih receptora na NK stanicama u ovoj zarazi nije dostatno istražena (Lunemann i sur. 2015, Chijioke i sur. 2013). Najvažniju ulogu u eliminaciji B-limfocita zaraženih virusom EBV ima specifična imunost, tj. citotoksični  $CD8^+$  T-limfociti specifični za EBV. U akutnoj fazi zaraze dominiraju citotoksični  $CD8^+$  T-limfociti specifični za litičke antigene, no tijekom oporavka (faza rekonvalescencije) većina citotoksičnih  $CD8^+$  T-limfocita specifična je za latentne antigene, posebice EBNA-3 (Vince 2019, Johannsen i sur. 2017).

Humoralni odgovor na EBV je kompleksan te se tijekom akutne zaraze prvo pojavljuju antitijela specifična za litičke antigene (VCA i EA), dok se antitijela specifična za latentne antigene (EBNA1, EBNA2, EBNA3s i EBNA1P) pojavljuju tek u fazi rekonvalescencije. Značajnost specifičnih antitijela u ograničavanju EBV zaraze *in vivo* nije poznata. Primarna EBV zaraza karakterizirana je i sintezom velike količine antitijela specifičnih za antigene koji su prisutni na eritrocitima ovaca, konja i goveda, tj. heterofilnih antitijela. Heterofilna antitijela najčešće su klase IgM, nisu specifična za EBV, a njihova biološka značajnost nije poznata (Vince 2019, Johannsen i sur. 2017).

EBV je razvio mehanizme izbjegavanja efektorskih mehanizama imunološkog sustava. Gen *BCRF1* kodira sintezu virokina, tj. virusnog strukturnog homologa citokina IL-10 koji se veže na receptor za IL-10, ali ne inducira posljedičnu transdukciju signala te onemogućuje biološki učinak ovog citokina. Uz to, gen *BNLF2a* virusa EBV kodira sintezu proteina koji interferira s prezentacijom antigena i učinkovitim imunim odgovorom (Jochum i sur. 2012).

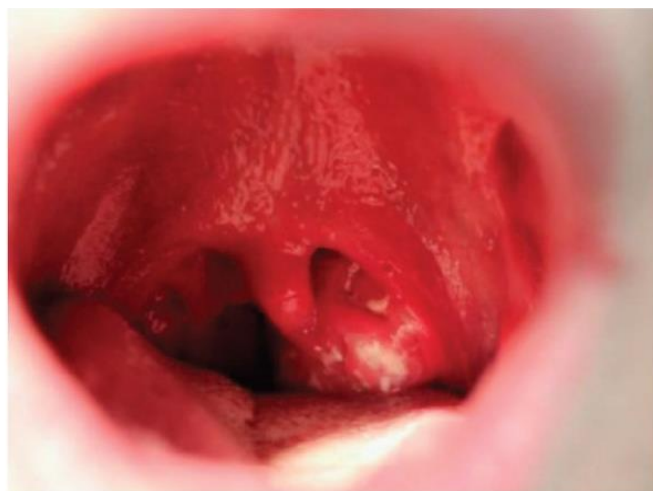


Slika 5. Nespecifični imunski odgovor putem prepoznavanja liganda receptora za prepoznavanje molekularnih obrazaca (PRR) i urođena imunorestrikcija na virus Epstein-Barr; B – B-limfocit, cDC – konvencionalna dendritička stanica, NK – prirodna stanica ubojica i pDC – plazmacitoidna dendritička stanica. Receptori TLR3 i TLR9 prepoznaju EBER i nemetiliranu virusnu DNA čime dolazi do aktivacije cDC i pDC koje ograničavaju infekciju virusom EBV putem aktivacije NK-stanica za proizvodnju IFN- $\gamma$  u odgovoru na IL-12 i povećanjem citotoksičnosti uslijed nailaska na IFN- $\alpha/\beta$ . NK-stanice sprječavaju transformaciju B-limfocita putem IFN- $\gamma$  i ubijaju litičke EBV-replikacijske stanice (Preuzeto i prilagođeno prema Chijioke i sur. 2013)

### 1.3. Infektivna mononukleoza

Infektivna mononukleoza je akutna zarazna bolest čiji su karakteristični simptomi vrućica, umor, povećanje limfnih čvorova, grlobolja, povećanje jetre i slezene uz proliferaciju aktiviranih CD8<sup>+</sup> T-limfocita specifičnih za EBV citomorfološki opisanih kao netipično veliki limfociti ili Downey stanice (Banko i sur. 2016b, Dunmire i sur. 2015). U 90% slučajeva bolest je etiološki povezana s virusom EBV, dok je u ostalih bolesnika najčešće uzrokovana citomegalovirusom, humanim herpesvirusom 6 ili adenovirusima (Lennon i sur. 2015). Prisutna je širom svijeta bez sezonskih naznaka, a u razvijenijim zemljama se najčešće manifestira kod adolescenata i u ranoj odrasloj dobi prenoseći se oralno, tj. putem sline (Balfour i sur. 2015), dok su drugi načini prijenosa (transfuzijom ili transplantacijom organa ili stanica) rijetki (Lennon i sur. 2015).

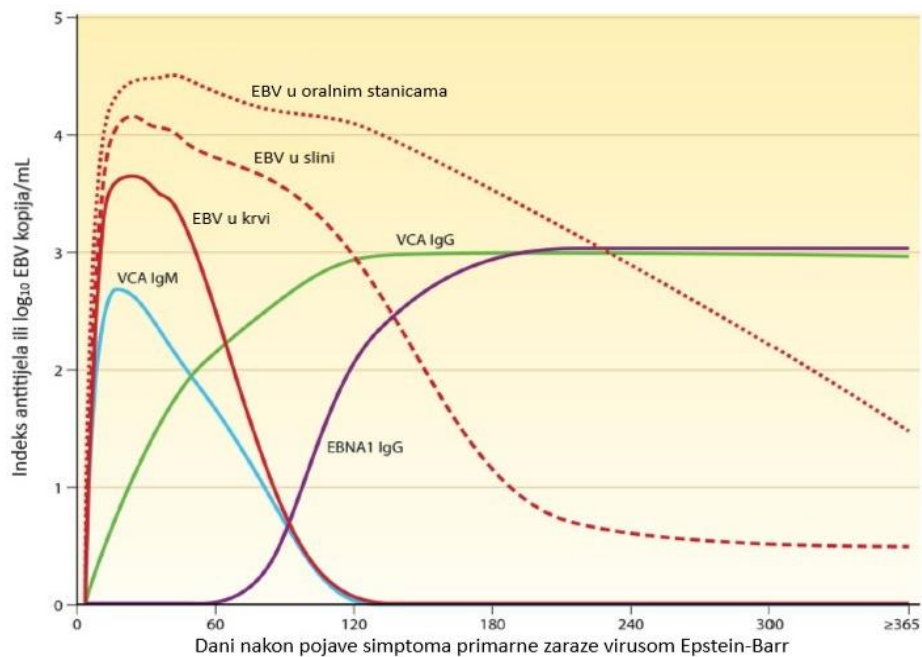
Klinički znakovi koji ukazuju na primarnu zarazu virusom EBV uključuju eksudativni faringitis s pojavom naslaga na krajnicima koje su posljedica nekroze epitela i limfatičkih stanica potaknute virusom te simetričnu cervikalnu i postartikularnu limfadenopatiju (Slika 6.) (Lennon i sur. 2015). Inkubacijski period IM traje oko šest tjedana te, iako je najčešće riječ o benignoj samoograničavajućoj bolesti koju ograničava specifična stanična imunost, treba naglasiti da se virus intenzivno replicira u akutnoj fazi zaraze što omogućuje brzo širenje u populaciji. Uz to, u 1% oboljelih mogu se razviti akutne komplikacije IM meningoencefalitisa, hemolitičke anemije ili puknuća slezene, dok se u dugoročne komplikacije IM ubrajaju maligne bolesti te kronična aktivna zaraza virusom EBV (Banko i sur. 2016a, Balfour i sur. 2015, Dunmire i sur. 2015).



Slika 6. Faringitis i eksudativni tozilitis karakteristični za infektivnu mononukleozu etiološki povezanu s virusom Epstein-Barr (Preuzeto od Balfour i sur. 2015)



U početnoj fazi IM uobičajena je vrlo intenzivna replikacija virusa EBV u stanicama usne šupljine i u perifernoj krvi, kao i sinteza antitijela specifičnih za EBV virusni kapsidni antigen (VCA) i intenzivna proliferacija CD8<sup>+</sup> T-limfocita specifičnih za litičke proteine virusa (Balfour i sur. 2015). Etiološka dijagnoza IM temelji se na detekciji antitijela specifičnih za VCA klase IgM te izostanka antitijela klase IgG za virusni jezgreni protein EBNA1 koji se pojavljuje tek nakon 3 mjeseca od zaraze (ekspirira se u latentnoj fazi replikacijskog ciklusa virusa) (Slika 7.) (Centers for Disease Control and Prevention 2019, Balfour i sur. 2015). Virusna replikacija najčešće se dokazuje metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (PCR), posebno u osoba kod kojih detekcija antitijela nije dijagnostički pouzdana (djeca mlađa od 18 mjeseci, imunokompromitirane osobe te oboljeli od autoimunih bolesti) (Centers for Disease Control and Prevention 2019, Vouloumanou i sur. 2012).



Slika 7. Kinetika antitijela specifičnih za virus Epstein-Barr i količina virusa u bolesnika s infektivnom mononukleozom. Slika prikazuje kinetiku replikacije virusa Epstein-Barr i količine antitijela specifičnih za virus određeni enzimskim imunotestom u usnoj šupljini i perifernoj krvi bolesnika (Preuzeto i prilagođeno prema Odumade i sur. 2011)



### 1.3.1 Antivirusni lijekovi i cjepivo

Inhibitori DNA polimeraze koja je eksprimirana u litičkoj fazi replikacijskog ciklusa (aciklovir, famciklovir, ganciklovir i foskarnet) inhibiraju replikaciju virusa EBV *in vitro* (Johannsen i sur. 2017). Većina simptoma IM posljedica je snažne imunoreakcije specifične na EBV te antivirusni lijekovi utječu na pojavu simptoma, trajanje bolesti i nastanak komplikacija *in vivo* (Vince 2019, Rafailidis i sur. 2010).

Cjepivo protiv virusa EBV za sada nije dostupno. Obzirom na biološka obilježja virusa EBV, cilj razvoja cjepiva je sprječavanje simptomatske IM te nastanak malignih bolesti koje su etiološki povezane s virusom EBV (Johannsen i sur. 2017). Naime, simptomatska IM povezana je s 3.4 puta većim rizikom za nastanak Hodgkinovog limfoma te bi razvoj cjepiva koji bi spriječio simptomatsku zarazu mogao smanjiti rizik od nastanka ove maligne bolesti. Razvoj cjepiva protiv virusa EBV temelji se na dvije strategije: primjenu profilaktičkih cjepiva koja potiču sintezu neutralizirajućih antitijela specifičnih za gp350 ili terapijskih cjepiva koja potiču specifičnu staničnu imunost na imunogenične epitope virusa EBV. Kliničko istraživanje faze II profilaktičkog cjepiva pokazalo je smanjenje učestalosti razvoja IM, no nije bilo učinkovito u sprječavanju same zaraze (Cohen 2015). Procjenjuje se da je zaraza virusom EBV povezana s nastankom oko 200 000 novih malignih bolesti u svijetu, stoga se razvoj cjepiva protiv virusa EBV smatra iznimno značajnim (Johannsen i sur. 2017).

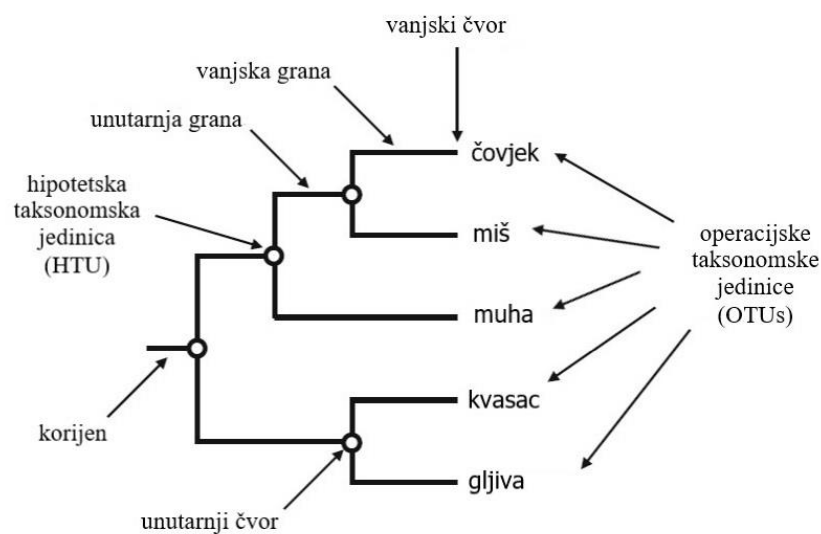
## 1.5. Molekularna filogenija

Molekularna filogenija je znanstvena disciplina koja proučava evolucijske odnose između organizama koristeći podatke dobivene iz molekularnih sekvencija nukleotida ili aminokiselina (Ajawatanawong 2016). Metode analize koje se koriste u molekularnoj filogeniji na početku su bile razvijene samo za otkrivanje evolucijskih puteva, no danas je ova znanstvena disciplina postala jedna od fundamentalnih u biologiji te se koristi u sistemskoj biologiji, molekularnoj epidemiologiji, identifikaciji gena i rekonstrukciji ancestralnih genoma (Ajawatanawong 2016, Yang i Ranalla 2012). Na molekularnoj razini, evolucija organizama je proces mutacije koji dovodi do selekcije pa se, slijedom toga, na temelju homologije ili sličnosti sekvencije DNA ili proteina, mogu odrediti evolucijski odnosi između organizama (Pevsner 2015, Xiong 2006). Sličnosti i divergencija među povezanim biološkim sekvencijama često se racionaliziraju i vizualiziraju u obliku filogenetskih stabala (Xiong 2006).

Korištenje molekularnih podataka za rekonstrukciju evolucijske prošlosti zahtijeva primjenu nekoliko pretpostavki od kojih je prva ta da su molekularne sekvence korištene u filogenetskoj konstrukciji homologne, to jest, da dijele zajedničkog pretka te su slijedom toga s vremenom i divergirale. Filogenetska divergencija je bifurkatna, podrazumijeva mogućnost razdvajanja „roditeljske“ grane na dvije grane „kćeri“ na bilo kojem mjestu grananja, odnosno čvoru. Posljednja pretpostavka je da je svaka pozicija u sekvenciji evoluirala neovisno, stoga je varijabilnost među sekvencijama dovoljno informativna za konstrukciju nedvosmislenih filogenetskih stabala (Xiong 2006).

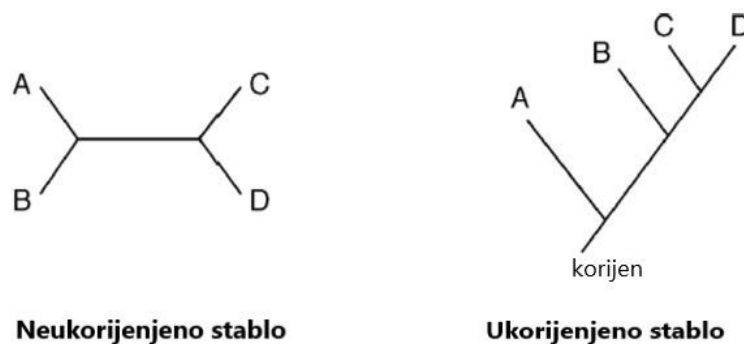
### 1.5.1. Filogenetsko stablo

Filogenetsko stablo je dijagram nalik stablu koji služi za vizualizaciju evolucijskih veza između seta operacijskih taksonomskih jedinica (OTUs) (Ajawatanawong 2016). Tipično rodoslovno stablo se sastoji od grana povezanih čvorovima te se njihov aranžman naziva topologijom stabla (Slika 8.) (Podsiadlo i Polz-Dacewicz 2013). Vanjski čvorovi, OTUs, predstavljaju sekvencije DNA, RNA, proteina ili taksona korištenih u analizi, dok unutarnji čvorovi predstavljaju nedavnog zajedničkog pretka (RCA) (Ajawatanawong 2016). Svaka grana predstavlja perzistenciju taksonomske jedinice kroz određeno vrijeme, a svaki čvor nastanak nove jedinice (Yang i Ranalla 2012).



Slika 8. Sastavnice filogenetskog stabla (Preuzeto i prilagođeno prema Ajawatanawong 2016)

Različita stabla mogu imati različitu topologiju, što se vidi na primjeru filograma kod kojeg dužine grana predstavljaju vrijednosti genetske divergencije i kladograma kod kojeg dužine grana nisu proporcionalne broju evolucijskih promjena pa nemaju filogenetski značaj (Xiong 2006). Korijen je najdalja grana filogenetskog stabla i predstavlja najbližeg zajedničkog pretka (MRCA) svih taksonomskih jedinica stabla (Ajawatanawong 2016). Filogenetsko stablo može biti ukorijenjeno ili neukorijenjeno (Slika 9.). Neukorijenjeno stablo prikazuje samo odnose između proučavanih taksonomskih jedinica stoga se iz njega ne mogu izvesti zaključci o usmjerenju evolucije. Suprotno, ukorijenjeno stablo, zahvaljujući prisutnosti korijena, omogućuje zaključivanje o redosljedu nasljeđivanja sekvencija (Podsiadlo i Polz-Dacewicz 2013). Da bi se korijen pravilno postavio, prilikom analize potrebno je dodati vanjsku grupu, odnosno sekvenciju organizma nedavno divergirano od ostalih organizama na filogenetskom stablu (Ajawatanawong 2016).



Slika 9. Ilustracija ukorijenjenog i neukorijenjenog filogenetskog stabla (Preuzeto i prilagođeno prema Xiong 2006)

### 1.5.2. Izrada filogenetskog stabla

Molekularna filogenetska analiza se može podijeliti na pet sljedećih koraka: (1) odabir sekvencija za analizu, (2) višestruko poravnanje sekvencija homolognih proteina ili nukleinskih kiselina, (3) odabir statističkog evolucijskog modela, (4) odabir metode izrade filogenetskog stabla i (5) procjena pouzdanosti stabla (Pevsner 2015).

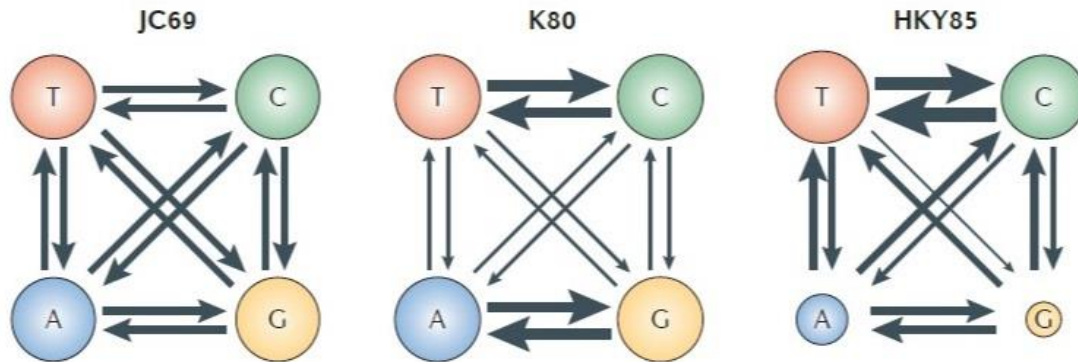
Za konstrukciju molekularnih filogenetskih stabala mogu se koristiti ili nukleotidne ili proteinske sekvencije. Odabir molekularnih markera ovisi o svojstvima sekvencije i svrsi istraživanja. Primjerice, za proučavanje vrlo blisko povezanih organizama bolje je odabrati

nukleotidne sekvencije koje evoluiraju brže nego proteini, dok se za proučavanje vrlo divergiranih grupa organizama radije uzimaju proteinske sekvencije koje su konzerviranije zbog degeneracije genetskog koda ili nukleotidne sekvencije sporije evolucije poput ribosomalne RNA (Xiong 2006). Nakon odabira potrebno je poravnati sve sekvencije jer dolazi do akumulacije insercijskih i delecijjskih mutacija kako divergiraju jedna od druge pa je u sekvencije potrebno umetnuti praznine da bi se povećala njihova sličnost. Rezultat poravnanja (eng. *alignment*) je raspodjela sekvencija u obliku matrice na način da je svaki znak međusobno, bio to nukleotid ili aminokiselina, u stupcu matrice u srodstvu skladno s pozicijskom homologijom kako svi potječu od zajedničkog ancestralnog ostatka (San Mauro i Agorreta 2010).

Filogenetska analiza se oslanja na modele aminokiselinskih ili DNA supstitucija jer je divergencija između sravnjenih sekvencija proporcionalna broju uočenih supstitucija (Pevsner 2015, Xiong 2006). Supstitucijski ili evolucijski modeli definirani su kao načini pretpostavki stopa supstitucija DNA ili aminokiselina u sekvencijama koji prema tim stopama izrađuju ispravni slijed evolucijskih događaja (Podsiadlo i Polz-Dacewicz 2013, Xiong 2006). Prvi i najjednostavniji jedno-parametarski evolucijski model je Jukes-Cantor model (JC69) koji pretpostavlja identičnu stopu supstitucije između bilo koja dva nukleotida (aminokiselina), dok sofisticiraniji Kimurin model (K80) pretpostavlja različitu stopu frekvencije za tranzicije i transverzije jer su tranzicije inače češći događaji nego transverzije (Slika 10.) (Yang i Ranalla 2012, Xiong 2006). Također, kod oba je modela frekvencija svakog od četiriju nukleotida podjednaka (Yang i Ranalla, 2012). Nadalje, postoje i kompliciraniji modeli koji uzimaju u obzir više parametara, s tim da je General Reversible model (GTR) sa šest parametara koji određuju frekvenciju svake supstitucije među najkompleksnijima (Podsiadlo i Polz-Dacewicz 2013).

Metode za filogenetsku rekonstrukciju mogu se klasificirati u dvije skupine: metode koje se temelje na matrici udaljenosti i metode koje se temelje na stanju karaktera (diskretne metode). Koncept prve metode se temelji na transformaciji kompletne sekvencijske informacije u matricu udaljenosti koja se analizira algoritmom za klasteriranje taksonomskih jedinica. Metode tog tipa, poput UPGMA, metode susjedskog sparivanja (NJ, eng. *neighbour joining*) i LS (eng. *last square*) metode su brže, ali se tijekom izgradnje stabla gubi sva sekvencijska informacija (Ajawatanawong 2016). Naprotiv, unatoč dugotrajnosti, diskretne metode, poput metode najveće vjerojatnosti (ML, eng. *maximum likelihood*), metode najveće štedljivosti (MP, eng. *maximum parsimony*) ili Bayesijske metode, koriste kompletnu

sekvencijsku informaciju brojeći akumulirane mutacijske događaje za evaluaciju najboljeg stabla (Ajawatanawong 2016, Xiong 2006).



Slika 10. Predikcije Markovljevih modela nukleotidne supstitucije; JC69 – Jukes-Cantor model, K80 – Kimurin model, HKY85 – Hasegawa-Kishino-Yano model. Debljina strelica ukazuje na supstitucijske omjere četiriju nukleotida, a veličina krugova na frekvencije nukleotida supstitucijskih procesa u ravnoteži (JC69 i K80 predviđaju iste omjere za sve nukleotide) (Preuzeto i prilagođeno prema Yang i Ranalla 2012)

Vjerodostojnost konstruiranog filogenetskog stabla procjenjuje se metodom samoučitanja (eng. *bootstrapping*), statističkom analizom uzrokovanja pogrešaka tijekom ponovnog uzorkovanja. Cilj metode je odrediti reproducibilnost trenutnog stabla putem ponavljajuće konstrukcije stabala s poravnanjima u kojima su uvedene nasumične fluktuacije. U slučaju ovog neznatnog narušavanja podataka, čvrsta filogenetska veza bi trebala imati dovoljno karaktera da podrži evolucijsku povezanost. Pokazano je da vrijednost samoučitanja od 70% otprilike odgovara statističkoj značajnosti od 95%, iako je to još uvijek predmet istraživanja (Xiong 2006).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je odrediti podtipove virusa EBV temeljem sekvencije C-terminalnog dijela gena *LMP-1* u bolesnika s infektivnom mononukleozom iz Hrvatske metodom Sangerovog sekvenciranja i filogenetske analize te utvrditi postoji li korelacija između spola i dobi bolesnika, viremije (broj kopija EBV DNA/ml krvi) i pojedinih podtipova virusa.

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Ispitanici i biološki uzorci

U istraživanje je uključena 41 osoba oboljela od infektivne mononukleoze uzrokovane akutnom zarazom virusom EBV koje su liječene u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu u periodu od siječnja do rujna 2018. godine kod kojih je, u sklopu molekularne dijagnostike, kvantificirana EBV DNA. Laboratorijska dijagnostika infektivne mononukleoze uzrokovane EBV zarazom u ispitanika temeljila se na detekciji antitijela specifičnih za VCA klase IgM te izostanku antitijela specifičnih za EBNA proteine virusa. Uz specifičnu humoralnu imunoreakciju na EBV, dodatni kriterij uključivanja u istraživanje bila je viremija veća od 2000 kopija EBV DNA po mL krvi. Biološki uzorci ispitanika koji su zadovoljili oba kriterija za uključivanje u istraživanje prikupljeni su i pohranjeni u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ odobrilo je ovo istraživanje na sjednici održanoj 19. prosinca 2018. godine.

U istraživanju je korištena periferna krv ispitanika koja je prikupljena venepunkcijom u sterilne Vacutainer epruvete od 7 ml koje sadrže antikoagulans K<sub>2</sub>EDTA (etilidiamintetraoctena kiselina). Biološki uzorci su ostavljeni 15 min na inkubaciji na sobnoj temperaturi i zatim pohranjeni na - 20 °C do testiranja. Za potrebe istraživanja korišten je ostatni dio biološkog uzorka koji se odbacuje.

### 3.2 Reagensi, otopine i dodatni materijal

#### 3.2.1. Komplet reagensa i otopina za izolaciju DNA

Za izolaciju DNA iz periferne krvi ispitanika korišten je komercijalni komplet reagensa „QIAamp DNA Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden, Njemačka) čiji se sastav nalazi u Tablici 1.

Tablica 1. Sastavne komponente komercijalnog kompleta „*QIAamp DNA Mini Kit*“

Sastavnica	Kratak opis
QIAamp Mini Kolone <i>QIAamp Mini Spin Columns</i>	Kolone s membranom od silikagela za koju se vežu nukleinske kiseline
Pufer AL <i>Buffer AL</i>	Pufer za lizu; sadrži kaotropne soli (gvanidin klorid)
Pufer AE <i>Buffer AE</i>	Pufer za ispiranje nečistoća; sadrži 10 mM Tris-Cl i 0.5 mM EDTA, pH 9.0
Pufer AW1 (koncentrat) <i>Buffer AW1 (concentrate)</i>	Pufer za ispiranje nečistoća; koncentrat u koji se dodaje apsolutni etanol
Pufer AW2 (koncentrat) <i>Buffer AW2 (concentrate)</i>	Pufer za ispiranje nečistoća uz dodatak natrijevog azida (inhibira rast mikroorganizama); koncentrat u koji se dodaje apsolutni etanol
Proteaza K <i>Proteinase K</i>	Proteaza K; cijepa peptidnu vezu proteina na karboksilnom kraju alifatskih i aromatskih aminokiselina
Kolekcijske epruvete (2 ml) <i>Collection tubes 2 ml</i>	Kolekcijske epruvete

### 3.2.2. Komplet reagensa i otopina za RT-PCR

Za određivanje viremije, odnosno broja kopija DNA virusa Epstein-Barr u 1 mililitru periferne krvi ispitanika, korišten je „LightCycler® EBV Quantification Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) komercijalni test amplifikacije nukleinskih kiselina lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (real-time PCR, engl. *real-time polymerase chain reaction*). Njegov sastav je prikazan u Tablici 2.



Tablica 2. Sastavne komponente komercijalnog kompleta „*LightCycler® EBV Quantification Kit*“

Sastavnica	Kratak opis
LightCycler® EBV Reakcijska Smjesa 1a <i>LightCycler® EBV Reaction Mix 1a</i>	"Hot Start" reakcijska smjesa; nakon miješanja obiju smjesa za detekciju EBV DNA i internu kontrolu (IC) sadrži FastStart Taq DNA polimerazu, reakcijski pufer i mješavinu dNTP-ova (s dUTP-om umjesto dTTP-a)
LightCycler® EBV Reakcijska smjesa 1b <i>LightCycler® EBV Reaction Mix 1b</i>	
LightCycler® EBV Detekcijska Smjesa 10x konc. <i>LightCycler® EBV Detection Mix 10x conc.</i>	Smjesa početnica i hibridizacijskih proba; specifične za virusni gen <i>LMP-2</i> i internu kontrolu EBV-a (IC)
LightCycler® EBV Interna Kontrola <i>LightCycler® EBV Internal Control</i>	Stabilizirana otopina specifične interne kontrole EBV-a (klonirani amplikon EBV DNA s dva mjesta za vezanje HybProbes, jedno mjesto sadrži Red 705 fluorofor); koristi se kao kontrola izolacije nukleinskih kiselina i same procedure detekcije
LightCycler® EBV DNA Standard 1	Stabilizirana otopina standarda EBV DNA ( $10^6$ kopija/5 $\mu$ l EBV DNA); služi za uspostavljanje vanjske standardne krivulje; EBV pozitivna kontrola
LightCycler® EBV DNA Standard 2	Stabilizirana otopina standarda EBV DNA ( $10^5$ kopija/5 $\mu$ l EBV DNA); služi za uspostavljanje vanjske standardne krivulje; EBV pozitivna kontrola
LightCycler® EBV DNA Standard 3	Stabilizirana otopina standarda EBV DNA ( $10^4$ kopija/5 $\mu$ l EBV DNA); služi za uspostavljanje vanjske standardne krivulje; EBV pozitivna kontrola
LightCycler® EBV DNA Standard 4	Stabilizirana otopina standarda EBV DNA ( $10^3$ kopija/5 $\mu$ l EBV DNA); služi za uspostavljanje vanjske standardne krivulje; EBV pozitivna kontrola
LightCycler® EBV DNA Standard 5	Stabilizirana otopina standarda EBV DNA ( $10^2$ kopija/5 $\mu$ l EBV DNA); služi za uspostavljanje vanjske standardne krivulje; EBV pozitivna kontrola
Voda za PCR reakciju <i>H<sub>2</sub>O, PCR-grade</i>	Voda bez nukleaza; služi za razrjeđivanje reakcijskih smjesa; EBV negativna kontrola

### 3.2.3. Komplet reagensa i otopina za PCR amplifikaciju i ugniježđeni PCR

Za PCR umnažanje željenog dijela gena *LMP-1* i njegovo pročišćavanje ugniježđenom lančanom reakcijom polimeraze korišten je komercijalni komplet „FastStart™ High Fidelity PCR System“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) čiji se sastav nalazi u Tablici 3.

Tablica 3. Sastavnice komercijalnog kompleta „FastStart™ High Fidelity PCR System“

Sastavnica	Kratak opis
FastStart Enzimatska Smjesa Visoke Vjernosti (5U/ul) <i>FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5U/ul)</i>	Smjesa FastStart Taq DNA polimeraze i termostabilnog proteina koji ima lektorirajuću ulogu (aktivacija pri temperaturi od 95°C)
FastStart Reakcijski Pufer Visoke Vjernosti s 18 mM MgCl <sub>2</sub> <i>FastStart High Fidelity Reaction Buffer, 10x conc. with 18mM MgCl<sub>2</sub></i>	10x koncentrirani FastStart reakcijski pufer s 18 mM MgCl <sub>2</sub>
FastStart Reakcijski Pufer Visoke Vjernosti bez 18 mM MgCl <sub>2</sub> <i>FastStart High Fidelity Reaction Buffer, 10x conc. without 18mM MgCl<sub>2</sub></i>	10x koncentrirani FastStart reakcijski pufer bez MgCl <sub>2</sub>
Smjesa Nukleotida za PCR reakciju <i>PCR Grade Nucleotide Mix</i>	10 mM otopina nukleotida
Otopina MgCl <sub>2</sub> , 25mM <i>MgCl<sub>2</sub> stock solution 25mM</i>	Kofaktor za DNA polimerazu
DMSO	Organsko otapalo
Voda za PCR reakciju <i>Water, PCR grade</i>	Dvostruko destilirana, deionizirana i autoklavirana voda

### 3.2.4. Komplet reagensa i otopina za reakciju sekvenciranja

Za provedbu reakcije sekvenciranja željenog dijela gena *LMP-1* korišten je komercijalni komplet „BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Warrington, UK) čiji je sastav prikazan u Tablici 4.

Tablica 4. Sastavne komponente komercijalnog kompleta „BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“

Sastavnica	Kratki opis
BigDye™ Terminator v3.1. Reakcijska Smjesa <i>BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix</i>	Reakcijska smjesa za Sangerovu dideoksi metodu sekvenciranja koja sadrži fluorescentno označene ddNTP-ove i AmpliTaq® DNA polimerazu
5x pufer za sekvenciranje BigDye™ Terminator v3.1. <i>BigDye™ Terminator 5x Sequencing Buffer v3.1</i>	Specifično optimiziran pufer za korištenje uz reakcijsku smjesu BigDye™ Terminator v3.1.

- Matriks za razdvajanje DNA fragmenata pri kapilarnoj elektroforezi – „POP-7™ polymer“ (Applied Biosystems, Warrington, UK)

- Pufer za kapilarnu elektroforezu – „310 and 31xx Running Buffer, 10x“ (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- Kapilare za elektroforezu od 36 cm - „3130/3100-Avant Genetic Analyzer 4-Capillary Array, 36 cm“ (Applied Biosystems, Warrington, UK)

### 3.2.5. Komplet reagensa i otopina za reakciju pročišćavanja i denaturacije amplikona

- Etilni alkohol za otapanje DNA - 99%-tni i 70%-tni etanol (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Sol za precipitaciju DNA - natrijev acetat, pH = 5,2 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Reagens za otapanje taloga i denaturaciju – „Hi-Di™ Formamide“ (Applied Biosystems, Warrington, UK)

### 3.2.6. Uređaji, računalni programi i dodatni potrošni materijal

Uređaji, računalni programi i dodatan materijal korišteni u izradi ovog rada priloženi su u Tablici 5. i Tablici 6.

Tablica 5. Popis uređaja i računalnih programa

Uređaj/Računalni program	Proizvođač
Vrtložna miješalica Agitateur Top-Mix 1118	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD
Ultracentrifuga SIGMA 3K30	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka
PCR uređaj LightCycler® 2.0 Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka
Centrifuga 5430	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Centrifuga LC Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka
Uspravna ledenica LA 60 390.BV	Končar, Zagreb, Hrvatska
Termokružni Amplifikator GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Warrington, UK
Sekvencer ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Warrington, UK
Vector NTI Software	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis	Institute for Genomics and Evolutionary Medicine, PA, SAD
CLC Sequence Viewer	Qiagen, Hilden, Njemačka
SPSS.22 Statistics	IBM, New York, USA

Tablica 6. Popis potrošnog materijala

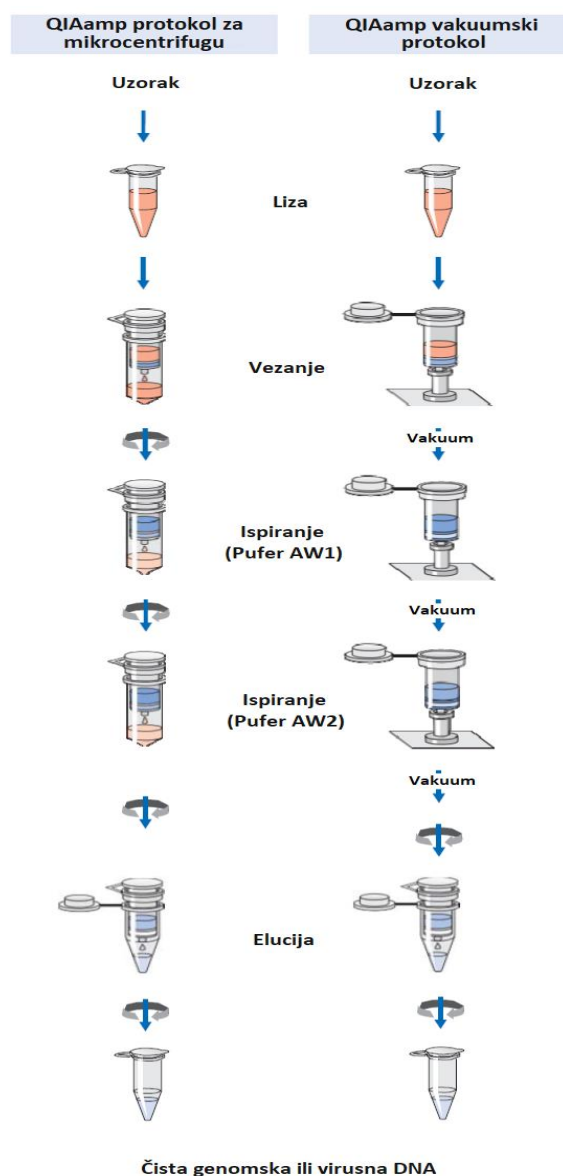
Potrošni materijal	Proizvođač
Papirnati ručnici (staničevina)	Medicpro, Čakovec, Hrvatska
Gumeni pokrovi za pločice od 96 jažica	Applied Biosystems, Warrington, UK
Eppendorf epruvete	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Epruvete Vacutainer	Becton Dickinson, New Jersey, SAD
Mikroepuvete (1,5ml i 2ml)	Sarsted, Numbrecht, Njemačka
MicroAmp® epruvete (0,2 ml) i čepovi	Applied Biosystems, Warrington, UK
Mikropipete	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Finntip™ mikropipete	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD
Nastavci za pipete	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Finntip™ nastavci za pipete	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD

### 3.3. Izolacija DNA iz periferne krvi

Kompletna DNA izolirana je iz uzoraka periferne krvi ispitanika korištenjem komercijalnog kompleta za izolaciju DNA iz krvi i tjelesnih tekućina „QIAamp DNA Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden, Njemačka). Komplet je korišten prema QIAamp protokolu za mikrocentrifugu za izolaciju DNA iz pune krvi. Kod ove metode izolacije DNA se veže unutar QIAamp kolone za membranu od silika-gela, a nečistoće se ispiru pomoću setova pufera za ispiranje (Slika 11.).

Na dno mikrocentrifugalne epruvete od 1,5 ml dodano je 20 µl proteaze K, 200 µl uzorka krvi i naposljetku, 200 µl pufera AL za lizu stanica. Dobivena smjesa je potom promiješana 15 sekundi na vrtložnoj miješalici Agitateur Top-Mix 1118 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD) kako bi enzimska razgradnja bila učinkovita, odnosno da bi se pufer i uzorak temeljito promiješali i time dobila homogena otopina. Otopina je inkubirana 10 minuta na 56 °C i odmah potom kratko centrifugirana na ultracentrifugi SIGMA 3K30 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) kako bi se uklonile kapljice s unutrašnjosti poklopca mikrocentrifugalne epruvete. Zatim je dodano 200 µl 96%-tnog etanola, uzorak je ponovno izmiješan na vrtložnoj miješalici 15 sekundi i kratko centrifugiran. QIAamp Mini Spin kolona, koja sadrži membranu od silika-gela koja veže negativnu DNA, postavljena je u kolekcijsku epruvetu od 2 ml. U nju je pažljivo dodan ukupan volumen uzorka od 620 µl i centrifugiran 1 minutu na 8000 rpm-a. Kolona je nakon svakog centrifugiranja prebačena u novu kolekcijsku epruvetu. Dodano je 500 µl pufera AW1 za ispiranje i ponovljeno je centrifugiranje. Sljedeći

je dodan pufer AW2 za ispiranje i uzorak je 3 minute centrifugiran pri punoj brzini od 14 500 rpm-a. Kako pufer AW2 sadrži etanol koji može inhibirati djelovanje polimeraze, pa tako i same PCR metode, potrebno je ukloniti njegove ostatke centrifugiranjem uzorka na 14 500 rpm-a 1 minutu. Sljedeći korak je otpuštanje DNA s kolone stoga je dodano 200  $\mu$ l pufera AE za eluciju DNA u kolonu, prethodno prebačenu u epruvetu Eppendorf. Nakon jednominutne inkubacije na sobnoj temperaturi, uzorak je centrifugiran 1 minutu na 8000 rpm-a. Dobiveni izolat je pohranjen na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnje upotrebe.



Slika 11. Shematski prikaz postupka izolacije DNA pomoću QIAamp protokola (Prilagođeno prema slici preuzetoj s internetske stranice proizvođača: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>)

### 3.4. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (RT-PCR)

Viremija, odnosno broj kopija DNA virusa Epstein-Barr u jednom mililitru periferne krvi ispitanika, određen je korištenjem komercijalnog testa „LightCycler® EBV Quantification Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka). Test je razvijen za amplifikaciju nukleinskih kiselina lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (real-time PCR, engl. *real-time polymerase chain reaction*) na PCR uređaju u kombinaciji s mikrovolumnim fluorimetrom LightCycler® 2.0 Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka), kao i s pripadajućim staklenim kapilarama „LightCycler® Capillaries“ od 20 µl. Detekcija amplikona se vrši metodom fluorescentnog rezonantnog prijenosa elektrona (FRET) pomoću specifičnog para hibridizacijskih proba od kojih je jedna proba obilježena na 5'-kraju „LightCycler® Red 640“ fluoroforom, a druga na 3'-kraju fluoresceinom. Nakon hibridizacije s DNA kalupom te dvije probe dolaze u bliski kontakt što dovodi do pojave FRET-a između fluoroforma. Fluorescein, donorski fluorofor, uslijed ekscitacije svjetlosnim izvorom uređaja prenosi dio energije na akceptorski fluorofor „LightCycler® Red 640“ te je fluorescencija koju on emitira mjerena detektorom uređaja LightCycler® Instrument.

Prije same pripreme reakcijske smjese za RT-PCR dodano je 5 µL interne kontrole „LightCycler® EBV Internal Control“ (IC) u lizirani izolat DNA da bi se mogao pratiti kompletan proces detekcije virusne DNA. U metalni blok uređaja zatim su umetnute staklene kapilare, po jedna za svaki uzorak i kontrole. Prilikom njihova slaganja smije se doticati isključivo gornji prošireni dio. Potom je pripremljena „LightCycler® EBV Reaction Mix“ smjesa. Nakon kratkog centrifugiranja „LightCycler® EBV Reaction Mix“ 1a i 1b na Centrifugi 5430 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) cijeli volumen od 8 µL otopine 1a je dodan u otopinu 1b i promiješan okretanjem. Na isti način je promiješana i otopina „LightCycler® EBV Detection Mix 10x conc“. U svaku kapilaru dodano je 15 µL reakcijske smjese i 5 µL DNA kalupa (izolat DNA, LightCycler® EBV DNA Standard 1 – 5 ili EBV negativna kontrola) prema Tablici 7. Kapilare se prije zatvaranja i postavljanja u adapter oprezno protresu da bi se tekućina spustila u užu dio kapilare. Adapter je centrifugiran 5 sekundi na 700 x g u centrifugi „LC Carousel Centrifuge“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka). Uzorci su postavljeni u „karusel“ uređaja LightCycler®, a amplifikacijski uvjeti reakcije optimizirani prema Tablici 8. Tijekom same reakcije još je postavljen i parametar fluorescencije na Fluorescencijski kanal 1/2.

Tablica 7. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu

Komponente reakcijske smjese	Količina (µL)
10x koncentrirana reakcijska smjesa LightCycler® EBV <i>LightCycler® EBV Reaction Mix, 10x conc.</i>	2
10x koncentrirana detekcijska smjesa LightCycler® EBV <i>LightCycler® EBV Detection Mix 10x conc.</i>	2
H <sub>2</sub> O, za PCR reakciju	11
Konačni volumen reakcijske smjese	15
DNA kalup	5
Ukupno	20

Umnoženi produkti PCR-a detektirani su mjerenjem emitirane fluorescencije nastale uslijed FRET-a na uređaju LightCycler®. Set definiranih EBV DNA standarda raspona od 10<sup>2</sup> do 10<sup>6</sup> kopija/reakciji (Tablica 2.) korišten je za izradu automatizirane standardne krivulje koja omogućava apsolutnu kvantifikaciju DNA EBV u uzorcima. Dobiveni rezultati krivulje topljivosti, odnosno automatski izračunate vrijednosti temperature taljenja za EBV ampikone iznose 62°C ± 2°C. Također, softver uređaja prema kalibracijskoj krivulji automatski određuje i visinu virusnog titra. Broj kopija DNA EBV izražen je u IU/ml sukladno međunarodnom standardu (NIBSC code 09/260). Test ima kvantifikacijski raspon od 10<sup>2</sup> - 10<sup>10</sup> geq/ml.

Tablica 8. Uvjeti odvijanja reakcija RT-PCR-a na uređaju LightCycler®

Program	Denaturacija	PCR amplifikacija			Krivulja topljivosti			Hladenje
Ciklusi	1	45			1			1
Model analize	-	Kvantifikacija			Krivulje topljivosti			-
Temp. odrednica	Segment 1	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 1
Temperatura (°C)	95	95	55	72	95	40	80	40
Inkubacija (mm:ss)	10:00	10:00	15:00	15:00	0:00	1:00	0:00	0:30
Omjer temp. tranzicije (°C/s)	20	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	0.1	20
Akvizijski model	-	-	Jednost-ruki	-	-	-	Kontinuirani	-

### 3.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR) i ugniježdeni PCR

Odabrani dio gena *LMP-1* umnožen je iz izolata DNA metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Da bi se postigla što veća specifičnost umnoženog dijela DNA, za amplifikaciju je korišten specifičan par vanjskih početnica koje se vežu za karboksi-terminalni kraj gena *LMP-1*, prvi put opisane u Li i sur. (2009) (Tablica 9.). Set početnica je dizajniran tako da se bočno veže uz karakterističnu deleciju od 30 pb, koja je pronađena kod nekih podtipova gena *LMP-1*. Za reakciju umnažanja korišten je komercijalni komplet FastStart™ High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, SAD).

Tablica 9. Specifičan par početnica za PCR amplifikaciju C-terminalnog kraja gena *LMP-1*

Naziv početnice	Koordinate virusa Epstein-Barr	Sekvencija (5'-3')	Orijentacija
OF 8081	168 081–168 100	GCT AAG GCA TTC CCA GTA AA	Nizvodna
OR 8744	168 726–168 744	GAT GAA CAC CAC CAC GAT G	Uzvodna

Reakcijska smjesa za PCR umnažanje, uz korištenje vanjskog seta početnica OF 8081 i OR 8744 (Tablica 10.), pripremljena je prema Tablici 9. i stavljena u hladni blok. Potom je u smjesu dodana 50 puta razrijeđena izolirana DNA te su uzorci stavljeni u termokružni amplifikator GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Warrington, UK), dok je reakcija amplifikacije postavljena prema zadanom programu (Slika 2.). Nakon završetka reakcije amplikoni veličine oko 650 pb su pohranjeni na -20°C ili odmah korišteni za ugniježdeni PCR.

Tablica 10. Reakcijska smjesa za PCR amplifikaciju

Komponente reakcijske smjese	Volumen (µl)
Smjesa dNTP-ova (10mM)	0,5
10x reakcijski pufer s 18Mm MgCl <sub>2</sub>	2,5
Početnica OF 8081	0,3
Početnica OR 8744	0,3
Smjesa enzima „FastStart High Fidelity“ (5U/ µL)	0,25
H <sub>2</sub> O, PCR grade	20
Razrijeđeni PCR produkt	5
Ukupno	25



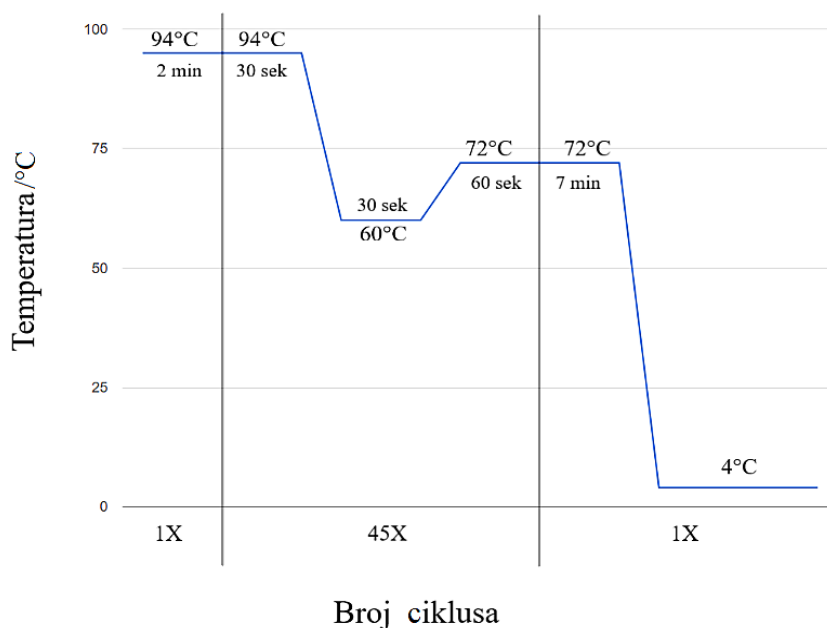
Fragменти DNA dobiveni amplifikacijom metodom PCR su pročišćeni i umnoženi metodom ugniježdene lančane reakcije polimerazom korištenjem specifičnog unutarnjeg seta početnica i komercijalnog kompleta FastStart™ High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, SAD). Unutarnje početnice IF 8213 i IR 8719 (Tablica 11.) vežu se na dio umnoženog karboksi-terminalnog dijela gena *LMP-1* te se tako ovom metodom postiže veća specifičnost amplikona. Reakcijska smjesa je pripremljena je prema Tablici 12. i stavljena u hladni blok. U smjesu je zatim dodana 50 puta razrijeđena izolirana DNA te su uzorci stavljeni u termokružni amplifikator GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Warrington, UK), dok je reakcija amplifikacije postavljena prema zadanom programu (Slika 12.). Nakon završetka reakcije amplikoni veličine oko 550 pb su pohranjeni na -20°C ili odmah korišteni za reakciju sekvenciranja.

Tablica 11. Specifičan par početnica za ugniježdenu PCR C-terminalnog kraja gena *LMP-1*

Naziv početnice	Koordinate virusa Epstein-Barr	Sekvencija (5'-3')	Orijentacija
IF 8213	169,679–169,658	CGG AAC CAG AAG AAC CCA	Nizvodna
IR 8719	168,702–168,719	TCC CGC ACC CTC AAC AAG	Uzvodna

Tablica 12. Reakcijska smjesa za ugniježdenu PCR

Komponente reakcijske smjese	Volumen (µl)
Smjesa dNTP-ova (10mM)	0,5
10x reakcijski pufer s 18Mm MgCl <sub>2</sub>	2,5
Početnica IF 8213	0,3
Početnica IR 8719	0,3
Smjesa enzima „FastStart High Fidelity“ (5U/ µL)	0,25
H <sub>2</sub> O, PCR grade	23
Razrijeđeni PCR produkt	2
<b>Ukupno</b>	<b>25</b>



Slika 12. Uvjeti PCR amplifikacije i ugniježdene lančane reakcije polimerazom (Inicijalna denaturacija - 94°C, 2 minute; Denaturacija - 94°C, 30 sekundi; Prijanjanje početnica - 60°C, 30 sekundi; Elongacija - 72°C, 60 sekundi; Završna elongacija - 72°C, 7 minuta i Hlađenje - 4°C, ∞)

### 3.6. Sekvenciranje karboksi-terminalnog kraja gena *LMP-1*

Sekvenciranjem uzoraka DNA umnoženih ugniježđenom lančanom reakcijom polimeraze određuje se slijed nukleotida karboksi-terminalnog kraja gena *LMP-1*. Korištena je Sangerova dideoksi metoda sekvenciranja koja se temelji na metodi lančane reakcije polimerazom u kojoj dolazi do terminacije komplementarnog lanca DNA ugradnjom pojedinih, različito fluorescentno obilježenih, dideoksi nukleotida.

Za reakciju sekvenciranja korišten je komercijalni komplet „BigDye™ Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Warrington, UK), čija reakcijska smjesa BigDye™ Terminator v3.1 Ready sadrži fluorescentno obilježene ddNTP-ove i AmpliTaq® DNA polimerazu. Reakcijska smjesa je pripravljena prema protokolu (Tablica 13.). U MicroAmp® epruvetu od 0,2 ml je dodano 8,4 µl reakcijske smjese i 0,6 µl početnice IF 8213 ili IR 8719. Kako bi se sekvencirala oba fragmenta DNA, nizvodni i uzvodni, za svaki su uzorak napravljene po dvije reakcijske smjese. Napoljetku se dodaje po 1 µl PCR produkta 50 puta razrijeđenoga u vodi. Uzorci su stavljeni u termokružni amplifikator GeneAmp PCR

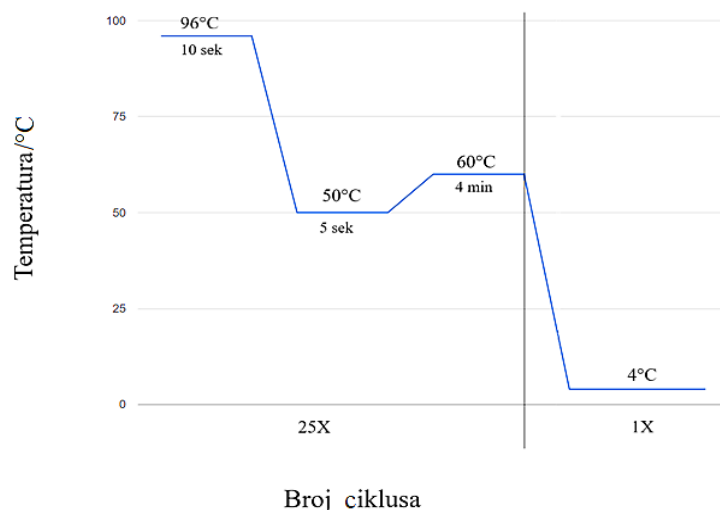
System 9700 (Applied Biosystems, Warrington, UK), a reakcija amplifikacije provedena je prema zadanom programu (Slika 13.)

Tablica 13. Reakcijska smjesa za reakciju sekvenciranja DNA

Komponente reakcijske smjese	Količina (µl)
Reakcijska smjesa BigDye™ Terminator v3.1	0,5
5x BigDye™ Terminator pufer za sekvenciranje	2
Počelnica IF 8213 ili IR 8719	0,6
H2O, za PCR reakciju	5,9
Razrijeđeni PCR produkt	1
Ukupno	10

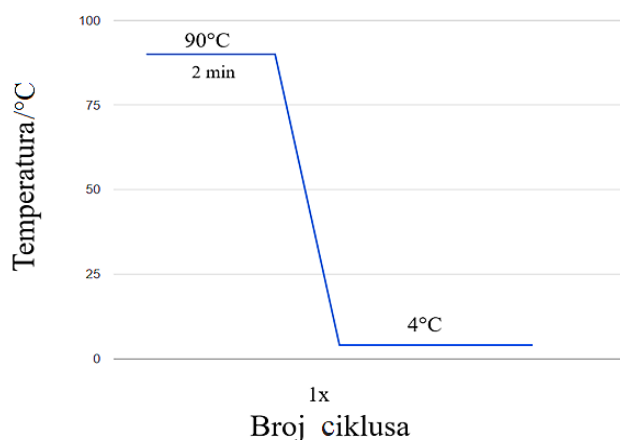
Pročišćavanje uzoraka nakon reakcije sekvenciranja napravljeno je radi uklanjanja neugrađenih fluorescentno obilježenih ddNTP-ova, dNTP-ova i početnica koji mogu dovesti do grešaka prilikom kapilarne elektroforeze uzoraka. Precipitacija je provedena pomoću smjese 100%-tnog etanola i natrijevog acetata.

U MicroAmp® epruvetu s uzorcima dodano je 52 µl smjese koja sadrži 50 µl 100%-tnog etanola i 2 µl natrijevog acetata. Poklopljeni uzorci se promiješaju okretanjem epruveta i prvotno centrifugiraju 20 min na 2 000 x g na Centrifugi 5430 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Potom se uklanjaju poklopci, epruvete se prekriju papirnatim ručnikom i preokrenute centrifugiraju 1 min na 150 x g. Zatim se u uzorke dodaje 150 µl 70%-tnog hladnog etanola, zatvore novim poklopcima, promiješaju okretanjem i centrifugiraju 5 min na 2 000 x g. Odmah nakon završetka centrifuge ponovno se uklanjaju poklopci, epruvete prekriju papirnatim ručnikom i preokrenute centrifugiraju na 150 x g u trajanju od 1 minute. Za potrebe kapilarne elektroforeze, fragmente DNA koji se nalaze u talogu nakon centrifugiranja potrebno je otopiti u 20 µl visoko deioniziranog formamida kako bi se molekula DNA održala u jednolančanom obliku. Otopina je pažljivo resuspendirana i stavljena u termokružni amplifikator GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Warrington, UK). Uzorci su denaturirani prema protokolu na Slici 14.



Slika 13. Uvjeti amplifikacije za reakciju sekvenciranja (Denaturacija - 96°C, 10 sekundi; Prijanjanje početnica - 50°C, 5 sekundi; Produljena elongacija - 60°C, 4 minute i Hlađenje - 4°C, ∞)

Kapilarna elektroforeza denaturiranih uzoraka nakon reakcije sekvenciranja provedena je na uređaju ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, UK). Za njenu provedbu korišteni su i POP-7™ Polymer Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, UK) matriks za razdvajanje DNA fragmenata, kapilara od 36 cm (3130/3100-Avant Genetic Analyzer 4-Capillary Array, 36 cm (Applied Biosystems, Warrington, UK)) i puffer 310 and 31xx Running Buffer, 10x (Applied Biosystems, Warrington, UK).



Slika 14. Uvjeti reakcije denaturacije za provedbu kapilarne elektroforeze (Denaturacija - 2 minute na 90°C i Hlađenje - 4°C, ∞)

### 3.7. Računalna i filogenetska analiza rezultata

Eksperimentalno dobivene sekvencije koje obuhvaćaju karboksi-terminalni kraj gena *LMP-1* pohranjene su u obliku ab1 i seq datoteka. No, tijekom analize rezultata korišten je samo ab1 oblik. Ukupno 41 EBV sekvencija je uređena u računalnom programu Vector NTI Software (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) tako da su najprije oba fragmenta preklapljeni u sastavljenu sekvenciju, tzv. „contig“. U svrhu postizanja što preciznije filogenetske analize rezultata, ručno su prepravljene tehničke pogreške kod kromatograma sastavljenih sekvencija, poput pogrešno očitano ili nedostajućeg signala. Također, za filogenetsko određivanje podtipova virusa EBV u programu je bilo potrebno očitati i zabilježiti polimorfizme DNA, odnosno supstitucije pojedinih dušičnih baza prema univerzalnom IUBMB kodu.

U filogenetskog analizi ili izradi rodoslovnog stabla, za provedbu usporedbe homologije sekvencija, osim 40 eksperimentalno dobivenih, korištene su i referentne sekvencije 6 glavnih podtipova gena *LMP-1*. Preuzete su iz baze podataka GenBank/EMBL/7DDBJ pod sljedećim pristupnim brojevima: Prototip B95-8 (V01555), Mediterranean + s karakterističnom delecijom od 30 pb (AY337721), Mediterranean – bez delecije od 30 pb (AY337722 i AY493810), China 1 (KC207813), Alaskan (AY337725) i North Carolina (AY337726). Sve sekvencije su poravnate korištenjem računalnog programa ClustalW Software pri čemu duljina poravnatih sekvencija iznosi 448 nukleotida. Filogenetsko je stablo konstruirano metodom najveće vjerojatnosti (ML) u računalnom programu MEGA X. Evolucijski model koji je korišten jest GTR + G model (eng. *General time reversible model*) s gama distribucijom, a statistička značajnost filogenije je procijenjena metodom samoučitanja (eng. *bootstrap*) od 1000 replika. Grafički prikaz stabla uređen je u programu MEGA X (Institute for Genomics and Evolutionary Medicine, PA, SAD). Sekvencije poravnate metodom ClustalW su uređene i pretvorene u aminokiselinski slijed za očitavanje aminokiselinskih supstitucija izolata u odnosu na prototip B95-8 u programu CLC Sequence Viewer (Qiagen, Hilden, Njemačka) Sekvencije izolata karboksi-terminalnog kraja gena *LMP-1* su pohranjene u bazi GeneBank pod sljedećim pristupnim brojevima: MK507915, MK507916, MK507917, MK507918, MK507919, MK507920, MK507921, MK507922, MK507923, MK507924, MK507925, MK507926, MK507927, MK507928, MK507929, MK507930, MK507931, MK507932, MK507933, MK507934, MK507935, MK507936, MK507937, MK507938, MK507939, MK507940, MK507941, MK507942, MK507943,

MK507944, MK507945, MK507946, MK507947, MK507948, MK507949, MK507950, MK507951, MK507952, MK507953 i MK507954.

### **3.8. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada podataka provedena je pomoću statističkog računalnog softverskog paketa „SPSS.22 Statistics“ (IBM, New York, USA). Dobiveni rezultati opisani su parametrima deskriptivne statistike: medijanom, minimalnom i maksimalnom vrijednošću te interkvartilnim rasponom. Za određivanje normalnosti distribucije pojedinih varijabli korišten je Shapiro-Wilk test. Kako sve ispitane varijable nemaju normalnu distribuciju korišteni su neparametrijski testovi. Za određivanje statističke značajnosti korelacije između omjera varijabli korišten je Spearmanov test korelacije, dok su za utvrđivanje distribucije između grupa korišteni Kruskal-Wallis i Hi-kvadrat test. U svim provedenim analizama rezultata statistički značajnom je smatrana p-vrijednost  $< 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Demografski i virološki parametri ispitanika

Rezultati analize demografskih podataka (dob i spol) i viremije (broj kopija EBV DNA po ml periferne krvi) 41 osoba oboljelih od infektivne mononukleoze uzrokovane akutnom zarazom virusom Epstein-Barr prikazani su u Tablici 14. U istraživanje je bilo uključeno 27 muškaraca (65.9% ispitanika) i 14 žena (34.1%).

Medijan dobi svih ispitanika oboljelih od infektivne mononukleoze iznosio je 22 godine (raspon 1–77, interkvartilni raspon (IQR) 38 godina). U svrhu detaljnije analize ispitanici su podijeljeni u četiri dobne skupine: djetinjstvo (ispitanici mlađi od 15 godina), adolescencija (15-24 godine), odraslu dob (25-55 godina) i stariju dob (stariji od 55 godina). Ukupno 10 ispitanika (24.4%) bilo je mlađe od 15 godina, 14 ispitanika (34.1%) pripadalo je grupi adolescenata, 10 ispitanika bilo je odrasle dobi (24.4%) dok je 7 (17.1%) ispitanika bilo starije dobi.

U istraživanje su uključeni isključivo ispitanici kod kojih je viremija bila veća od 2000 kopija EBV DNA po ml periferne krvi kako bi se osigurala što uspješnija genotipizacija virusa. Medijan EBV viremije iznosio je 27 500 kopija EBV DNA po ml (raspon 2590 - 469 000 kopija/ml, IQR 22 100 kopija/ml). Viremija manja od 10 000 kopija EBV DNA detektirana je u samo 5 (12.2%) ispitanika, dok je u 29 ispitanika (70.7%) bila u rasponu od 10 000 do 90 000 kopija EBV DNA po ml krvi. Viremija u 7 ispitanika (17.1%) bila je veća od 90 000 kopija EBV DNA po ml krvi.

Tablica 14. Demografski i virološki parametri ispitanika oboljelih od infektivne mononukleoze

Parametar	Broj ispitanika	Udio (%)
<b>Spol</b>		
Muškarci	27	65,9
Žene	14	34,1
<b>Dob (godine)</b>		
Djetinjstvo (< 15)	10	24,4
Adolescencija (15 - 24)	14	34,1
Odrasla dob (25 - 55)	10	24,4
Starija dob (> 55)	7	17,1
Medijan (minimum - maksimum)	22 (1 - 77)	
Interkvartilni raspon	38	
<b>Viremija (broj kopija EBV* DNA/ml krvi)</b>		
Niska (< 10 000)	5	12,2
Srednja	29	70,7
Visoka (> 90 000)	7	17,1
Medijan (minimum - maksimum)	27 500 (2 590 – 469 000)	
Interkvartilni raspon	22 100	
*Virus Epstein-Barr		

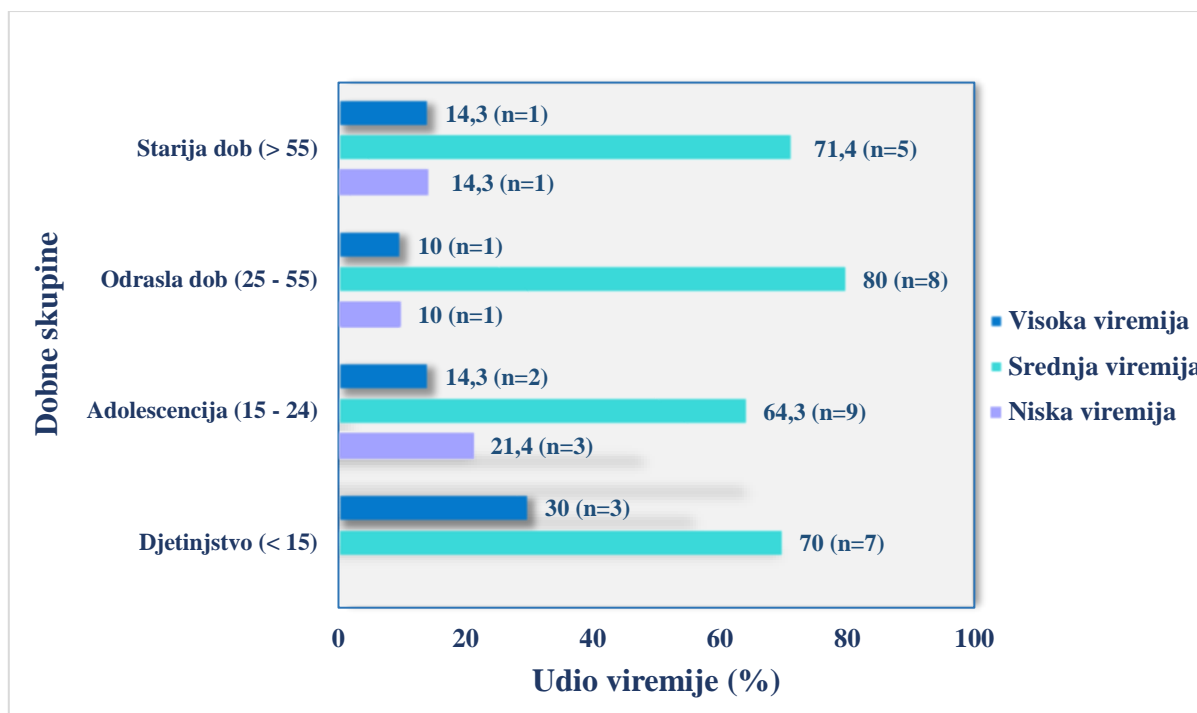
#### 4.2. Povezanost viremije sa spolom i dobi ispitanika

Dobiveni demografski i virološki parametri ispitanika su statistički obrađeni u svrhu utvrđivanja postojanja korelacije između EBV viremije ispitanika i njihovog spola ili dobi. Provedena analiza Spearmanovim testom ukazuje na nepostojanje statistički značajne korelacije između viremije i spola ispitanika ( $p$ -vrijednost = 0,871,  $\rho$  = 0,026).

Analiza postotka bolesnika s visokom, srednjom i niskom viremijom obzirom na dobne skupine ispitanika prikazana je na Slici 5. Udio bolesnika s niskom viremijom najveći je u skupini adolescenata (21.4%), dok su svi ispitanici mlađi od 15 godina imali više od 10 000 kopija EBV DNA po ml. Udio ispitanika s viremijom većom od 90 000 kopija EBV DNA po ml krvi bio je najveći upravo u skupini ispitanika mlađih od 15 godina (30%).

Korelacija viremije i dobi je pokazana statistički značajnim provedbom Spearmanovog testa ( $p$ -vrijednost = 0,034) s dobivenim Spearmanovim koeficijentom korelacije ( $\rho$  = -0,332) koji ukazuje na negativnu korelaciju između ova dva parametra.





Slika 15. Distribucija visoke (>90 000 kopija EBV DNA po ml), niske (< 10 000 kopija EBV DNA) i srednje (10 000 - 90 000 kopija EBV DNA po ml) viremije u pojedinim dobnim skupina ispitanika s infektivnom mononukleozom

### 4.3. Karakterizacija sekvencija gena *LMP-1*

Četrdeset sekvencija C-terminalnog kraja gena *LMP-1* virusa EBV (koordinata 168 726 - 168 213) analizirano je i uspoređeno sa sekvencijom prototipa B95-8. Metodama filogenetske analize konstruirano je filogenetsko stablo gena *LMP-1* te su u svrhu potpunije karakterizacije podtipova analizirane i karakteristične nukleotidne te aminokiselinske varijabilnosti sekvencija virusa EBV. Analizirane su delecije u dobivenim sekvencijama, određen je broj karakterističnih 11 aminokiselinskih (33 pb) ponavljanja, kao i aminokiselinske promjene u odnosu na sekvenciju prototipa B95-8.

#### 4.3.1. Filogenetsko stablo

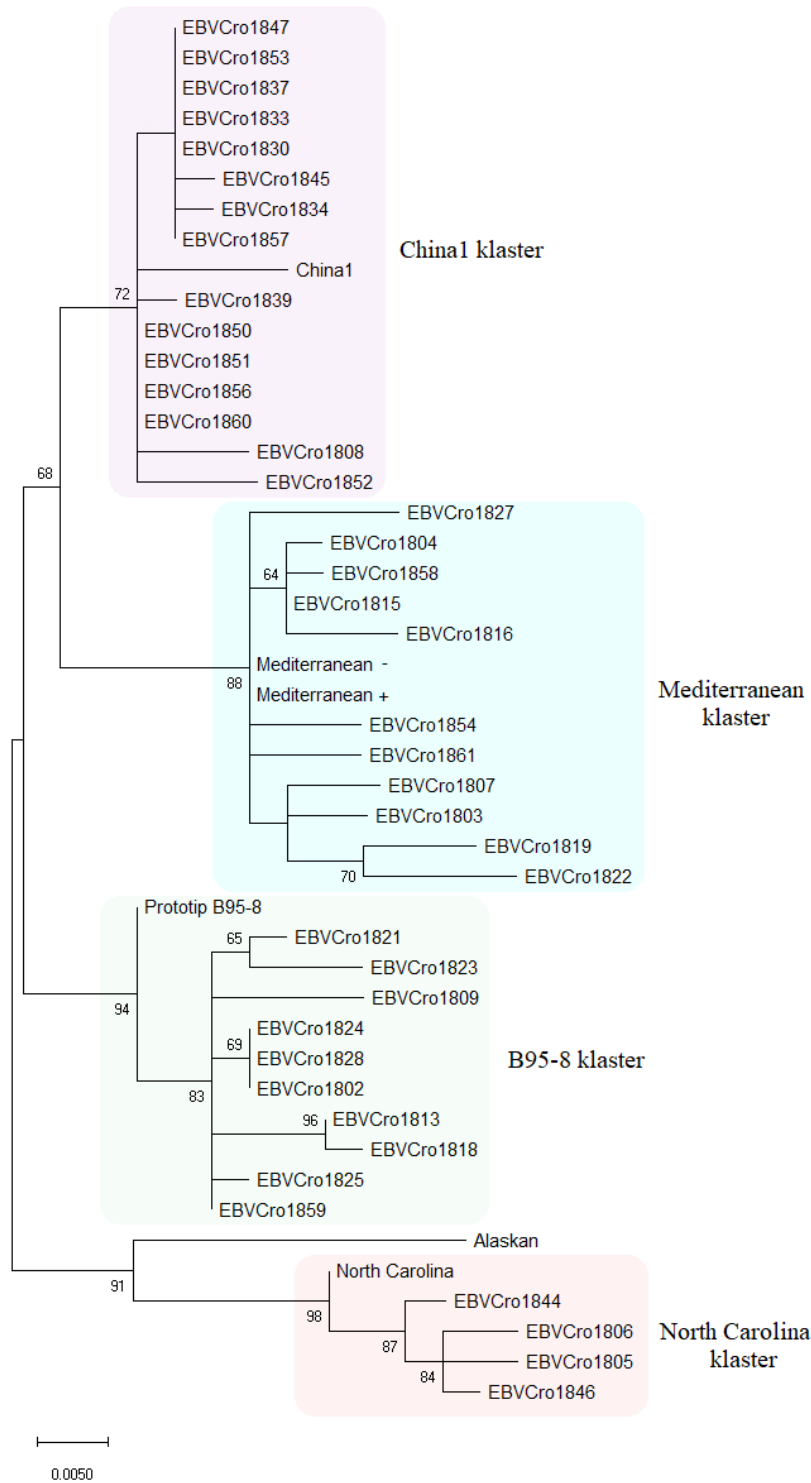
Eksperimentalno dobivene virusne sekvencije C-terminalnog kraja gena *LMP-1*, prethodno uređene u računalnom programu Vector NTI, poravnate su sa šest referentnih sekvencija identificiranih od strane Edwards i sur. (1999) metodom ClustalW. Filogenetsko

stablo je izrađeno u MEGA X softveru korištenjem metode najveće vjerojatnosti (ML) s GTR + G evolucijskim modelom i metodom samoučitanja od 1000 replika, dok je duljina grana mjerena u broju supstitucija po mjestu karaktera. U analizu molekularne raznolikosti virusa Epstein-Barr uključeno je 40 sekvencija, dok je jedna sekvencija isključena iz daljnje analize zbog toga što nije bilo moguće detektirati karakterističnu delecije na C-kraju sekvencije.

Konstruirano filogenetsko stablo gena *LMP-1* prikazano je na Slici 16. U ispitanika uključenih u ovo istraživanje, tj. u osoba oboljelih od infektivne mononukleoze iz Hrvatske detektirana su četiri od ukupno sedam prethodno opisanih *LMP-1* podtipova: China1, Mediterranean, B95-8 i North Carolina.

Većina analiziranih sekvencija pripadala je klasteru China1 podtipa (n=15, 37.5% sekvencija). Ukupno 11 (27.5%) sekvencija pripadalo je klasteru Mediterranean dok je 10 (25%) sekvencija pripadalo klasteru B95-8 podtipa. Ukupno 4 (10%) sekvencija pripadalo je klasteru North Carolina podtipa.

Analiza poravnanja pokazala je prisutnost delecija u dva Mediterranean izolata (EBVCro1861 i EBVCro1807) što ih svrstava u podgrupu Med+, pri čemu je značajno istaknuti da je u sekvenciji EBVCro1807 prisutna dulja delecija 69 pb. S obzirom na to da kod svih grana filogenetskog stabla nisu bile prisutne vrijednosti samoučitanja od minimalno 70 koje označuju 95% statističku značajnost, za filogenetsku genotipizaciju EBV bila je potrebna dodatna analiza karakterističnih delecija, tandemskog ponavljanja i supstitucija aminokiselina.



Slika 16. Filogenetsko stablo gena *LMP-1* virusa Epstein-Barr konstruirano korištenjem metode najveće vjerojatnosti (ML), evolucijskog modela „general time reversible“ s gama parametrom i metode samoučitanja od 1000 replika s prikazanim klasterima podtipova China1 (ljubičasta boja), Mediterranean (plava boja), B95-8 (zeleno boja) i North Carolina (crvena boja)

#### 4.3.2. Detekcija karakterističnih nukleotidnih delecija i ponavljanja gena *LMP-1*

Drugi korak u potvrdi određivanja podtipova gena *LMP-1* dobivenih filogenetskom analizom je analiza distribucije karakterističnih 11-aminokiselinskih (33 pb) ponavljanja i prisutnosti delecija u sekvencijama (Tablica 15).

Delecije su otkrivene u ukupno 17 (42.5%) sekvencija. Najčešće je bila prisutna delecija veličine 30 pb (u 40% sekvencija) dok je u jednoj sekvenciji detektirana i delecija veličine 69 pb. Svi izolati China1 podtipa imaju deleciju veličine 30 pb, dok su kod Mediterranean podtipa detektirana oba tipa delecija.

U većine *LMP-1* izolata (n=23, 57.5%) nije detektirana delecija na C-terminalnom kraju gena. Značajno je istaknuti da delecije nisu otkrivene u sekvencijama podtipova B95-8 i North Carolina, no da su bile prisutne u (22.5%) izolata Mediterranean podtipa.

Tablica 15. Distribucija tandemskih ponavljanja duljine 33 pb i delecija između različitih podtipova gena *LMP-1*

EBV* Podtip	Broj jedinica tandemskog ponavljanja od 33 pb		Delecija gena <i>LMP-1</i> **		Ukupno (%)
	3 - 4.5	5 - 7			
B95-8	10	-	Bez delecije	10	25
China1	2	13	Delecija 30 pb	15	37,5
Mediterranean	5	6	Bez delecije	9	22,5
			Delecija 30 pb	1	2,5
			Delecija 69 pb	1	2,5
North Carolina	3	1	Bez delecije	4	10
Ukupno	20 (50%)	20 (50%)			
p-vrijednost	0,00016				
*Virus Epstein-Barr					
**Latentni membranski protein 1					

Utvrđeno je da C-terminalni kraj gena *LMP-1* može sadržavati različiti broj jedinica tandemskog ponavljanja 11 aminokiselina između pozicija 250 i 380. S obzirom na to da prototip B95-8 virusa EBV sadrži 4.5 ponavljanja, odnosno četiri kompletna ponavljanja s insercijom pet aminokiselina na prijelazu između drugog i trećeg ponavljanja, izolati su grupirani u dvije

skupine ovisno o prisutnosti 4.5 ili manje i više od 4.5 ponavljajućih jedinica (Tablica 15). Broj sekvencija u obje skupine je identičan (n=20, 50%), no raspodjela broja jedinica tandemskog ponavljanja od 33 pb različita je s obzirom na pojedine podtipove gena LMP-1 (Hi-kvadrat test, p=0,00016). U podtipa B95-8 otkriveni su isključivo izolati s manjim brojem jedinica tandemskog ponavljanja, tj. s 4.5 ponavljajućih jedinica. Većina izolata Mediterranean (54.5%) i China1 (86.7%) podtipova pripada skupini s 5 do 7 jedinica tandemskog ponavljanja. U izolatima koji pripadaju podtipu North Carolina, 3 od 4 izolata sadrži manje od 5 jedinica tandemskog ponavljanja. Uz to, u četiri izolata (17.5%) detektirane su relativno rijetke jedinice od 7 tandemskih ponavljanja (17.5%), pri čemu su tri izolata pripadala China1 klasteru, a jedan Med klasteru.

#### 4.3.3. Određivanje aminokiselinskih promjena gena *LMP-1*

U sklopu analize trećeg kriterija određivanja pripadnosti izolata pojedinim *LMP-1* podtipovima, sekvencije izolata virusa EBV su u računalnom programu CLC Sequence Viewer pretvorene u aminokiselinske sljedove i uređene za usporedbu s prototipom B95-8 prema karakterističnim aminokiselinskim promjena *LMP-1* podtipa opisanima u Edwards i sur. (1999). Uz 7 prethodno opisanih karakterističnih promjena aminokiselinskih, u izolatima ispitanika dokazana je još 41 promijenjena aminokiselina na različitim pozicijama u odnosu na EBV prototip B95-8 što je prikazano u Tablici 16.

Svih 10 izolata filogenetski identificiranih kao podtip B95-8 sadrži svih sedam karakterističnih aminokiselina; Ser na poziciji 229; Leu na pozicijama 306 i 308; Asp na poziciji 312; Gln na pozicijama 322 i 334 te Gly na poziciji 344. No, uz njih je identificirano još 18 različitih promjena aminokiselina na 16 različitih pozicija, s tim da je jedino pozicija 328 (E→Q) detektirana kod svih izolata, a 80% izolata ima supstituciju pozicije 212 (G→S/H). Također, u ovom su istraživanju po prvi puta detektirane dvije nove supstitucije ovog podtipa, jedna u izolatu EBV Cro1813 na poziciji 267 (P→R) i druga u izolatu EBVCro1809 na poziciji 321 (P→T).

Mediterranean podtip ima najveći broj detektiranih promjena aminokiselina, njih sveukupno 31 (64.6%). Karakteristična aminokiselinska promjena za Med podtip na poziciji 229 (S→T) detektirana je kod svih 11 izolata, dok je druga na poziciji 322 (Q→E) detektirana kod 9 (81.8%) izolata. Od ostalih 29 supstitucija, samo su tri, na pozicijama 309 (S→N), 334 (Q→R) i 338 (L→S), identificirane kod svih izolata i referentnih sekvencija. Supstitucija Asp

u Gly na pozicijama kodona 255, 266, 282 i 293 predstavlja mutaciju druge aminokiseline u jedinici tandemskog ponavljanja 11 ak i detektirana je samo kod Med podtipova u različitim jedinicama ponavljanja. Od 10 izolata s Gly, samo izolat EBVCro1861 ima mutaciju u sva svoja četiri ponavljanja, a izolat EBVCro1807 s pet ponavljanja u svima, osim u prvome. Kod ostalih izolata mutacije variraju, ali su kod svih detektirane u najmanje zadnje dvije ponavljajuće jedinice. Ukupno 4 izolata imaju Gly u trećem i četvrtom ponavljanju, 3 izolata u petom i šestom, a jedan izolat u šestom i sedmom ponavljanju. Detektirane su i promjene pozicije 231 (A→S) kod izolata EBVCro1827 i pozicije 315 (G→E) kod izolata EBVCro1822 koje su po prvi puta detektirane upravo u ovom istraživanju.

Kod China1 podtipa, od karakterističnih promjena kod svih 15 izolata pronađene su supstitucije na poziciji 334 (Q→R) i delecija 30 pb, a Ser na poziciji 229 kod svih izolata osim EBVCro1808. Detektirano je i 12 novih promjena aminokiselina, od kojih su dvije pozicije 309 (S→N) i 322 (Q→N) zajedničke svim izolatima, s tim da je promjena na poziciji 322 detektirana samo u China 1 izolata. Supstitucija na poziciji 338 (L→S) detektirana je kod 13 (86,7%) izolata te su četiri promjene; 213 (H→Q), 329 (N→I), 356 (D→N) i 361 (T→R) detektirane samo u pojedinim izolatima podtipa China1.

Kod sva četiri izolata koja pripadaju North Carolina klasteru, uz dvije karakteristične promjene na pozicijama 306 (L→Q) i 322 (Q→T), detektirano je još 9 različitih supstitucija od kojih su pet podtip-specifične na pozicijama 250 (D→N), 313 (S→P), 331 (G→Q), 338 (L→P) i 352 (H→N). U izolatu EBVCro1846 dokazana je promjena na poziciji 270 (T→A), dok je kod izolata EBVCro1844 dokazana promjena na poziciji 335 (G→D). Aminokiselinska pozicija 309 (S→N) promijenjena je kod svih izolata osim u prototipa B95-8.

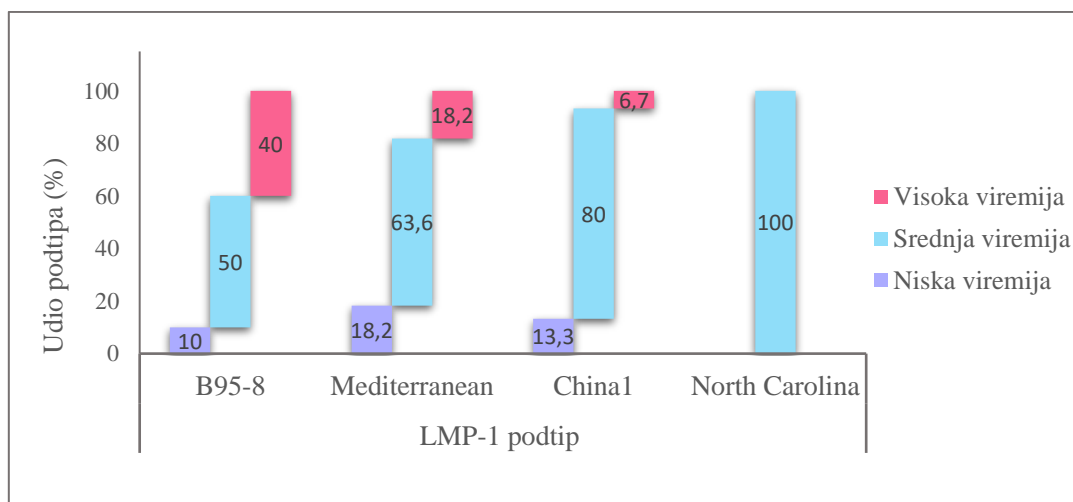
Tablica 16. Aminokiselinske promjene C-terminalnog kraja gena *LMP-1* u pojedinim podtipova virusa Epstein Barr, plavom su bojom naznačene novootkrivene pozicije aminokiselinskih promjena u izolatima ovog virusa iz Hrvatske

Pozicija AA	212	212	213	214	214	214	218	221	224	229	231	240	248	250	250
Prototip B95-8	G	G	H	E	E	E	N	E	H	S	A	Q	G	D	D
Promjena AA	S	H	Q	K	Q	G	T	D	Q	T	S	R	A	N	E
Broj sekvenciranih EBV* izolata															
B95-8	7	1	1	1									1		
China1	8		1	2	1			1		1					
Mediterranean	7					1	1	1	1	11	1	1			1
North Carolina	3														4
Pozicija AA	252	255	262	266	267	270	282	293	306	309	313	314	315	317	317
Prototip B95-8	G	D	N	D	P	T	D	D	L	S	S	A	G	D	D
Promjena AA	A	G	S	G	R	A	G	G	Q	N	P	G	E	E	N
Broj sekvenciranih EBV* izolata															
B95-8	1		1		1										
China1										15					
Mediterranean	4	1		2			5	9		11		1	1	1	1
North Carolina						1			4	4	4				
Pozicija AA	319	321	322	322	322	322	325	328	329	330	331	333	333	334	335
Prototip B95-8	G	P	Q	Q	Q	Q	E	E	N	K	G	D	D	Q	G
Promjena AA	D	T	E	T	N	D	K	Q	I	T	Q	A	G	R	D
Broj sekvenciranih EBV* izolata															
B95-8		1					1	10							
China1					15				1					15	
Mediterranean	2		9			1				1		1	2	11	
North Carolina				4							4				1
Pozicija AA	335	338	338	349	352	352	352	356	356	356	357	358	359	361	361
Prototip B95-8	G	L	L	D	H	H	H	D	D	D	P	H	L	T	T
Promjena AA	S	S	P	A	S	R	N	H	A	N	S	P	V	M	R
Broj sekvenciranih EBV* izolata															
B95-8					3			3	1		2	2	1	2	
China1		13								1					1
Mediterranean	1	11		4	1	8									
North Carolina			4				4					4			
*Virus Epstein-Barr															

#### 4.4. Povezanost pojedinih podtipova gena *LMP-1* EBV i viremije u krvi

Četrdeset izolata podtipova gena *LMP-1* određenih filogenetskom analizom i njihove viremije (broj kopija EBV DNA/ml krvi) klasificirane u tri kategorije (niska viremija < 10 000 kopija EBV DNA/ml krvi, srednja viremija u rasponu od 10 000 – 90 000 kopija EBV DNA/ml i visoka viremija > 90 000 kopija EBV DNA/ml) statistički su obrađeni u svrhu utvrđivanja povezanosti između pojedinog *LMP-1* podtipa i razine viremije ispitanika (Slika 17).

Većina ispitanika koji su, obzirom na podtip virusa, bili podjeljeni u četiri grupe (B95-8, Mediterranean, China1 i North Carolina) imala je srednju razinu viremije, posebice bolesnici s podtipom North Carolina (100% ispitanika) i China 1 (80% ispitanika). U ispitanika zaraženih podtipom B95-8, udio bolesnika s visokim vrijednostima viremije iznosio je čak 40%, dok je najveći udio bolesnika s niskom viremijom (18.2%) bio zaražen izolatima podtipa Mediterranean. U ispitanika koji su bili zaraženi podtipom B95-8, udio osoba s niskom viremijom iznosio je samo 10%. Usporedba između grupa pokazala je statistički značajne razlike u udjelu ispitanika s visokom, srednjom i niskom viremijom s obzirom na podtip virusa (Kruskal-Wallis test,  $p=0,039$ ).



Slika 17. Povezanost *LMP-1* podtipova virusa Epstein-Barr (EBV) i viremije ispitanika; Niska viremija (< 10 000 kopija EBV DNA/ml krvi), Srednja viremija (10 000 – 90 000 kopija EBV DNA/ml krvi) i Visoka viremija (> 90 000 kopija EBV DNA/ml krvi)



## 5. RASPRAVA

Virus Epstein-Barr etiološki je povezan s nastankom benignih limfoproliferativnih bolesti poput infektivne mononukleoze, ali i s nastankom različitih malignih bolesti za koje se procjenjuje da uzrokuju više od 140 000 smrti godišnje (Smatti i sur. 2017). Rezultati istraživanja o molekularnoj heterogenosti ovog virusa pokazuju da genetička varijabilnost virusa EBV kao i varijabilnost virusnih proteina koji ulaze u kompleksne interakcije s proteinima stanice pridonose različitoj virulenciji pojedinih virusnih podtipova (Neves i sur. 2015). Međutim, literaturni podatci o genetskoj varijabilnosti ovog virusa u Europi i svijetu vrlo su oskudni. Rezultati ovog istraživanja po prvi su puta dokazali prisutnost podtipova China 1, Mediterranean, B95-8 i North Carolina virusa EBV koji se temelje na sekvenciji karboksiterminalne regije gena *LMP-1*. Analizom sekvencija gena *LMP-1* dokazana je prisutnost delecija veličine 30 pb i 69 pb, kao i karakterističnih tandemskih ponavljanja veličine 33 pb. Detektirano je čak 60 aminokiselinskih promjena pojedinih *LMP-1* podtipova virusa u odnosu na EBV prototip B95-8, s tim da su otkrivene četiri nove supstitucije u izolatima Mediterranean podtipa i u B95-8 prototipu virusa. Dokazana je i povezanost kinetike virusne replikacije te EBV *LMP-1* podtipova, kao i negativna korelacija između dobi ispitanika i viremije u krvi.

Infektivna mononukleoza je benigna limfoproliferativna bolest koja se javlja kao posljedica akutne EBV infekcije i najčešća je u adolescenata i osoba rane odrasle dobi (Balfour i sur. 2015). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju prethodno opisane literature podatke o najvećoj incidenciji infektivne bolesti u upravo navedenim dobnim skupinama.

Literaturni podatci o povezanosti viremije s demografskim parametrima (dob i spol) bolesnika s infektivnom mononukleozom su heterogeni. Pri tome je potrebno uzeti u obzir da je u istraživanjima koja su pokazala povezanost viremije i spola, zastupljenost osoba muškog spola bila značajno veća u odnosu na ženski spol te rezultate treba pažljivo interpretirati (Smatti i sur. 2017, Bauer i sur. 2005). U ovom istraživanju nije dokazana povezanost spola i viremije u krvi pri čemu je potrebno istaknuti da je većina ispitanika uključena u istraživanje bila muškog spola. U istraživanjima Smatti i sur. (2017) te Bauer i sur. (2005) pokazana je značajna povezanost viremije i životne dobi ispitanika. No, dok je kod Bauer i sur. (2005) pokazana značajno viša viremija u mlađih ispitanika, kod Smatti i sur. (2017) ona je prisutnija s povećanjem dobi. Rezultati ovog istraživanja pokazuju značajnu negativnu korelaciju koja se podudara s onom Bauer i sur. (2005) pri čemu u ispitanika najmlađe životne dobi (<15 godina)

nisu bile prisutne niske viremije (definirane kao viremije < 10 000 kopija EBV DNA po ml) već, upravo suprotno, viremije > 90 000 kopija EBV DNA po ml. Pretpostavljam da je mogući razlog nepodudarnosti dijela literaturnih podataka i rezultata ovog istraživanja vrijeme uzorkovanja, tj. uzimanje biološkog uzorka za kvantifikaciju DNA virusa EBV u ranijoj fazi bolesti te ograničeno vrijeme tijekom kojeg se DNA može detektirati u perifernoj krvi (Pitetti i sur. 2003). Izostanak niskih viremija, kao i visoke viremije detektirane kod djece mlađe od 3 godine mogu se prepisati i slabijoj efektivnosti njihovog imunskog sustava naspram onoga odraslih osoba, primjerice nedostatku imunskog memorijskog stanice pDC koje ograničeno luče IFN  $\alpha/\gamma$  (Simon i sur. 2015). Usto, iznijeta je teorija da bi rana transmisija virusa EBV mogla potaknuti toleranciju virusnog antigena i posljedično ograničiti imunski odgovor (Rochford 2016).

Edwards i sur. (1999) filogenetskom su analizom EBV podtipova gena *LMP-1* pokazali da su podtipovi China1 i Mediterranean srodni s podtipovima Alaskan i North Carolina koji pripadaju istom klasteru. Rezultati ovog istraživanja u kojem je u bolesnika s infektivnom mononukleozom iz Hrvatske dokazana prisutnost četiri EBV podtipa gena *LMP-1* (China1, B95-8, Mediterranean i North Carolina) u skladu je s podacima o distribuciji podtipova ovog virusa koja je opisana u osoba oboljelih od benignih limfoproliferativnih bolesti koje su etiološki povezane sa zarazom ovim virusom iz Europe (Chang i sur. 2009). Međutim, zastupljenost pojedinih podtipova koja je opisana u radu Chang i sur. (2009) različita je u usporedbi s rezultatima ovog istraživanja. Naime, prema rezultatima Chang i sur. (2009), ukupno 42% ispitanika bila su zaražena prototipom B95-8 dok je u najčešći podtip u ispitanika iz Hrvatske bio China1. U istraživanju koje je provedeno u Srbiji (Banko i sur. 2016b) također je dokazano da je najčešći podtip *LMP-1* virusa bio China1 što ukazuje na moguću specifičnu geografsku distribuciju pojedinih podtipova virusa koja nije povezana s etiologijom bolesti.

U ispitanika iz Hrvatske detektirala sam veću zastupljenost izolata virusa bez delecija u odnosu na izolate koji su imali karakteristične delecije od 30 i 69 pb što je u skladu prethodno objavljenim istraživanjima provedenima u Europi (Banko i sur. 2016b, Correa i sur. 2004, Chang i sur. 2009). Delecija od 30 pb nastaje tijekom faze replikacije, tj. uslijed replikacijskog proklizavanja dva ponavljanja 9-nt (GGCGGCGGT) lateralno pozicioniranih u odnosu na deleciju (Banko i sur. 2016a). Dio istraživanja pokazuje da primarna zaraza izolatom virusa koji ima deleciju od 30 pb može modulirati imunski odgovor na EBV u bolesnika s IM te značajno utjecati na patogenezu bolesti u smislu razvoja malignih bolesti (posebice nazofaringealnog karcinoma) (Neves i sur. 2015, Banko i sur. 2012). Suprotno tome, rezultati

analize omjera nedeletiranih i deletiranih izolata EBV u bolesnika s nazofaringealnim karcinomom i zdravih zaraženih osoba u istraživanjima Hadhri-Guiga i sur. (2006) te Hahn i sur. (2001) osporavaju teoriju da bi ova mutacija gena *LMP-1* mogla biti prediktor kasnijeg razvoja malignih bolesti u imunokompetentnih osoba, već postavljaju hipotezu da je ovaj polimorfizam određen geografskim i etničkim čimbenicima. U ovom radu nismo mogli analizirati povezanost molekularne heterogenosti virusa (uključujući prisutnost delecija) i razvoja malignih bolesti zbog dužine vremenskog perioda od akutne infekcije do eventualnog nastanka maligne bolesti. Usprkos tome, analiza povezanosti kinetike virusne replikacije i zaraze deletiranim podtipovima virusa također je značajan čimbenik patogeneze bolesti koje su povezane s ovim virusom. Rezultati ovog rada pokazuju da delecija 30 pb nije povezana s većom kinetikom virusne replikacije jer su deletirani podtipovi najčešći u China1 podtipu koji se ne povezuje s visokim vrijednostima viremije u perifernoj krvi. Uz to, jedini tipični Med+ izolat s delecijom 30 pb ima nisku viremiju.

U ovom je radu detektirana i vrlo rijetka delecija 69 pb kod jednog Med izolata koji je dokazan u ispitanika s visokom viremijom. Delecija 69 pb najčešće je opisana u bolesnika s Burkittovim limfomom te, nešto rjeđe, u oboljelih od nazofaringealnog karcinoma (Smatti i sur. 2018). Suprotno tome, Dardari i sur. (2006) detektirali su veću učestalost izolata s navedenom delecijom u zdravih osoba s akutnom zarazom virusom EBV u odnosu na bolesnike s nazofaringealnim karcinomom. S obzirom na to da je infekcija izolatima Med podtipa povezana s visokim viremijama te da je prisutnost delecije 69 pb povezana sa smanjenom aktivnosti transkripcijskog faktora AP-1, tj. s imortalizacijom i onkogenom transformacijom stanica, smatra se da prisutnost delecije može biti jedan od prediktora za razvoj malignih bolesti (Smatti i sur. 2018, Banko i sur. 2012).

Rekombinacijska aktivnost unutar sekvencije gena *LMP-1* najznačajnija je u okviru mjesta karakterističnog tandemskog ponavljanja 33 pb. Ovaj tip ponavljanja dio je CTAR3 regije odgovorne za vezanje kinaze JAK-3 i aktivaciju JAK3/STAT signalnog puta koji nema transformacijski utjecaj na zaraženu stanicu (Banko i sur. 2016b). Analiza hrvatskih izolata pokazala je podjednaku zastupljenost niskog i visokog broja ponavljanja 33 pb pri čemu je veći broj jedinica karakterističnog tandemskog ponavljanja detektiran u deletiranih izolata u usporedbi s onima bez delecija (uključujući i izolat s delecijom 69 pb koji je imao 5 jedinica ponavljanja). Različita raspodjela broja jedinica ponavljanja s obzirom na podtipove virusa može biti posljedica intenzivne rekombinacijske aktivnosti tijekom litičke faze replikacijskog ciklusa pomoću za sada nepoznatog mehanizma kompenzacije nukleotida nakon formiranja

delecije (Banko i sur. 2016b). Pitanje povezanosti karakterističnih tandemskih ponavljanja i onkogenog potencijala virusa za sada nije u potpunosti istraženo. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su ispitanici s infektivnom mononukleozom kod kojih su dokazani izolati s čak 7 jedinica tandemskog ponavljanja pripadaju skupini ispitanika sa srednjom razinom viremije.

Karboksi-terminalna regija gena *LMP-1*, pogotovo na dijelu između aminokiselinskih pozicija 322 i 366, opisana je kao mutacijsko mjesto koje sadrži mnogo nukleotidnih supstitucija neovisno nastalih tijekom evolucije EBV varijanti (Banko i sur. 2016a). Osim 7 karakteristično opisanih aminokiselinskih promjena, u ovom su istraživanju dokazane i druge najčešće mutacije koje su prethodno opisane u literaturi (pozicije 212, 309, 338 i 322) s različitom prevalencijom. U ovom su istraživanju detektirane i mutacije koje su rjeđe zastupljene (pozicije 352, 334, 328 i 293), dok je u manje od 20% izolata promijenjeno dodatnih 30 pozicija. Ako se uzme u obzir potencijalna značajnost fosforilacije Ser na pozicijama 309, 311, 313 i Thr na poziciji 324 u modulaciji funkcije i sazrijevanju proteina LMP-1 (Banko i sur. 2012), China1 i Med izolati s mutiranim aminokiselinskim pozicijama 309 i 313 izgubili su navedene modifikacije. Potrebno je istaknuti da više od 90% Med izolata ima promjenu na aminokiselinskoj poziciji 322 iz neutralnog Gln u negativno nabijene Asp i Glu što bi također moglo utjecati na interakciju s navedenim fosforilacijskim mjestima. Promjene u interakcijama s mjestima fosforilacije mogle bi interferirati s LMP-1 signalizacijom upravo zbog specifične pozicije unutar JAK-3-vezujućeg BOX2 u CTAR-3 domeni koji direktno utječe na fosforilacijsku aktivaciju STAT1 (Dardari i sur. 2006). U svih Med i većine China1 izolata detektirana je i supstitucija L→S (338) za koju se pretpostavlja da bi mogla biti alternativno mjesto fosforilacije (Banko i sur. 2012).

Promjene u slijedu aminokiselina koje su karakteristične za pojedine podtipove virusa EBV relativno su rijetke. U ovom su istraživanju kod svih podtipova North Carolina detektirane promjene aminokiselina na pozicijama 250, 331 i 338 koje su po prvi puta opisane u radu Banko i sur. (2012) i za koje se smatra da bi se mogle primijeniti kao dodatni karakteristični markeri podtipa North Carolina.

Izolat EBVCro1807 s delecijom 69 pb jedini je izolat u ovom istraživanju kod kojeg je dokazana supstitucija D → E na poziciji 317. Banko i sur. (2012) su u izolatima s delecijom 69 pb također detektirali ovu mutaciju kao i Gly na poziciji 212 koji je tipičan za prototip B95-8 i rijedak kod Med podtipa. Stoga je postavljena hipoteza prema kojoj ove karakteristične

promjene slijeda aminokiselina mogu poslužiti kao markeri za detekciju varijanti s delecijom 69 pb.

U ovom su radu po prvi puta opisane četiri nove promjene aminokiselina ovog virusa u podtipovima B95-8 i Med te je moguće da se radi o polimorfizmu koji je geografski određen što je potrebno potvrditi dodatnim istraživanjima.

Rezultati ovog rada ukazuju na povezanost kinetike virusne replikacije (tj. viremije) i podtipa virusa EBV. Zaraza prototipom B95-8 najčešće je povezana s visokim vrijednostima viremije nakon čega slijedi Med podtip. Visoka kinetika virusne replikacije, tj. veliki broj kopija DNA virusa EBV u krvi u bolesnika ova dva podtipa mogla bi biti posljedica povećane aktivnosti EBV polimeraze. Iako ova polimeraza ima verifikacijsku aktivnost, detekcija brojnih aminokiselinskih supstitucija kod ovih podtipova pridonosi pretpostavki kako je došlo do visoke razine kontinuirane viralne replikacije spregnute s unutrašnjim selektivnim pritiskom kod pacijenata, primjerice imunskim odgovorom domaćina, virusnim tropizmom ili replikacijskom sposobnošću virusa (Renzette i sur. 2014).

Brojna molekularna i filogenetska istraživanja polimorfizama gena *LMP-1* ovog virusa još uvijek nisu odgovorila na neka ključna pitanja o ulozi pojedinih mutacija u patogenezi bolesti etiološki povezanih s virusom EBV, to jest o njihovom prediktivnom značaju. Literaturni podatci o molekularnoj raznolikosti virusa EBV u Europi su oskudni, a većina istraživanja provedena je na malim uzorcima što otežava interpretaciju rezultata i donošenje zaključaka o biološkoj značajnosti pojedinih mutacija, odnosno o pojedinim geografsko-etničkim specifičnostima distribucije genetskih varijanti ovog virusa. Rezultati ovog rada prvo su istraživanje mutacija gena *LMP-1* virusa EBV u Hrvatskoj i donosi prve dostupne rezultate o molekularnoj raznolikosti ovog virusa u bolesnika s infektivnom mononukleozom. Međutim, potrebno je provesti i dodatna istraživanja o rasprostranjenosti *LMP-1* podtipova i specifičnih promjena kod hrvatskih izolata u istraživanjima u kojima će biti uključen veći broj ispitanika uz izjednačavanje prisutnosti oba spola te je potrebno usporediti polimorfizme u bolesnika s infektivnom mononukleozom i bolesnika oboljelih od malignih bolesti koje su etiološki povezane s ovim virusom.

Zaključujem da su rezultati ovog rada, po prvi puta, pokazali prisutnost podtipova China 1, Mediterranean, B95-8 i North Carolina virusa EBV koji se temelje na sekvenciji karboksiterminalne regije gena *LMP-1* u bolesnika s infektivnom mononukleozom iz Hrvatske.

## 6. ZAKLJUČAK

- Filogenetskom analizom sekvencija dobivenih analizom karboksi-terminalne regije gena *LMP-1* virusa Epstein-Barr Sangerovom metodom dokazana je prisutnost četiriju glavnih *LMP-1* podtipova: China1, Mediterranean, B95-8 i North Carolina.
- China 1 najčešći je virusni podtip određen sekvenciranjem gena *LMP-1* u osoba oboljelih od infektivne mononukleoze iz Hrvatske.
- Analiza karakterističnih delecija C-kraja gena *LMP-1* pokazala je prisutnost izolata s dva tipa delecija, veličine 30 pb te 69 pb.
- Analizom karakterističnog tandemskog ponavljanja 33 pb gena *LMP-1* utvrđena je podjednaka zastupljenost višeg i nižeg broja jedinica ponavljanja.
- Distribucija broja jedinica tandemskog ponavljanja ovisi o podtipu virusa, a visok broj jedinica najčešće je bio detektiran u podtipova China1 i Mediterranean.
- Detektirano je 60 različitih aminokiselinskih promjena pojedinih *LMP-1* podtipova u odnosu na prototip B95-8.
- Otkrivene su četiri nove supstitucije virusa EBV na pozicijama 231 (A→S) i 315 (G→E) kod Mediterranean podtipa te 267 (P→R) i 321 (P→T) kod B95-8 podtipa.
- Nije utvrđena povezanost između spola osoba oboljelih od infektivne mononukleoze i viremije u perifernoj krvi.
- Utvrđena je povezanost smanjenja viremije u perifernoj krvi s porastom dobi osoba oboljelih od infektivne mononukleoze.
- Detektirana je povezanost prisutnosti pojedinih podtipova gena *LMP-1* i EBV viremije.
- U ispitanika zaraženih podtipom B95-8 detektirane su veće viremije u perifernoj krvi u usporedbi s ispitanicima zaraženim drugim podtipovima virusa EBV.

## 7. REFERENCE

- Ajawatanawong P. (2016): Molecular Phylogenetics: Concepts for a Newcomer. *Adv BiochemEng Biotechnol* **160**: 185–196.
- Balfour H.H., Dunmire S.K., Hogquist K.A. (2015): Infectious mononucleosis. *Clin Transl Immunol* **4**: e33.
- Banko A.V., Lazarevic I.B., Folic M.M., Djukic V.B., Cirkovic A.M., Karalic D.Z., *i sur* (2016): Characterization of the variability of Epstein-Barr virus genes in nasopharyngeal biopsies: Potential predictors for carcinoma progression. *PLoS One* **11**: 1–16.
- Banko A, Lazarevic I, Stevanovic G, Cirkovic A, Karalic D, Cupic M, *i sur*. (2016): Analysis of the variability of Epstein-Barr virus genes in infectious mononucleosis: Investigation of the potential correlation with biochemical parameters of hepatic involvement. *J Med Biochem* **35**: 337–346.
- Banko A., Lazarevic I., Cupic M., Stevanovic G., Boricic I., Jovanovic T. (2012): Carboxy-terminal sequence variation of LMP1 gene in Epstein-Barr-virus-associated mononucleosis and tumors from Serbian patients. *J Med Virol* **84**: 632–642.
- Bauer C.C., Aberle S.W., Popow-Kraupp T., Kapitan M., Hofmann H., Puchhammer-Stöckl E. (2005): Serum epstein-barr virus DNA load in primary epstein-barr virus infection. *J Med Virol* **75**: 54–58.
- Beader N., Kolarić B., Slačanac D., Tabain I., Vilibić-Čavlek T. (2018): Seroepidemiological study of Epstein-Barr virus in different population groups in Croatia. *Isr Med Assoc J* **20**: 86–90.
- Centers for Disease Control and Prevention (2019): Epstein-Barr virus and infectious mononucleosis, laboratory testing. (pristupljeno 6.1.2019) Dostupno na: [www.cdc.gov/epstein-barr/laboratory-testing.html](http://www.cdc.gov/epstein-barr/laboratory-testing.html).
- Chang C.M., Yu K.J., Mbulaiteye S.M., Hildesheim A., Bhatia K. (2009): The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res* **143**: 209–21.

- Chijioke O., Azzi T., Nadal D., Münz C. (2013): Innate immune responses against Epstein Barr virus infection. *J Leukoc Biol* **94**: 1185–1190.
- Choi S.J., Jung S.W., Huh S., Cho H., Kang H. (2018): Phylogenetic comparison of Epstein-Barr virus genomes. *J Microbiol* **56**: 525–533.
- Cohen J.I. (2015): Epstein–barr virus vaccines. *Clin Transl Immunol* **4**: e32.
- Correa R.M., Fellner M.D., Alonio L.V., Durand K., Teyssié A.R., Picconi M.A. (2004): Epstein-barr virus (EBV) in healthy carriers: Distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene. *J Med Virol* **73**: 583–588.
- Correia S., Palser A., Elgueta Karstegl C., Middeldorp J.M., Ramayanti O., Cohen J.I. *i sur.* (2017): Natural Variation of Epstein-Barr Virus Genes, Proteins, and Primary MicroRNA. *J Virol* **91**: e00375-17.
- Dardari R., Khyatti M., Cordeiro P., Odda M., ElGueddari B., Hassar M. *i sur.* (2006): High frequency of latent membrane protein-1 30-bp deletion variant with specific single mutations in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma in Moroccan patients. *Int J Cancer* **118**: 1977–1983.
- Draborg A.H., Duus K., Houen G. (2012): Epstein-Barr Virus and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Dev Immunol* **2012**: 1–10.
- Dunmire S.K., Hogquist K.A., Balfour H.H. (2015): Infectious Mononucleosis. *Curr Top Microbiol Immunol* **390**: 211–240.
- Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. (1999). Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology* **261**: 79–95.
- El-Sharkawy A., Zaidan L. Al., Malki A. (2018): Epstein–Barr Virus-Associated Malignancies: Roles of Viral Oncoproteins in Carcinogenesis. *Front Oncol* **8**: 1–13.
- Epstein M.A., Achong B.G., Barr Y.M. (1964): Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitt’s lymphoma. *Lancet (London, England)* **1**: 702–3.
- Germi R., Effantin G., Grossi L., Ruigrok R.W.H., Morand P., Schoehn G. (2012): Three-dimensional structure of the Epstein-Barr virus capsid. *J Gen Virol* **93**: 1769–1773.



- Hadhri-Guiga B., Khabir A-M., Mokdad-Gargouri R., Ghorbel A-M., Drira M., Daoud J., i sur (2006): Various 30 and 69 bp deletion variants of the Epstein-Barr virus LMP1 may arise by homologous recombination in nasopharyngeal carcinoma of Tunisian patients. *Virus Res* **115**: 24–30.
- Hahn P., Novikova E., Scherback L., Janik C., Pavlish O., Arkhipov V. i sur. (2001): The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int J cancer* **91**: 815–21.
- Hammerschmidt W., Sugden B. (2013): Replication of Epstein – Barr Viral DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a013029.
- Henle W., Diehl V., Kohn G., Hausen H.Z., Henle G. (1967): Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* **157**: 1064–5.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2012): Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans* **100**: 1–441.
- International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV (2019): ICTV Taxonomy history: Human gammaherpesvirus 4. (pristupljeno 5.1.2019) Dostupno na: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=20171486](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20171486)
- Jochum S., Moosmann A., Lang S., Hammerschmidt W., Zeidler R. (2012): The EBV Immuno-evasins vIL-10 and BNLF2a Protect Newly Infected B Cells from Immune Recognition and Elimination. *PLoS Pathog* **8**: e1002704.
- Johannsen E.C., Kaye K.M. (2017): Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, Eighth edition. U: Bennett, J.E., Dolin, R. i Blaser, M.J. (ur.) Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, Epstein-Barr virus-associated malignant diseases, and other diseases. New York, Elsevier Saunders, str. 1754-1771
- Kang M.-S., Kieff E. (2015): Epstein–Barr virus latent genes. *Exp Mol Med* **47**: e131.
- Kwok H., Chiang A.K.S. (2016): From conventional to next generation sequencing of Epstein-Barr virus genomes. *Viruses* **8**: 60.

- Lennon P., Crotty M., Fenton J.E. (2015): Infectious mononucleosis. *BMJ* **350**: h1825–h1825.
- Li D.J., Bei J.X., Mai S.J., Xu J.F., Chen L.Z., Zhang R.H. *i sur.* (2009): The dominance of China 1 in the spectrum of Epstein-Barr virus strains from Cantonese patients with nasopharyngeal carcinoma. *J Med Virol* **81**: 1253–60.
- Lieberman P.M. (2014): Epstein-Barr Virus Turns 50. *Science* **343**: 1323–1325.
- Lünemann A., Rowe M., Nadal D. (2015): Innate Immune Recognition of EBV. *Curr Top Microbiol Immunol* **391**: 265–87.
- Mui U.N., Haley C., Tyring S.K. (2017): Viral Oncology: Molecular Biology and Pathogenesis. *J Clin Med* **6**: 111.
- Münz C. (2015): Epstein Barr virus volume 1 : one herpes virus: many diseases, First edition. U: Vogt, P.K. (ur.) Virus genetics and epigenetics. Basel, Springer International Publishing Switzerland, str. 45-90
- Neves M., Marinho-Dias J., Ribeiro J., Esteves M., Maltez E., Baldaque I. *i sur.* (2015): Characterization of Epstein-Barr virus strains and LMP1-deletion variants in Portugal. *J Med Virol* **87**: 1382–1388.
- Odumade O.A., Hogquist K.A., Balfour H.H. (2011): Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev* **24**: 193–209.
- Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Ba abdullah M.M. *i sur.* (2015): Genome Diversity of Epstein-Barr Virus from Multiple Tumor Types and Normal Infection. *J Virol* **89**: 5222–5237.
- Pevsner J. (2015): Bioinformatics and functional genomics, Third edition. U: Wiley-Blackwell (ur.) Molecular phylogeny and Evolution. Chichester, John Wiley & Sons Inc., str. 245-299
- Pitetti R.D., Laus S., Wadowsky R.M. (2003): Clinical evaluation of a quantitative real time polymerase chain reaction assay for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection in children. *Pediatr Infect Dis J* **22**: 736–9.
- Podsiadło L., Polz-Dacewicz M. (2013): Molecular evolution and phylogenetic implications in clinical research. *Ann Agric Environ Med* **20**: 455–459.

- Pope J.H. (1967): Establishment of Cell Lines from Peripheral Leucocytes in Infectious Mononucleosis. *Nature* **216**: 810–811.
- Rafailidis P.I., Mavros M.N., Kapaskelis A., Falagas M.E. (2010): Antiviral treatment for severe EBV infections in apparently immunocompetent patients. *J Clin Virol* **49**: 151–157.
- Renzette N., Somasundaran M., Brewster F., Coderre J., Weiss E.R., McManus M. *i sur.* (2014): Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 genetic variability in peripheral blood B cells and oropharyngeal fluids. *J Virol* **88**: 3744–55.
- Rochford R. (2016): Epstein-Barr virus infection of infants: implications of early age of infection on viral control and risk for Burkitt lymphoma. *Bol Med Hosp Infant Mex* **73**: 41-46
- Simon K., Hollander G.A., McMichael A. (2015): Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc R Soc B* **282**: 20143085
- Smatti M.K., Yassine H.M., AbuOdeh R., Almarawani A., Taleb S.A., Althani A.A., Nasrallah G.K. (2017): Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. *PLoS ONE* **12**: e0189033.
- Smatti M.K., Al-Sadeq D.W., Ali N.H., Pintus G., Abou-Saleh H., Nasrallah G.K. (2018): Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front Oncol* **8**: 211.
- Trottier H., Buteau C., Robitaille N., Duval M., Tucci M., Lacroix J. *i sur.* (2012): Transfusion-related Epstein-Barr virus infection among stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study in children. *Transfusion* **52**: 2653–63.
- Tzellos S., Farrell P. (2012): Epstein-Barr Virus Sequence Variation - Biology and Disease. *Pathogens* **1**: 156–174.
- Vince A. (2019): Klinička infektologija, Prvo izdanje. U: Begovac, J. *i sur.* (ur.) Virus Epstein-Barr, Zagreb, Medicinska naklada, str. 470-479.
- Vouloumanou E.K., Rafailidis P.I., Falagas M.E. (2012): Current diagnosis and management of infectious mononucleosis. *Curr Opin Hematol* **19**: 14–20.

- Xiong J. (2006): Essential Bioinformatics. U: Halliday, K. (ur.) Molecular phylogenetics. Cambridge, Cambridge University Press, str. 127-169
- Yang Z., Rannala B. (2012): Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet* **13**: 303–314.
- Židovec Lepej S., Markotić A., Begovac J. (2019): Klinička infektologija, Prvo izdanje. U: Begovac, J. i sur. (ur.) Patogeneza infektivnih bolesti. Zagreb, Medicinska naklada, str. 6-32

## 8. ŽIVOTOPIS

### **Osobni podaci:**

Ime i prezime            Margarita Batović

### **Obrazovanje:**

2016. – danas            **Diplomski studij Molekularne biologije**  
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

2013. - 2016.            **Preddiplomski studij Molekularne biologije**  
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

2009. - 2013.            Gimnazija Jurja Barakovića Zadar

### **Stručno iskustvo:**

9/2014.                    Studentska praksa u Službi za zdravstvenu ekologiju Zavoda za javno  
zdravstvo u Zadru

### **Radno iskustvo:**

7/2014. – 8/2014.      Akviziterski i prevoditeljski poslovi u Amica Trgovini d.o.o.

### **Nagrade, priznanja:**

2010. – 2018.            Stipendija grada Zadra za izvrsne učenike i studente

### **Ostale vještine:**

Engleski jezik

Talijanski jezik (osnovna razina)

Vozačka dozvola B-kategorije

### **Dodatne informacije:**

Volonterski rad na Otvorenom danu kemije i Noći biologije