

Heterogenost gena BZLF1 i BRLF1 virusa Epstein-Barr u infektivnoj mononukleози

Božić, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:217:940014>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Filip Božić

**Heterogenost gena *BZLF1* i *BRLF1* virusa
Epstein-Barr u infektivnoj mononukleozi**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević”, pod mentorstvom naslovne izv. prof. dr. sc. Snježane Židovec Lepej. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Veliko hvala mentorici naslovnoj izv. prof. dr. sc. Snježani Židovec Lepej na vodstvu, pomoći i pristupačnosti prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem i mag. biol. mol. Mariji Rozman na uloženom trudu i pomoći u provedbi eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem svojim prijateljima i kolegama na potpori i lijepim trenucima tijekom studija.

Posebno hvala mojoj obitelji na ljubavi i velikoj podršci u svemu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Heterogenost gena *BZLF1* i *BRLF1* virusa Epstein-Barr u infektivnoj mononukleози

Filip Božić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virus Epstein-Barr (EBV) ili ljudski gamaherpesvirus 4 je sveprisutni DNA-virus koji zaražava više od 90% odraslih osoba diljem svijeta. Akutna infekcija ovim virusom može uzrokovati infektivnu mononukleozu, a latentna infekcija povezana je s razvojem malignih bolesti čovjeka. Replikacijski ciklus virusa EBV uključuje litičku i latentnu fazu u B-limfocitima, pri čemu je regulacija reaktivacije virusa iz latentne faze regulirana ekspresijom vrlo ranih litičkih gena *BZLF1* i *BRLF1*. Preliminarna istraživanja polimorfizama ovih gena u izolatima virusa EBV iz nekoliko geografskih regija ukazuju na postojanje geografski ograničenih varijanti i varijanti povezanih s razvojem pojedinih malignih bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je identificirati polimorfizme gena *BRLF1* i *BZLF1* u akutnoj infekciji EBV-om u Hrvatskoj kako bi se proširilo znanje o genskoj varijabilnosti EBV-a na ovom području. U istraživanju su sekvencirani geni *BZLF1* i *BRLF1* virusa EBV, a istraživanje je provedeno na modelu infektivne mononukleoze. Analizom sekvenci detektirane su dvije varijante gena *BZLF1*, *BZLF1-A2* i *BZLF1-C* koje su prethodno opisane u literaturi, ali i dva potpuno nova uzorka mutacija gena *BZLF1*, odnosno četiri uzorka mutacija gena *BRLF1* koji prethodno nisu bili opisani u literaturi. Rezultati ovog istraživanja pokazali su postojanje novih genskih varijanti EBV-a te ukazuju na potrebu dodatnih istraživanja istih.

Ključne riječi: litički ciklus, sekvenciranje, varijante gena
(35 stranica, 6 slika, 11 tablica, 44 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: naslovna izv. prof. dr. sc. Snježana Židovec Lepej

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Snježana Židovec Lepej

Izv. prof. dr. sc. Petra Korać

Prof. dr. sc. Dijana Škorić

Rad prihvaćen: 07.09.2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Heterogeneity of Epstein-Barr virus *BZLF1* and *BRLF1* genes in infectious mononucleosis

Filip Božić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Epstein-Barr virus (EBV) or human gammaherpesvirus 4 is a ubiquitous DNA virus that infects more than 90% of adults worldwide. Acute EBV infection can cause infectious mononucleosis while latent infection can also lead to the development of malignant diseases in humans. EBV replication cycle in B-lymphocytes includes lytic and latent stages with periodic reactivation being regulated by the expression of the very early lytic genes *BZLF1* and *BRLF1*. Preliminary data on polymorphisms of these two genes suggest the existence of geographically-limited variants as well as possible association with particular malignant diseases associated with EBV infection. The aim of this study was to identify *BRLF1* and *BZLF1* gene polymorphisms in acute EBV infection in Croatia in order to expand the knowledge on the genetic variability of EBV in this region. The study was performed by using infectious mononucleosis as a model and it involved sequencing of the *BZLF1* gene and the subterminal and terminal regions of the *BRLF1* gene. Sequence analysis detected two previously defined variants of the *BZLF1* gene (*BZLF1-A2* and *BZLF1-C*), as well as two and four mutation patterns of the *BZLF1* and *BRLF1* genes respectively, that have not been described previously. The results of this study have shown the existence of new EBV gene variants leading to new research opportunities in this field.

Keywords: lytic cycle, sequencing, gene variants
(35 pages, 6 figures, 11 tables, 44 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Snježana Židovec Lepej, PhD

Reviewers:

Assoc. Prof. Snježana Židovec Lepej, PhD

Assoc. Prof. Petra Korać, PhD

Prof. Dijana Škorić, PhD

Thesis accepted: 07.09.2023.

Popis kratica

ak – aminokiselina

AP1 – aktivatorski protein 1

BRLF1 - prvi lijevi otvoreni okvir čitanja fragmenta BamHI-R

bZIP - bazični leucinski zatvarač (engl. *basic leucine zipper*)

BZLF1 – prvi lijevi otvoreni okvir čitanja fragmenta BamHI-Z

CD – receptor klastera diferencijacije (engl. *cluster of differentiation*)

DBD – DNA-vezujuća domena (engl. *DNA binding domain*)

DD – dimerizacijska domena

E - rani (engl. *early*)

EBER – EBV-kodirana mala molekula RNA (engl. *EBV-encoded small RNA*)

EBNA - jezgreni antigen virusa Epstein-Barr (engl. *Epstein-Barr nuclear antigen*)

EBV - virus Epstein-Barr

gp – glikoprotein

IE – vrlo rani (engl. *immediate early*)

IR – unutarnja ponavljanja (engl. *internal repeats*)

L – kasni (engl. *late*)

LMP - latentni membranski protein (engl. *latent membrane protein*)

MHC – glavni sustav histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

PCR- lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction*)

Rp – promotor BRLF1

RRE – R-elementi odgovora (engl. *R response elements*)

TAD – transaktivacijska domena

Zp – promotor BZLF1

ZRE – Z-elementi odgovora (engl. *Z response elements*)

Sadržaj

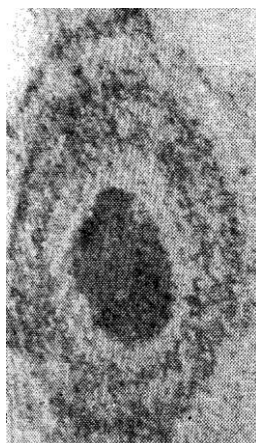
1. Uvod.....	1
1.1 Virus Epstein-Barr.....	1
1.1.1 Struktura viriona i organizacija genoma.....	2
1.2 Replikacijski ciklus virusa Epstein-Barr	5
1.2.1 Latentni ciklus.....	5
1.2.2 Litički ciklus.....	8
1.3 Litički proteini BZLF1 i BRLF1	10
1.3.1 Funkcijske domene i djelovanje proteina BZLF1	11
1.3.1 Funkcijske domene i djelovanje proteina BRLF1	13
1.4 Podtipovi i varijabilnost genoma virusa Epstein-Barr.....	14
2. Cilj istraživanja.....	15
3. Materijali i metode	16
3.1 Biološki uzorci	16
3.2. Metode.....	16
3.2.1 Amplifikacija DNA	16
3.2.2 Sekvenciranje PCR-produkata.....	19
3.2.3 Analiza sekvenci.....	21
3.2.4 Statistička obrada rezultata.....	22
4. Rezultati	23
4.1 Varijacije gena BZLF1	23
4.2 Varijacije gena BRLF1.....	24
4.3 Povezanost uzoraka mutacija gena BZLF1 i BRLF1	26
5. Rasprava	27
6. Zaključak	30
7. Literatura.....	31

1. Uvod

1.1 Virus Epstein-Barr

Virus Epstein-Barr (EBV) ili ljudski gamaherpesvirus 4 ima linearnu dvolančanu DNA kao genom i virus je iz reda *Herpesvirales*, porodice *Orthoherpesviridae*, podporodice *Gammaherpesvirinae* i roda *Lymphocryptovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses 2022). Jedan je od najčešćih virusa u ljudi koji uspostavlja doživotnu infekciju u više od 90% svjetske populacije prije dostizanja odrasle dobi (Dunmire i sur. 2018, Hatton i sur. 2014). Infekcije EBV-om u ranom djetinjstvu i u zdravih osoba često ne uzrokuju simptome. U razvijenim zemljama primarna infekcija je odgođena i češća u adolescentnoj dobi te može dovesti do razvoja infektivne mononukleoze (Chang i sur. 2009). Infektivna mononukleoza je akutna limfoproliferativna zarazna bolest koja je u 80% slučajeva povezana s EBV-infekcijom, sa simptomima poput upale grla, umora, vrućice i oticanja limfnih čvorova (Luzuriaga i Sullivan 2010).

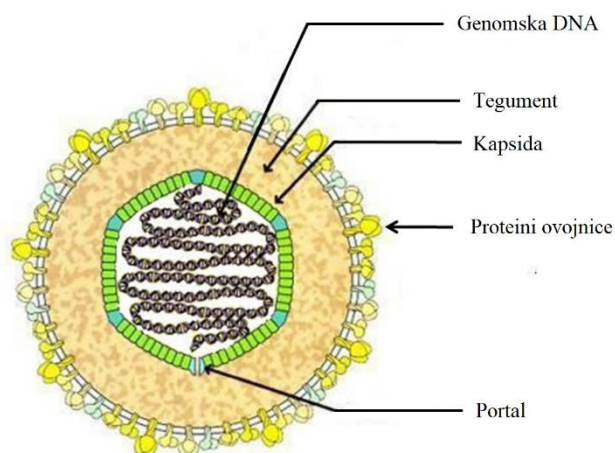
EBV prvi je opisani ljudski onkogeni virus, a latentne infekcije EBV-om povezane su s vrlo različitim malignim bolestima u ljudi (Dunmire i sur. 2018). EBV je otkriven u kulturi limfoblasta Burkittovog limfoma, u kojima su elektronskom mikroskopijom primijećene virusne čestice (Slika 1.) (Epstein i sur. 1964). Stoga se ovaj virus smatra jednim od značajnih etioloških čimbenika nastanka Burkittovog limfoma, Hodgkinovog limfoma, karcinoma nazofarinksa, karcinoma želuca, kao i B- i T-staničnih limfoma u imunokompromitiranih osoba, a novija istraživanja pokazuju i njegovu značajnu ulogu u nastanku multiple skleroze (Bjornevik i sur. 2022, Lanz i sur. 2022).



Slika 1. Elektronski mikrograf EBV-viriona u limfoblastu iz Burkittovog limfoma (Preuzeto iz: Epstein i sur. 1964).

1.1.1 Struktura viriona i organizacija genoma

EBV, kao i ostali herpesvirusi, ima dvolančani, linearni DNA-genom koji se u sklopu viriona nalazi u ikozaedarskoj proteinskoj kapsidi od 162 kapsomere. Oko kapside nalazi se proteinski tegument koji je okružen lipidnom ovojnicom (Slika 2.). Ovojnica u sebi sadrži uklopljene različite glikoproteine, od kojih su gp350 i gp42 potrebni za vezanje virusa na stanične receptore kao i za fuziju viriona i stanične membrane koja omogućuje ulazak viriona u stanice domaćina. Zrela virusna čestica promjera je oko 120-180 nm (Odumade i sur. 2011, Thompson i Kurzrock 2004).



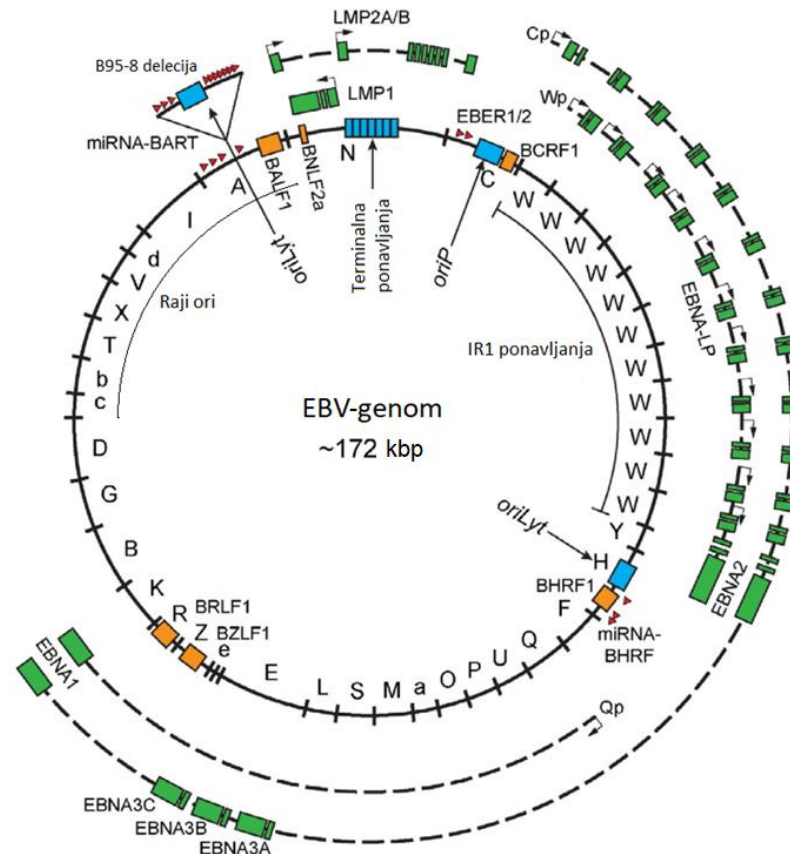
Slika 2. Struktura EBV-viriona (Preuzeto i prilagođeno prema: Chen i Luo 2012).

Genom većine sojeva virusa Epstein-Barr veličine je oko 184 kbp (Thompson i Kurzrock 2004), a za sada je opisano oko 100 gena koje kodira (Odumade i sur. 2011). Sekvencu cijelog genoma virusa EBV po prvi puta su objavili Baer i sur. (1984). Sekvenca duljine 172 kbp odgovarala je laboratorijskom soju B95-8 EBV-a, koji je odabran jer je bio iz jedine EBV-stanične linije u kojoj se virus replicirao u količini koja je omogućila kloniranje virusnih restrikcijskih fragmenata. *EcoRI* ili *BamHI* restrikcijski fragmenti EBV DNA klonirani su u kozmidne ili plazmidne vektore i sekvencirani Sangerovom metodom (Tzellos i Farrell 2012). Strukturna posebnost soja B95-8 je velika delecija od 11.8 kbp pa je sekvenca deletirane regije kasnije upotpunjena korištenjem Raji soja virusa (Farrell 2001). Prototip soj B95-8 EBV-a često se koristi kao kontrola tj. kao divlji tip virusa u laboratorijskim analizama (Price i Luftig 2014).

Shema genoma virusa EBV i *BamHI*-restrikcijska mapa prikazana je na Slici 3. Restrikcijski fragmenti redom su označeni slovima po veličini, A označavajući najduži. Otvoreni okviri čitanja EBV-a imenovani su sustavno prema restrikcijskom fragmentu u kojem počinje njihova transkripcija, sa naznačenim lijevim ili desnim smjerom transkripcije (L ili R, od engl. *left, right*), završavajući sa F i brojem. Na primjer, BZLF1 je prvi okvir čitanja s lijevim usmjerenjem koji počinje u restrikcijskom fragmentu *BamHI* Z (Farrell 2001). Osim genski kodiranih proteina, EBV stvara i niz nekodirajućih RNA, poput EBER1 i EBER2 (EBV-kodirana mala RNA, od engl. *EBV-encoded small RNA*), koji reguliraju odgovor interferona, te 25 pre-miRNA koje dozrijevaju u 44 različite zrele miRNA. miRNA su eksprimirane sa dva transkripcijska klastera, miR-BART i miR-BHRF1 iako je u prototipu B95-8 deletirana većina BART miRNA (Price i Luftig 2014). Na krajevima linearnog genoma nalaze se terminalna ponavljanja duga 538 bp pomoću kojih se genom može cirkularizirati i u obliku episoma opstati u inficiranim stanicama. Osim terminalnih, i unutar genoma nalaze se ponavljanja, IR (od engl. *internal repeats*), duga 3072 bp koja dijele genom na jedinstvenu kratku i dugu regiju (Farrell 2001, Laux i sur. 1988).

Genom se u obliku episoma može replicirati sa ishodišta replikacije *oriP* uz prisutnost jezgrenog antigena 1 virusa Epstein-Barr (EBNA1, od engl. *Epstein-Barr nuclear antigen 1*) *in trans* koji se specifično veže na *oriP* i regrutira staničnu replikacijsku mašineriju. Replikacija episoma usklađena je s replikacijom kromosoma stanica. Uz pomoć proteina EBNA1 episomi migriraju uz mitotske kromosome i pravilno se segregiraju kako bi virusni genom bio ekstrakromosomski stabilno održan kroz diobe stanica. Alternativno ishodište ekstrakromosomske replikacije može biti i *Raji ori*. DNA-replikacija tijekom litičke faze EBV

ciklusa kreće s trećeg ishodišta replikacije, *oriLyt*, vezanjem proteina BZLF1 *in trans*. Tada se virusni genom dijeli neovisno o staničnom ciklusu pomoću virusne DNA-polimeraze te se umnaža nekoliko stotina puta u dva dana. U EBV-genomu postoje dvije *oriLyt* kopije, a u soju B95-8 jedna od njih je deletirana (Hammerschmidt i Sugden 2013).



Slika 3. Shema genoma virusa Epstein-Barr u obliku episoma. *Bam*HI-restrikcijski fragmenti označeni su slovima unutar prstenastog genoma. *Cis*-regulatorni elementi (*oriP*, *oriLyt* i terminalna ponavljanja) označeni su plavom bojom, a naznačena je i približno definirana *Raji ori* regija, prema Hammerschmidtu i Sugden (2013), koja obuhvaća i sekvence deletirane u soju B95-8. Litički geni aktivni u ranom stadiju infekcije označeni su narančastom bojom, pre-mRNA latentnih gena prikazane su kao isprekidane linije sa naznačenim promotorima (Wp, Cp, Qp i LMP promotori) dok su njihovi kodirajući egzoni označeni zelenom bojom. Nekodirajuće miRNA prikazane su kao crveni trokuti (Preuzeto i prilagođeno prema: Price i Luftig 2014).

1.2 Replikacijski ciklus virusa Epstein-Barr

EBV se primarno prenosi slinom, najčešće u djece i adolescenata, no opisan je i prijenos virusa prilikom spolnog odnosa, transfuzije krvi ili transplantacije alografta (Dunnire i sur. 2018). Nakon kontakta s kontaminiranom slinom, najčešće dolazi do infekcije limfocita i epitelnih stanica, uglavnom u području orofarinksa (Hatton i sur. 2014). Replikacijski ciklus EBV-a uključuje litičku i latentnu fazu (Slika 4.). U epitelnim stanicama virus započinje svoj litički ciklus replikacije neposredno nakon ulaska u stanicu, dok u memorijskim B-limfocitima u obliku episoma može doživotno ostati u stanju latencije, bez ekspresije gena, tako izbjegavajući imunosti sustav. Iz latencije se virus može periodički reaktivirati (Hatton i sur. 2014).

EBV se veže na B-limfocite u tonzilama pomoću staničnih površinskih receptora CD21/CR2 ili CD35/CR1, a tkivni antigeni klase II glavnog sustava histokompatibilnosti (MHC, od engl. *major histocompatibility complex*) služe kao koreceptori za fuziju virusa i stanice. Virusni glikoprotein ovojnice gp350 i njegova varijanta gp220, nastala alternativnim izrezivanjem, vežu se za stanične receptore CD21 i CD35, a gp42 za MHC II molekule, potičući fuziju (Murata 2018, Odumade i sur. 2011). Epitelne stanice ne ekspimiraju CD21, pa se virusni protein ovojnice BMRF-2 veže za β 1-integrine epitelnih stanica, nakon čega gH/gL-kompleks proteina ovojnice u interakciji sa $\alpha\beta$ 6/8-integrinima potiče fuziju virusne ovojnice i stanične membrane. Nakon ulaska u stanicu, nukleokapsida ulazi u citoplazmu gdje se degradira te se genom transportira u jezgru. U jezgri se tijekom latencije virusni genom replicira kao episom, ali može doći i do integracije u DNA stanice (Odumade i sur. 2011). Virusna genomski DNA se tijekom latencije postupno metilira, utišavajući ekspresiju virusnih gena (Kalla i sur. 2010).

1.2.1 Latentni ciklus

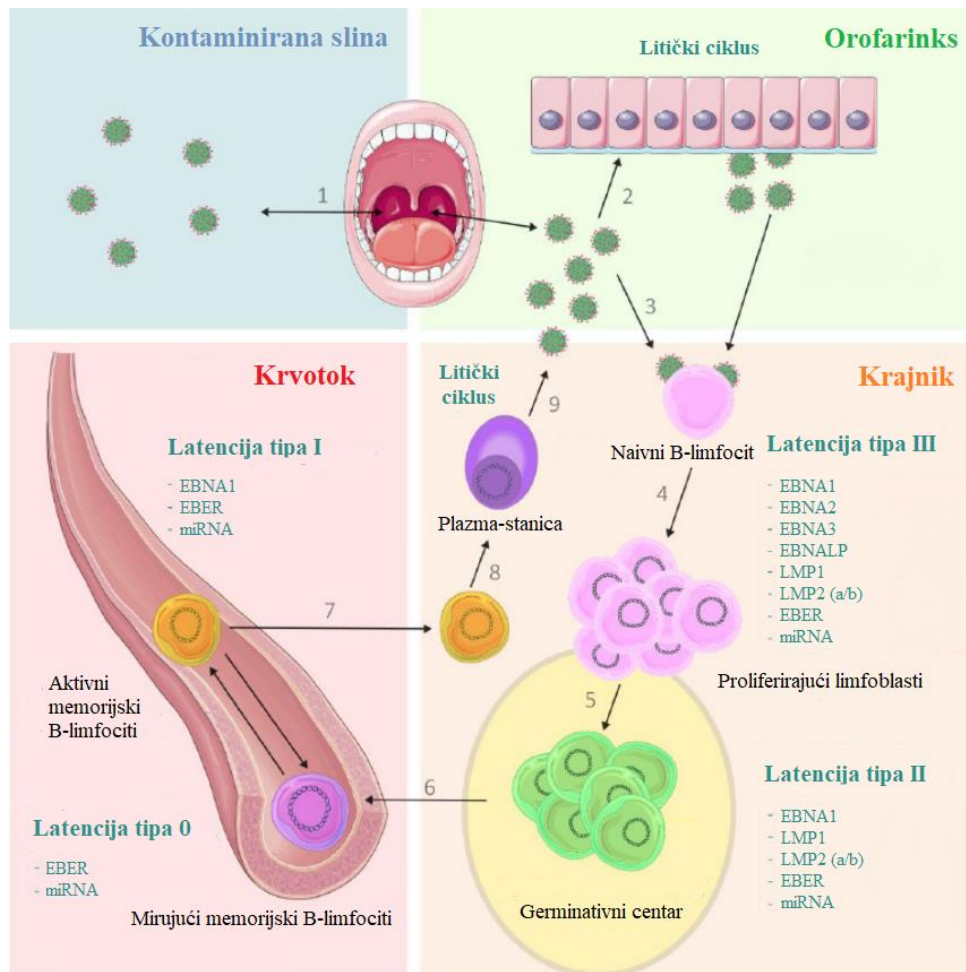
U latenciji virusni genom opstaje u stanicama, ali ne proizvodi virione. Latentni ciklus EBV-a podijeljen je na četiri tipa, latenciju 0, I, II i III, koje karakteriziraju različiti programi ekspresije latentnih gena. U inficiranim naivnim B-limfocitima virus ulazi u latenciju tipa III u kojoj se ekspimiraju latentni geni koji kodiraju sintezu proteina EBNA1, EBNA2, EBNA3A/B/C, EBNA-LP, latentnog membranskog proteina 1 (LMP1, od engl. *latent*

membrane protein 1) i LMP2A/B te nekodirajuće RNA EBER1, EBER2 i miRNA (Debuysschere i sur. 2023).

Protein EBNA1 zaslužen je za održavanje genoma, vezanjem za ishodište replikacije *oriP* u latenciji i regrutacijom staničnih replikacijskih proteina te osiguravanjem pravilne segregacije genoma tijekom mitoze (Amon i Farrell 2005, Hammerschmidt i Sugden 2013). EBNA2 je transkripcijski faktor koji potiče ekspresiju ostalih virusnih latentnih gena i staničnih gena, od kojih su neki uključeni u regulaciju staničnog ciklusa (Debuysschere i sur. 2023). EBNA-LP je koaktivator genske ekspresije uz EBNA2, dok su EBNA3 proteini transkripcijski represori, čime se regulira djelovanje EBNA2. Protein LMP1 imitira signal konstitutivno aktiviranog CD40-receptora, koji u germinativnom centru, nakon interakcije sa CD40L na T-limfocitu, prenosi signal za preživljavanje B-limfocita. Protein LMP2A inhibira normalnu signalizaciju oponašajući signal konstitutivno aktiviranog B-staničnog receptora, blokirajući litički ciklus i promovirajući preživljenje (Amon i Farrell 2005, Price i Luftig 2014).

Latencija tipa III omogućuje klonsku ekspanziju inficiranih B-limfocita, te omogućuje njihovu diferencijaciju u proliferirajuće limfoblaste slično procesu aktivacije naivnih B-limfocita kod prepoznavanja antigena. Aktivirani B-limfociti odlaze u germinativni centar krajnika pri čemu ulaze u fazu latencije tipa II. Latencija tipa II karakterizirana je ekspresijom proteina EBNA1, LMP1 i LMP2, te nekih miRNA. Inducira se diferencijacija i transformacija inficiranih B-limfocita u memorijske B-limfocite koji mogu doživotno perzistirati u germinativnom centru kao rezervoar EBV-a, ali mogu i putem krvotoka doći u ostale sekundarne limfoidne organe (Debuysschere i sur. 2023).

Memorijski B-limfociti koji iz germinativnog centra odlaze u krvotok ulaze u latenciju tipa I u kojoj je eksprimiran samo protein EBNA1. Memorijske stanice u krvotoku alternativno mogu ući u latenciju tipa 0 u kojem miruju bez ekspresije virusnih proteina, ali su i dalje prisutne neke miRNA, EBER1 i EBER2. Zbog potpunog nedostatka ekspresije proteina, EBV izbjegava CD8+ T-stanični odgovor što virusu omogućuje doživotnu latenciju. Aktivirane memorijske stanice se iz krvotoka mogu vratiti u krajnike i ući u litički ciklus nakon transformacije u plazma-stanice (Debuysschere i sur. 2023).



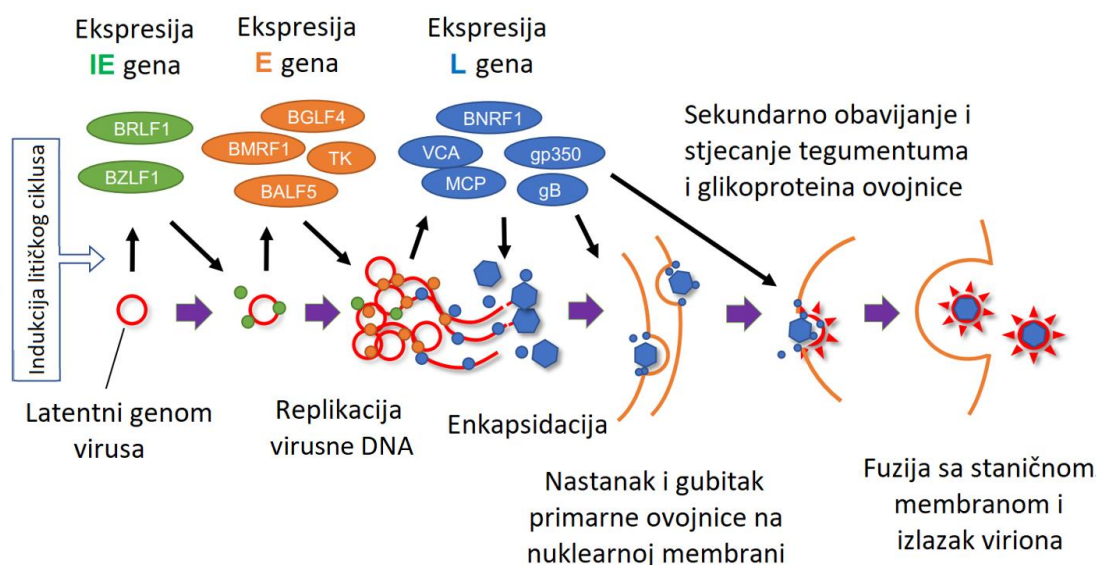
Slika 4. Replikacijski ciklus EBV-a. Virus se prenosi inficiranom slinom (1) te može ući i replicirati se u epitelnim stanicama u području orofarinksa (2) ili ući u naivne B-limfocite u području krajnika (3). U naivnim B-limfocitima uspostavlja se latencija tipa III koja potiče proliferaciju (4) te proliferirajući limfoblasti migriraju u germinativni centar gdje se uspostavlja latencija tipa II i dolazi do transformacije u memorijske B-limfocite (5). Iz germinativnog centra memorijske stanice mogu ući u krvotok gdje se uspostavlja latencija tipa I, koja omogućava diobu stanica, ili tipa 0 kao stanje mirovanja i izbjegavanja imunskog sustava (6). Memorijske stanice mogu se vratiti u krajnike (7) te transformirati u plazma stanice (8) u kojima se ponovno aktivira litički ciklus i dolazi do oslobađanja novih viriona u slinu (9). Uz tipove latencije navedeni su latentni geni i nekodirajuće RNA molekule koje se eksprimiraju u određenom tipu (Preuzeto i prilagođeno prema: Debuysschere i sur. 2023).

1.2.2 Litički ciklus

Litički ciklus predstavlja produktivnu fazu virusnog ciklusa kada dolazi do replikacije virusnog genoma i formiranja novih viriona, što omogućuje prijenos virusa na nove domaćine. EBV može u litički ciklus ući odmah nakon ulaska u epitelne stanice ili se može reaktivirati u memorijskim stanicama u kojima je prethodno uspostavio latenciju (Hatton i sur. 2014). Postoje tri skupne litičkih virusnih gena koji su eksprimirani tijekom litičkog ciklusa: vrlo rani, rani i kasni (IE, E i L, od engl. *immediate-early*, *early*, *late*) (Tsurumi i sur. 2005). Povećana ekspresija virusnih litičkih gena povećava vjerojatnost razvoja malignih bolesti povezanih s infekcijom EBV-om (Bristol i sur. 2018).

Prijelaz iz faze latencije u litički ciklus povezan je s aktivacijom IE-litičkih gena *BRLF1* i *BZLF1* (Feederle i sur. 2000). Reaktivacija litičkog ciklusa u kultiviranim stanicama može se potaknuti nizom kemijskih i boloških reagensa poput TPA (12-O-tetradekanoilforbol-13-acetat), inhibitora DNA-metilaza, histonskih deacetilaza, transformirajućeg faktora rasta β (TGF- β) i anti-imunoglobulina ili staničnim stresom (Murata i sur. 2021). Njihovo djelovanje dovodi povećane aktivnosti *BZLF1*-promotora Z_p i *BRLF1*-promotora R_p , koja je povezana i sa povećanom histonskom acetilacijom u području promotora (Chang i Liu 2000, Jenkins i sur. 2000). Reaktivacija *in vivo* vjerojatno se događa prilikom diferencijacije memorijskih B-limfocita u plazma stanice kao rezultat antigenske stimulacije, koja se može oponašati vezanjem anti-imunoglobulina za B-stanični receptor, a koju blokira djelovanje proteina LMP-2 (Amon i Farrell 2005). B-stanični receptor aktivira puteve prijenosa signala koji uključuju aktivaciju GTPaza iz porodice Ras i MAP kinaza p38 i c-jun N-terminalne kinaze (JNK) te fosfolipaze C i protein kinaze C (koju aktivira i TPA), kalcineurina i kalmodulin-ovisne kinaze. Ovi putevi u konačnici aktiviraju transkripcijske faktore koji se vežu na promotorske motive u promotorima Z_p i R_p (Kenney 2007).

Geni *BZLF1* i *BRLF1* svojom ekspresijom mogu reaktivirati virusni genom iz latencije (Feederle i sur. 2000), ali *BZLF1* se smatra važnijim zbog učinkovitije reaktivacije u odnosu na *BRLF1* prilikom njihove egzogene ekspresije (Murata i sur. 2021). Oba gena kodiraju transkripcijske faktore koji pokreću kaskadu reakcija litičkog ciklusa EBV-a, aktivirajući ekspresiju ranih i kasnih litičkih gena, replikaciju virusnog genoma i u konačnici formiranje novih virusnih čestica i njihov izlazak iz stanice (Slika 5.). Proteini *BZLF1* i *BRLF1* također i uzajamno induciraju vlastitu ekspresiju te su oba potrebna za završetak litičkog ciklusa virusa (Feederle i sur. 2000).



Slika 5. Litički ciklus EBV-a. Indukcija litičkog ciklusa potiče ekspresiju vrlo ranih (IE) gena *BZLF1* i *BRLF1*, koji potiču kaskadu ekspresije ranih (E) i kasnih (L) gena te dolazi do linearne replikacije virusnog genoma u jezgri stanice. Nakon replikacije slijedi formiranje kapside, izlazak iz jezgre, formiranje tegumenta i ovojnice te izlazak zrelog viriona iz stanice. Crvenom linijom prikazan je genom virusa, a narančastom jezgrine i stanična membrana. Zelenim, narančastim i plavim krugovima redom su prikazani produkti litičkih gena IE, E i L (Preuzeto i prilagođeno prema: Murata i sur. 2021).

Rani geni kodiraju proteine koji sudjeluju u metabolizmu nukleotida, poput timidin-kinaze, i linearnoj DNA-replikaciji virusnog genoma (Murata i sur. 2021) u kojoj ujedno sudjeluje i protein BZLF1, vežući ishodište replikacije *oriLyt* i druge replikacijske proteine (Hammerschmidt i Sugden 2013). U sastavu polimeraze nalaze se proteini poput BALF5 koji djeluje kao katalitička podjedinica polimeraze, BMRF1 koji je faktor procesivnosti i BGLF4 koji ima helikazno djelovanje (Hammerschmidt i Sugden 2013, Murata 2018). Osim toga, produkti ranih gena mogu sudjelovati u regulaciji staničnog metabolizma, sprječavanju apoptoze, izlasku kapside iz jezgre ili djelovati kao transaktivatori i regulatori ekspresije kasnih gena (Murata 2018). Kasni geni uglavnom kodiraju strukturne proteine, poput kapsidnih proteina MCP (engl. *major capsid protein*) i VCA (engl. *viral capsid antigen*), proteina tegumenta ili glikoproteina ovojnice, kao što su gp350 i gp42 (Murata i sur. 2021). Produkti kasnih gena također sudjeluju u izlasku i ulasku virusa u stanicu te djeluju kao regulatori imunskog sustava (Murata 2018).

Nakon replikacije genoma i enkapsidacije, nukleokapsida pupa kroz unutarnju membranu jezgre, dobivajući primarnu ovojnici koja se odmah gubi fuzijom s vanjskom membranom jezgre. Nukleokapsida ponovno pupa u membranski organel, vjerojatno u trans-Golgijevu mrežu, gdje dobiva novu ovojnici. U ovom stadiju se inkorporiraju proteini tegumenta i glikoproteini ovojnice nakon čega slijedi fuzija organela sa staničnom membranom i izlazak zrelog viriona iz stanice (Murata i sur. 2021).

1.3 Litički proteini BZLF1 i BRLF1

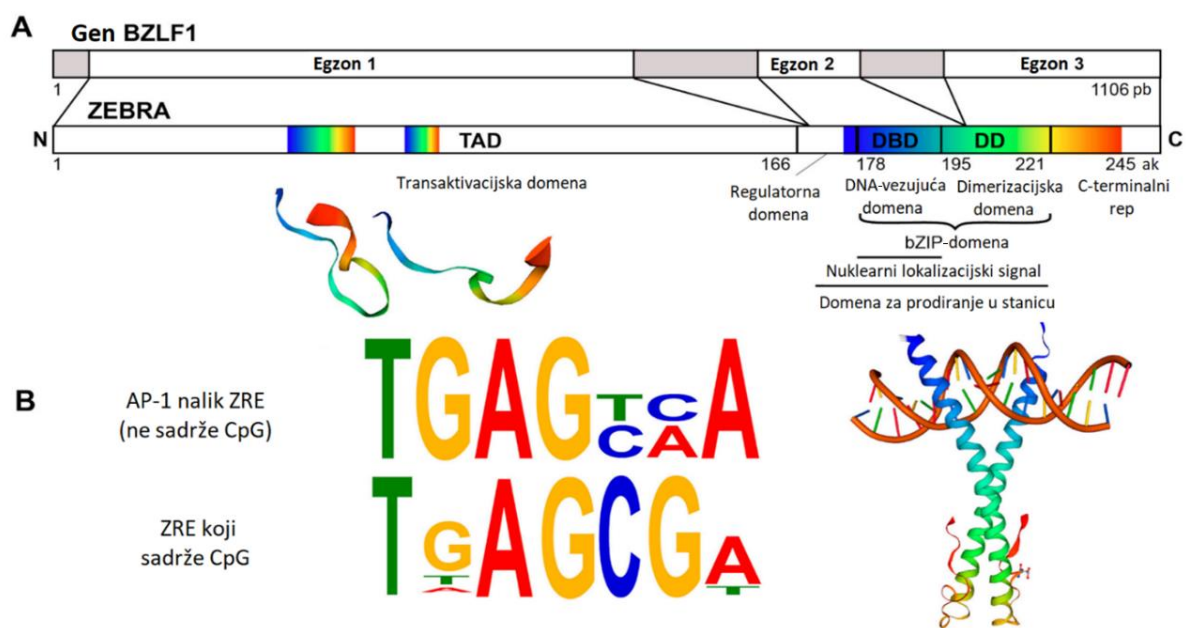
Proteini BZLF1 i BRLF1, koji se mogu naći još i pod nazivima Zta, ZEBRA, EB1 ili Z, odnosno Rta ili R (Wille i sur. 2013), kodirani su vrlo ranim litičkim genima *BZLF1* i *BRLF1* čija transkripcija započinje unutar *Bam*HI Z, odnosno R-restrikcijskog fragmenta EBV-genoma (Slika 3.) (Farrell 2001). Transkripcijom sa promotora Zp nastaje monocistronska mRNA duljine 1 kb koja se sastoji od 3 egzona i s koje se translatira protein BZLF1. Zbog blizine ova dva gena u EBV-genomu, BZLF1 se može transkribirati i s promotora Rp. Transkripcijom sa promotora Rp nastaje 4 kb duga mRNA, koja se alternativno izrezuje u 3,3 kb i 0,8 kbp duge mRNA. Sa 0,8 kb mRNA translatira se BRLF1-BZLF1 fuzijski protein RAZ koji može vezati protein BZLF1 i inhibirati njegovu funkciju, dok se sa 3,3 kb mRNA, koja je bicistronska, mogu translatirati i BRLF1 i BZLF1 (Chang i Liu 2001). Oba proteina djeluju kao transaktivatori, induciraju vlastitu transkripciju i transkripciju jedan drugoga te imaju različite, ali kooperativne uloge u svim koracima litičkog ciklusa EBV (Feederle i sur. 2000). Kako bi izvršavali svoju funkciju, uz regulatorne domene i domene sa pomoćničkim funkcijama, BZLF1 i BRLF1 sadrže 3 glavne funkcijske domene: dimerizacijsku, DNA-vezujuću i transaktivacijsku domenu (Manet i sur. 1991, Germini i sur. 2020). Također, oba proteina mogu stupati u interakciju sa histonskim acetilazama poput CBP-a (CREB vezujući protein, od engl. *CREB-binding protein*) i p300, koje djeluju kao koaktivatori transkripcijske aktivacije (Tsurumi i sur. 2005, Wille i sur. 2013).

1.3.1 Funkcijske domene i djelovanje proteina BZLF1

Protein BZLF1 pripada porodici transkripcijskih faktora s bazičnim leucinskim zatvaračem (bZIP, od engl. *basic leucine zipper*) te je homologan sa eukariotskim bZIP proteinima c-jun i c-fos (Wille i sur. 2013). Proteini bZIP dimeriziraju pomoću leucinskih ponavljanja stvarajući superzavojnica te sa susjednom bazičnom regijom vežu DNA (Fujii i sur. 2000). BZLF1 djeluje kao homodimer (Wille i sur. 2013), a dimerizacijska domena (DD) koja omogućava dimerizaciju monomera veličine 245 aminokiselina (ak) proteže se od ak 195 do ak 221 (Slika 6A.) (Germini i sur. 2020). Zbog nedostatka klasičnog motiva leucinskog zatvarača, potrebna je dodatna stabilizacija superzavojnice pomoću C-terminalnog repa (Petosa i sur. 2006). DNA-vezujuća domena (DBD, od engl. *DNA binding domain*) zauzima ak 178-194 te zajedno sa DD čine bZIP-domena. Unutar DBD još se nalazi i nuklearni lokalizacijski signal, a djelomično preklapajuće sa bZIP-domenom (170-220 ak) domena za prodiranje u stanicu, koja omogućuje proteinu BZLF1 izlaz i ulaz u stanice i jezgru. Transaktivacijska domena (TAD) BZLF1 nalazi se 1-166 ak, dok je regija 167-177 ak regulatorna domena čijom se fosforilacijom modulira aktivnost BZLF1 (Germini i sur. 2020). Unutar transaktivacijske domene nalazi se i BRLF1 kooperacijska domena (ak 25-42) (Luo i sur. 2011).

BZLF1 se svojom DNA-vezujućom domenom veže za mjesta AP-1, heptamerne pseudopalindromske sekvence koje vežu i drugi bZIP-transkripcijski faktori poput aktivatorskog proteina 1 (AP-1) (Fujii i sur. 2000), ali i za motive nazvane ZRE (od engl. *Z response elements*) (Wille i sur. 2013). ZRE su specifični heptamerni DNA-motivi koji se nalaze i u virusnim i domaćinskim promotorima te su podijeljeni na dva tipa: ZRE koji sadrže CpG-mjesta i ZRE nalik mjestu AP-1 koji ne sadrže CpG-mjesta (Slika 6B.) (Germini i sur. 2020). BZLF1 se jače veže za ZRE s metiliranim CpG-mjestima, preferirajući ih nad nemetiliranim ZRE (Bhende i sur. 2004, Wille i sur. 2013) i nad mjestom AP-1 i mjestima nalik AP-1 (Bernaudat i sur. 2022). BZLF1 je eksprimiran i rano u infekciji B-limfocita EBV-om, kada je virusni genom još nemetilan (Kalla i sur. 2010). Tada veže stanične metilirane ZRE kao i AP-1-mjesta u promotorima gena koji promoviraju proliferaciju B-limfocita, pomažući u uspostavljanju latencije. Nakon postupne metilacije virusnog genoma tijekom latencije, BZLF1 može vezati i ZRE s metiliranim CpG-mjestima u promotorima litičkih gena, uključujući i Rp, aktivirajući njihovu transkripciju te omogućujući prijelaz u litički ciklus (Bernaudat i sur. 2022).

Nakon vezanja na promotor, BZLF1 sa svojom TAD interagira s transkripcijskim faktorima TFIIA i TFIID što dovodi do regrutacije ostalih transkripcijskih faktora i RNA-polimeraze II (Germini i sur. 2020). Osim transkripcijske aktivacije vlastitog, *BZLF1*, i niza drugih litičkih gena direktnim vezanjem za promotor, i već spomenute uloge u replikaciji virusnog genoma vezanjem na *oriLyt* i regrutacijom replikacijske mašinerije virusa (Hammerschmidt i Sugden 2013), BZLF1 može vršiti i transkripcijsku represiju, vežući druge transkripcijske faktore svojom domenom TAD ili bZIP. Time narušava ekspresiju ciljnih gena vezanog transkripcijskog faktora kao i vlastitih ciljnih gena (Germini i sur. 2020).



Slika 6. (A) Struktura proteina BZLF1 (ZEBRA). BZLF1 je kodiran sa 3 egzona i dugačak je 245 ak. Sadrži transaktivacijsku domenu (TAD, ak 1-166), regulatornu domenu (ak 167-177) i bZIP-domenu, koja se sastoji od DNA-vezujuće domene (DBD, ak 178-194) i dimerizacijske domene (DD, ak 195-221). Domena za penetraciju stanice nalazi se između ak 170 i 220. Ispod obojanih regija prikazane su njihove 3D-strukture s istim bojama koje označavaju prostorni položaj aminokiselina iz primarne strukture. (B) Sekvence dviju vrsta DNA-motiva ZRE. Relativne veličine slova prikazuju njihovu učestalost u sekvencama (Preuzeto i prilagođeno prema: Germini i sur. 2020).

1.3.1 Funkcijske domene i djelovanje proteina BRLF1

Protein BRLF1 ima 605 aa te nema poznate eukariotske homologe (Jia i sur. 2010), ali također djeluje kao homodimer. Njegova dimerizacijska domena (aa 1-232) preklapa se s DNA-vezujućom domenom (aa 1-320) koja ne odgovara ni jednom drugom opisanom DNA-vezujućem motivu (Manet i sur. 1991). Za transaktivacijsku funkciju bitne su dvije regije, prolinom bogata regija (aa 352-515) i regija bogata kiselim aminokiselinama (aa 515-605). Kisela regija obavezna je za transaktivacijsku funkciju, dok prolinska regija, koja sadrži dva odvojena klastera prolina između aa 352-410 i 450-500, samo potpomaže u aktivnosti (Manet i sur. 1991).

BRLF1 dimer veže se na promotore na DNA-motive nazvane RRE (od engl. *R response elements*), konsenzus-sekvence 5'-GNCCN₉GGNG-3', istovremeno stupajući u kontakt s obje sekvence odvojene sa 9 nasumičnih nukleotida (Gruffat i Sergeant 1994). Za razliku od BZLF1, metilacija CpG-mjesta unutar RRE ne utječe na samu sposobnost vezanja BRLF1 za DNA. DNA-metilacija ipak značajno inhibira BRLF1 aktivaciju promotora, inhibirajući sposobnost BRLF1 da regrutira histonske acetilaze, koje acetilacijom H3K9 u području promotora čine promotore dostupnijima transkripcijskim faktorima i transkripcijskoj mašineriji (Wille i sur. 2013).

Osim gena koje aktivira direktnim vezanjem za RRE u promotoru neovisno o BZLF1, BRLF1 neke gene aktivira i sinergistički sa BZLF1, gdje dolazi do vezanja oba proteina na promotore. Treću grupu gena BRLF1 može aktivirati indirektno, za razliku od BZLF1 koji uvijek direktno aktivira transkripciju vezanjem za promotor. Indirektnu aktivaciju vrši reguliranjem aktivnosti staničnih transkripcijskih faktora protein-protein interakcijama ili aktivacijom signalnih puteva poput MAPK i PI3K koji vode do posttranslacijske modifikacije staničnih transkripcijskih faktora. Tako BRLF1 indirektno aktivira transkripciju sa vlastitog promotora pomoću interakcije s transkripcijskim faktorom Sp1 (od engl. *specificity protein 1*), a sa promotora Zp aktivacijom aktivirajućeg faktor transkripcije 2 (ATF2 od engl. *activating transcription factor-2*) (Miller i sur. 2007, Murata i sur. 2021).

1.4 Podtipovi i varijabilnost genoma virusa Epstein-Barr

EBV-izolati podijeljeni su dva tipa, Tip 1 i Tip 2, na temelju sekvence gena *EBNA2* koji je najdivergentniji lokus u EBV-genomu sa 70% poklapanja na razini nukleotida i samo 54% poklapanja u primarnoj strukturi proteina. Tip 1 prisutan je diljem svijeta dok je Tip 2 češći u dijelovima subsaharske Afrike. Zabilježeni su i polimorfizmi u genima *EBNA3A*, *EBNA3B* i *EBNA3C* koji su povezani s varijacijom gena *EBNA2* i čine dodatne razlike između definiranih tipova. Osim razlike u sekvenci, Tip 1 efikasnije transformira B-limfocite u limfoblastoidne stanice od Tipa 2 (Chang i sur. 2009, Tzellos i Farrell 2012). Opisano je i nekoliko drugih klasifikacija na temelju zamijećenih varijacija sekvenci u lokusima poput *LMP1*, koji ima veću stopu polimorfizama od većine EBV-gena, *EBNA1* i *BZLF1*, ali i samog promotora *Zp* (Chang i sur. 2009). Kako sekvence geografski variraju tako je primijećena i različita incidencija bolesti povezanih sa EBV-infekcijom u različitim dijelovima svijeta, poput visoke učestalosti karcinoma nazofarinksa u populaciji Južne Kine ili Burkittovog limfoma u subsaharskoj Africi, ukazujući na moguću povezanost genske varijacije virusa i razvoja bolesti (Tzellos i Farrell 2012).

Analizama polimorfizama gena *BRLF1* i *BZLF1* u uzorcima karcinoma želuca, karcinoma nazofarinksa i malignih limfoma otkriven je niz varijanti za koje se pretpostavlja da su povezane s razvojem specifičnih malignih bolesti no navedena otkrića još je potrebno potvrditi, a opisane su i geografski ograničene varijante. Sekvence *BZLF1* podijeljene su u 6 podtipova (BZLF1-A, -B, -C, -D, -E, -F), od kojih se A i B sastoje od više varijanti (A1, A2 i B1-6) (Luo i sur. 2011, Lorenzetti i sur. 2014), a *BRLF1* u 5 podtipova (BR1-A, -B, -C, -D, -E) (Jia i sur. 2010). Pokazano je da se varijanta BZLF1-C češće pojavljuje u uzorcima pacijenata s infektivnom mononukleozom, dok su varijante BZLF1-A2 i BZLF1-B potencijalno povezane s razvojem različitih tipova limfoma (Lorenzetti i sur. 2014, Yang i sur. 2014). Isto tako, podtip BR1-A se prvenstveno pojavljuje kod zdravih donora, dok BR1-C može biti povezan s karcinomom nazofarinksa i limfomima (Jia i sur. 2010, Yang i sur. 2014).

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je po prvi put identificirati polimorfizme gena *BRLF1* i *BZLF1* virusa EBV u akutnoj infekciji EBV-om pomoću metode Sangerovog sekvenciranja kako bi se proširilo znanje o genskoj varijabilnosti virusa EBV na području Hrvatske i potencijalno usmjerilo buduća istraživanja povezanosti specifičnih varijanti gena *BRLF1* i *BZLF1* i bolesti povezanih s infekcijom EBV-om.

3. Materijali i metode

3.1 Biološki uzorci

U istraživanju sam obradio 33 uzorka DNA izolirane iz periferne krvi bolesnika s infektivnom mononukleozom kod kojih je metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR, od engl. *quantitative polymerase chain reaction*) prethodno dokazana viremija veća od 1000 kopija EBV DNA/ml krvi. Uzorci su uzeti iz biološke banke uzoraka prikupljenih u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Molekularna raznolikost virusa Epstein-Barr“ (šifra projekta IP-2020-02-8961, Hrvatska zaklada za znanost) koji se provodi u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, gdje sam proveo i ovo istraživanje. Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ odobrilo je ovo istraživanje na sjednici održanoj 28.08.2019.

3.2. Metode

Izolacija DNA iz uzoraka periferne krvi i određivanje viremije virusa Epstein-Barr napravljeno je u sklopu projekta koji je prethodio izradi ovog rada. Za izolaciju DNA korišten je komercijalni set reagensa QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), a za određivanje viremije set reagensa LightCycler® (Roche) prema protokolima proizvođača. qPCR proveden je u PCR uređaju LightCycler® 2.0 (Roche).

3.2.1 Amplifikacija DNA

Iz DNA izolirane iz periferne krvi umnožio sam cijeli gen *BZLF1* te subterminalnu i terminalnu regiju gena *BRLF1* (gdje se nalazi sekvenca za glavnu transaktivacijsku domenu proteina) metodom PCR, koristeći komercijalni set kemikalija FastStart™ High Fidelity (Roche) i specifične početnice. Početnice su dizajnirane specifično za ovo istraživanje te su naručene od tvrtke Kemomed d.o.o. (Slovenija). Sekvence korištenih početnica navedene su u Tablici 1.

Tablica 1. Sekvence i „koordinate“ specifičnih početnica korištenih za standardno PCR-umnažanje gena *BZLF1* te subterminalne i terminalne regije gena *BRLF1*.

Početnica	Sekvenca (5'-3')	B95-8 „koordinate“
Nizvodna BZLF1	TCAAAGAGAGCCGACAGGAAGATA	102127-102150
Uzvodna BZLF1	CATTGCACCTTGCCGGCCACC	103175-103195
Nizvodna BRLF1	GGAACCTGAACAGCCTTGGA	104034-104053
Uzvodna BRLF1	CATTAGCAATGCCTGTGGCTC	103302-203322

Reakcijsku smjesu za svaki izolat pripremio sam prema Tablici 2., koristeći ili početnice za gen *BZLF1* ili za *BRLF1*. Prilikom dodavanja izolirane DNA, reakcijsku smjesu držao sam u hladnom bloku. Uzorke sam stavio u PCR-uređaj ProFlex PCR System (Applied Biosystems) te postavio program amplifikacije prikazan u Tablici 3. Isti program amplifikacije koristio sam za oba gena. Uzorci su nakon završene PCR-reakcije sladišteni u zamrzivaču do daljnjeg korištenja.

Tablica 2. Reakcijska smjesa za standardni PCR za gene *BZLF1* i *BRLF1*.

Komponenta	V (μl)
dNTP smjesa (10 mM svakog)	0,5
10x reakcijski pufer s 18mM MgCl ₂	2,5
Nizvodna početnica BZLF1/BRLF1	0,3
Uzvodna početnica BZLF1/BRLF1	0,3
Smjesa enzima FastStart™ High Fidelity (5 U/μl)	0,25
H ₂ O	20,15
DNA izolat	1
Ukupno	25

Tablica 3. Program PCR amplifikacije gena *BZLF1* i *BRLF1*.

	Početna denaturacija	Denaturacija	Prijanjanje početnica	Elongacija	Završna elongacija	Hlađenje
Temperatura	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
Vrijeme	3 min	30 s	30 s	1 min	7 min	∞
Broj ponavljanja	1×	45 ciklusa			1×	

Radi veće specifičnosti, dobivene PCR produkte dodatno sam umnožio metodom ugniježdene lančane reakcije polimerazom (*nested* PCR) koristeći drugi par specifičnih početnica koje se vežu unutar umnoženih PCR produkata. Sekvence unutarnjih početnica navedene su u Tablici 4. Za reakciju umnažanja ponovno sam koristio komercijalni set kemikalija FastStart™ High Fidelity (Roche). Reakcijsku smjesu pripremio sam prema Tablici 5., koristeći unutarnje početnice za gen *BZLF1* ili *BRLF1*, te sam ju prilikom dodavanja odgovarajućeg PCR produkta držao u hladnom bloku. Uzorke sam stavio u uređaj za PCR ProFlex PCR System (Applied Biosystems) i koristio sam identičan program amplifikacije kao i u prvoj PCR-reakciji prikazan u Tablici 3. Uzorci su pohranjeni na -20°C do sekvenciranja.

Tablica 4. Sekvence i „koordinate“ unutarnjih specifičnih početnica korištenih za ugniježđeni PCR za umnažanje gena *BZLF1* te subterminalne i terminalne regije gena *BRLF1*.

Početnica	Sekvenca (5'-3')	B95-8 „koordinate“
Unutarnja nizvodna BZLF1	AAACGAGGCGTGAAGCAGGCGTGG	102171-102194
Unutarnja uzvodna BZLF1	CCACCTTTGCTATCTTTGCTG	103159-103179
Unutarnja nizvodna BRLF1	GCGATGAGAGACCCATATTCC	103992-104012
Unutarnja uzvodna BRLF1	GCATAGTTTCTAAAAGAGGAGG	103325-103346

Tablica 5. Reakcijska smjesa za ugniježđeni PCR za gene *BZLF1* i *BRLF1*.

Komponenta	V (μl)
dNTP smjesa (10 mM svakog)	0,5
10x reakcijski pufer s 18 mM MgCl ₂	2,5
Unutarnja nizvodna početnica BZLF1/BRLF1	0,3
Unutarnja uzvodna početnica BZLF1/BRLF1	0,3
Smjesa enzima FastStart™ High Fidelity (5 U/μl)	0,25
H ₂ O	20,5
PCR produkt	0,5
Ukupno	25

3.2.2 Sekvenciranje PCR-produkata

Dobivene PCR-produnkte ugniježđenog PCR-a sekvencirao sam Sangerovom dideoksi metodom koja se zasniva na diferencijalnoj terminaciji DNA-elongacije nasumičnom ugradnjom fluorescentno označenih dideoksi-nukleotida umjesto neoznačenih deoksi-nukleotida. Umnoženi fragmenti se kapilarnom elektroforezom razdvoje na temelju različite duljine te se DNA-sekvencerom detektiraju fluorescentni signale dajući kromogram što omogućuje očitavanje sekvence. Za reakciju sekvenciranja koristio sam komercijalni set kemikalija BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™).

U protokolu odabranog seta kemikalija naveden je raspon količina PCR-produkta u reakcijskoj smjesi za optimalnu reakciju sekvenciranja te za amplikone gena *BZLF1* i subterminalne i terminalne regije gena *BRLF1* koji su očekivane duljine 500-1000 pb on iznosi 5-20 ng. Stoga sam prije reakcije sekvenciranja proveo fluorimetrijsku kvantifikaciju umnožene DNA koristeći komercijalni set kemikalija Qubit™ dsDNA BR Assay Kit i Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) koji je prethodno već bio kalibriran. Reakcijsku smjesu za određivanje koncentracije DNA pripremio sam prema Tablici 6.

Tablica 6. Reakcijska smjesa za fluorimetrijsku kvantifikaciju PCR produkta.

Komponenta	V (μ l)
Qubit® dsDNA BR Buffer	197
Qubit® dsDNA BR Reagent	1
Uzorak DNA	2
Ukupno	200

Nakon kvantifikacije, uzorke sam po potrebi razrijedio vodom do konačne koncentracije 5-20 ng/ μ l i koristio 1 μ l uzorka u daljnjem postupku. Reakcijsku smjesu sekvenciranja pripremio sam prema Tablici 7. Za svaki uzorak napravio sam dvije reakcijske smjese, s nizvodnom i s uzvodnom početnicom, kako bi se sekvencirala oba lanca DNA i preklapanjem dobivenih sekvenci postigla veća preciznost. Epruvete sa reakcijskom smjesom stavio sam u PCR-uređaj ProFlex PCR System (Applied Biosystems) s programom amplifikacije prikazanim u Tablici 8.

Tablica 7. Reakcijska smjesa za reakciju sekvenciranja DNA gena *BZLF1* i *BRLF1*.

Komponenta	V (μ l)
BigDye™ Terminator 3.1 reakcijska smjesa	0,5
BigDye™ Terminator 5X pufer za sekvenciranje	2
Unutarnja nizvodna ili uzvodna početnica BZLF1/BRLF1	0,6
H ₂ O	5,9
Razrijeđeni PCR-produkt	1
Ukupno	10

Tablica 8. Program amplifikacije u reakciji sekvenciranja DNA gena *BZLF1* i *BRLF1*.

	Početna denaturacija	Denaturacija	Prijanjanje početnica	Elongacija	Hlađenje
Temperatura	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Vrijeme	1 min	10 s	5 s	4 min	∞
Broj ponavljanja	1×	25 ciklusa			1×

Produkte reakcije sekvenciranja je prije očitavanja kapilarnom elektroforezom potrebno pročistiti od zaostalih reagensa i kontaminanata koji bi mogli ometati očitavanje. U prvom koraku pročišćavanja, precipitirao sam DNA pomoću 96%-tnog etanola i natrijevog acetata (pH = 5,2). U svaki uzorak dodao sam 50 µl 96%-tnog etanola i 2 µl natrijevog acetata. Poklopljene epruvete s uzorcima potom sam centrifugirao u Centrifugi 5430 (Eppendorf) 20 min na 2000×g, nakon čega sam epruvete otvorio i prekrrio papirnatim ručnikom te preokrenute centrifugirao 1 min na 150×g kako bih izbacio etanol. Nakon izbacivanja etanola, na uzorke sam dodao 150 µl ledenog 70%-tnog etanola te ponovo poklopio i centrifugirao 5 min na 2000×g. Potom sam ponovio korak izbacivanja etanola gdje sam otvorene, preokrenute epruvete, prekrivene papirnatim ručnikom, centrifugirao 1 min na 150×g. Dobiveni talog resuspendirao sam u 10 µl deioniziranog formamida i denaturirao 2 min na 90°C u PCR-uređaju. Denaturirane uzorke stavio sam u kapilarni sekvencer ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

3.2.3 Analiza sekvenci

Dobivene sekvence uredio sam u računalnom programu SnapGene. Tehničke pogreške u očitanim sekvencama ručno sam prepravio pomoću dobivenih kromatograma te sam uzvodne i nizvodne sekvence uzoraka preklopio kako bih dobio konsenzus-sekvence.

Konsenzus-sekvence svih uzoraka poravnao sam s referentnim sekvencama gena *BZLF1* i subterminalne i terminalne regije gena *BRLF1* virusa EBV soja B95-8 (GenBank pristupni broj V01555.2) u programu MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Tamura i sur. 2021). U slučaju gena *BZLF1*, nakon preklapanja s referentnom sekvencom, uklonio sam dvije velike nepreklopljene regije koje odgovaraju intronskim sekvencama. Pomoću preklopljenih sekvenci zabilježio sam polimorfizme u sekvencama uzoraka u

usporedbi s referentnim sekvencama. Varijante gena *BZLF1* odredio sam prema klasifikaciji koju su koristili Luo i sur. (2011) i Lorenzetti i sur. (2014). S obzirom da nisam sekvencirao cijeli gen *BRLF1* te da ne postoje već definirane varijante koje obuhvaćaju samo terminalne regije, u njegovom slučaju samo sam zabilježio primijećene uzorke mutacija.

3.2.4 Statistička obrada rezultata

Nad rezultatima sam proveo deskriptivnu statistiku te Hi-kvadrat test kojim sam ispitao ovisnost detektiranih uzoraka mutacija gena *BZLF1* i *BRLF1*. Statistički značajnom smatrana je p vrijednost $< 0,05$. Za statističku obradu rezultata koristio sam kalkulator dostupan na mrežnoj stranici: <https://www.icalcu.com/stat/chisqtest.html>.

4. Rezultati

Sekvence gena *BZLF1* i subterminalne i terminalne regije gena *BRLF1* uspješno su umnožene i sekvencirane iz 33 izolata DNA iz periferne krvi pacijenata s infektivnom mononukleozom. U usporedbi s referentnom sekvencom soja B95-8, zabilježene su mutacije u dobivenim sekvencama te su uzorci na temelju uzoraka mutacija svrstani u skupine.

4.1 Varijacije gena BZLF1

U genu *BZLF1* detektirano je 17 lokusa s mutacijama, od kojih 9 dovode do promjene u primarnoj strukturi proteina. Uzorak mutiranih aminokiselina korišten je za klasifikaciju izolata prema shemi predstavljenoj u Luo i sur. (2011). Sekvence su svrstane prema četiri primijećena uzorka mutacija (Tablica 9.), koji su u slučaju potpunog poklapanja s navedenom shemom klasificirani kao prethodno definirane varijante.

Varijanta BZLF1-A, specifično podtip A2, u kojem su prisutne mutacije T68A, S76P, T124P, V146A, V152A, Q163L, Q195H i A205S, zabilježena je u 2 izolata (6,1%). Uzorak mutacija koji se od varijante BZLF1-A2 razlikuje u odsutnosti mutacije A205S, odnosno prisutnosti A206S označen je kao BZLF1-A2-Mut206. BZLF1-A2-Mut206 uzorak mutacija zabilježen je u 4 izolata (12,1%). Sekvence koje se od referentne sekvence B95-8 razlikuju samo u mutaciji A206S svrstane su pod uzorak mutacija označen kao BZLF1-Mut206 i identificirano ih je 17 (51,5%). Sekvence identične referentnoj odgovaraju varijanti BZLF1-C te je ona identificirana u 10 izolata (30,3%).

U transaktivacijskoj domeni BZLF1 (ak 1-167) nalazi se čak 6 od 9 lokusa sa detektiranim promjenama aminokiseline, ali samo su u 6 izolata (18,2%) imali prisutne mutacije. U DNA-vezujućoj domeni (ak 178-196) samo je jedan lokus bio mutiran, rezultirajući mutacijom Q195H također u 6 izolata (18,2%). Najčešće mutacije zamijećene su u dimerizacijskoj domeni (ak 197-221), sa mutacijom A205S u 2 izolata (6,1%), a mutacijom A206S u čak 21 izolatu (63,6%).

Tablica 9. Detektirane varijacije sekvence gena *BZLF1* u izolatima iz periferne krvi pacijenata s infektivnom mononukleozom.

Uzorak mutacija	Aminokiseline									Broj detektiranih sekvenci
	68	76	124	146	152	163	195	205	206	
B95-8	T a c c	S t c t	T a c a	V g t t	V g t g	Q c a a	Q c a a	A g c t	A g c c	
BZLF1-A2	A g c c	P c c t	P c c a	A g c t	A g c g	L c t a	H c a t	S t c t		2
BZLF1-A2-Mut206	A g c c	P c c t	P c c a	A g c t	A g c g	L c t a	H c a t		S t c c	4
BZLF1-Mut206									S t c c	17
BZLF1-C										10

- Brojevi u gornjem redu označavaju poziciju aminokiseline u primarnoj strukturi proteina BZLF1, ispod kojih su navedene odgovarajuće aminokiseline i nukleotidi referentne sekvence soja B95-8 i sekvenci uzoraka. Aminokiseline su označene velikim slovima, a nukleotidi malim slovima s podebljanim tekstom mutiranih nukleotida. U lijevom stupcu navedeni su uzorci mutacija u koje su svrstane dobivene sekvence, a u desnom stupcu koliko je sekvenci odgovaralo pojedinom uzorku mutacija.

4.2 Varijacije gena BRLF1

U subterminalnoj i terminalnoj regiji gena *BRLF1* mutacije su detektirane u 11 lokusa od kojih su 5 tihe mutacije (bez promjene u primarnoj strukturi proteina), a 6 ih dovodi do promjene aminokiseline. Za gen *BRLF1* ne postoje definirane varijante koje obuhvaćaju samo terminalne regije, pa su dobivene sekvence samo grupirane na temelju primijećenih ponavljajućih uzoraka mutacija, tvoreći četiri skupine (Tablica 10.).

Tablica 10. Detektirane varijacije sekvence subterminalne i terminalne regije gena *BRLF1* u izolatima iz periferne krvi pacijenata s infektivnom mononukleozom.

Uzorak mutacija	Aminokiseline										Broj detektiranih sekvenci
	436	478	479	484	486	489	510	539	541	542	
B95-8	V g t g	P c c g	V g t c	P c c a	P c c g	Q c a g	E g a a	M a t g	L c t g	S a g c	
BRLF1-1				P c c g			E g a g		L c t a	N a a c	15
				P c c g			E g a g	I a t t	L c t a	N a a c	1
BRLF1-2					P c c a	R c g g	E g a g			N a a c	3
	M a t g				P c c a	R c g g	E g a g			N a a c	4
BRLF1-3		P c c t	I a t c	P c c g	S t c g						7
BRLF1-4	M a t g										3

- Brojevi u gornjem redu označavaju poziciju aminokiseline u primarnoj strukturi proteina BRLF1, ispod kojih su navedene odgovarajuće aminokiseline i nukleotidi referentne sekvence soja B95-8 i sekvenci uzoraka. Aminokiseline su označene velikim slovima, a nukleotidi malim slovima s podebljanim tekstom mutiranih nukleotida. U lijevom stupcu navedeni su uzorci mutacija u koje su svrstane dobivene sekvence, a u desnom stupcu koliko je sekvenci odgovaralo pojedinom uzorku mutacija.

Zajednički uzorak mutacija od tri tihe mutacije 484(CCA>CCG), 510(GAA>GAG) i 541(CTG>CTA) te mutacije S542N otkriven je kod 16 izolata (48,5%) te je označen je kao BRLF1-1. Svi izolati sa prisutnim BRLF1-1 uzorkom mutacija grupirani su u istu skupinu, no treba napomenuti da jedan od izolata dodatno sadrži i mutaciju M539I. Svi izolati koji sadrže uzorak mutacija sa dvije tihe mutacije 486(CCG>CCA) i 510(GAA>GAG), te mutacijama Q489R i S542N, svrstani su u grupu označenu kao BRLF1-2. BRLF1-2 uzorak mutacija sadrži 7 izolata (21,2%), od kojih 4 ima prisutnu i dodatnu mutaciju V436M. Uzorak mutacija sa dvije tihe mutacije, 478(CCG>CCT) i 484(CCA>CCG), i mutacijama V479I i P486S označen je kao BRLF1-3 te je otkriven u 7 izolata (21,2%). Uzorak mutacija koji se od referentne sekvence razlikuje samo u mutaciji V436M označen je kao BRLF1-4, a otkriven je u 3 izolata (9,1%).

Sve navedene mutacije nalaze se u transaktivacijskoj domeni BRLF1, ali u glavnoj transaktivacijskoj regiji (ak 515-605) detektirano ih je 3 od kojih dvije dovode do promjene aminokiseline. To su mutacije M539I, koja je zabilježena samo u jednom izolatu (3,0%), i S542N, koja je ujedno i najčešća zabilježena mutacija koja dovodi do promjene aminokiseline, je pronađena u 23 izolata (69,7%).

4.3 Povezanost uzoraka mutacija gena BZLF1 i BRLF1

Distribucija uzoraka mutacija gena *BZLF1* i *BRLF1* u izolatima analizirana je dodatno primjenom Hi-kvadrat testa kako bi se utvrdila povezanost detektiranih uzoraka mutacija. Distribucija uzoraka mutacija prikazana je u Tablici 11.

Tablica 11. Distribucija uzoraka mutacija gena *BZLF1* i *BRLF1* u izolatima iz periferne krvi pacijenata s infektivnom mononukleozom.

	BZLF1-A2	BZLF1-A2-Mut206	BZLF1-Mut206	BZLF1-C
BRLF1-1	0	0	16	0
BRLF1-2	2	4	1	0
BRLF1-3	0	0	0	7
BRLF1-4	0	0	0	3

- U gornjem redu navedene su varijante i uzorci mutacija gena *BZLF1*, a u lijevom stupcu uzorci mutacija gena *BRLF1*.

Među izolatima, najviše je zabilježeno BZLF1-Mut206, odnosno BRLF1-1 uzoraka mutacija. U čak 16 izolata (48,5%) prisutna su oba navedena uzorka mutacija, što čini 100% (16/16) izolata sa detektiranim uzorkom mutacija BRLF1-1, odnosno 94,1% (16/17) izolata sa uzorkom mutacije BZLF1-Mut206. 28,6% (2/7), 57,1% (4/7), odnosno 14,3% (1/7) izolata sa BRLF1-2, sadrži i uzorak BZLF1-A2, BZLF1-A2-Mut206, odnosno BZLF1-Mut206, što čini 100% izolata sa uzorcima BZLF1-A2 (2/2) i BZLF1-A2-Mut206 (4/4). Također, 100% izolata sa uzorcima BRLF1-3 (7/7), odnosno BRLF1-4 (3/3), sadrži varijantu BZLF1-C. Distribucija uzoraka mutacija BZLF1 i BRLF1 pokazala je statistički značajnu međusobnu ovisnost ($p = 1,59 \times 10^{-9}$).

5. Rasprava

U ovom istraživanju su, po prvi puta na području Hrvatske, analizirani polimorfizmi sekvenci vrlo ranih litičkih gena *BZLF1* i *BRLF1* virusa Epstein-Barr, čiji produkti mogu reaktivirati virusni genom iz latencije. Sekvence su dobivene iz 33 izolata iz pacijenata sa akutnom infekcijom EBV-om.

U ovom su istraživanju na području Hrvatske detektirane dvije prethodno definirane varijante gena *BZLF1*, *BZLF1-A2* i *BZLF1-C*, ali i dva uzorka mutacija, *BZLF1-A2-Mut206* i *BZLF1-Mut206*, koji se razlikuju od prethodno definiranih varijanti u nedostatku mutacije *A205S*, odnosno prisustvu *A206S*. Mutacije *A205S* i *A206S* prethodno su detektirane kao varijante dimerizacijske domene te pretpostavljam da, iako nisu pokazale utjecaja na sposobnost dimerizacije *BZLF1* (Hicks i sur. 2001), supstitucije hidrofobnog s polarnim aminokiselinskim ostatkom mogu potencijalno utjecati na interakcije između *BZLF1* i drugih proteina (Grunewald i sur. 1998). Mutacija *A205S* zabilježena je u izolatima pacijenata s dijagnosticiranim limfomima, karcinomima nazofarinksa i želuca te zdravih donora s područja Azije, ali na poziciji 206 nije zabilježena mutacija *A206S*, nego *A206T* (Luo i sur. 2011, Yang i sur. 2014). Grunewald i sur. (1998) su na području Europe i Sjeverne Afrike detektirali mnogo veći udio mutacija *A206S* u tkivima karcinoma nazofarinksa nego u tkivima ostalih bolesti povezanih s EBV-infekcijom. Iako su u ovom istraživanju analizirani izolati iz pacijenata s infektivnom mononukleozom, također je *A206S* najčešće zamijećena mutacija te ovi rezultati, uz navedena prethodna istraživanja, sugeriraju da bi mutacija *A206S* mogla biti geografski ograničena.

U ovo istraživanju u izolatima je najzastupljeniji zabilježen uzorak mutacija *BZLF1-Mut206*, nakon čega slijedi varijanta *BZLF1-C*. Za razliku od područja Azije gdje je najčešća primijećena varijanta bila *BZLF1-A1* (Luo i sur. 2011), rezultati ovog istraživanja više odgovaraju rezultatima sa područja Južne Amerike, gdje je najzastupljenija varijanta bila *BZLF1-C* i to uglavnom u pacijenata sa infektivnom mononukleozom (Lorenzetti i sur. 2014) tj. korištenjem sličnog istraživačkog modela. Lorenzetti i sur. (2014) su u sekvencama tri izolata zabilježili mutaciju *A206S*, od kojih su dvije odgovarale uzorku mutacija koji je u ovom istraživanju označen kao *BZLF1-Mut206*. Međutim, zbog nedostatka ponovljivih obrazaca supstitucije, *BZLF1-Mut206* tada nije okarakteriziran kao nova podvarijanta te je nakon filogenetske analize svrstan kao *BZLF1-C*. S obzirom na veći udio detektiranih sekvenci sa uzorkom mutacija *BZLF1-Mut206*, ali i zabilježeni uzorak mutacija *BZLF1-A2-Mut206*,

rezultati ovog istraživanja ukazuju na moguće nove varijante prisutne u infektivnoj mononukleozi.

U ovom istraživanju u sekvencama *BRLF1* detektirane su 3 već prethodno zabilježene supstitucije V479I, Q489R i S542N (Jia i sur. 2010, Yang i sur. 2014), ali i 3 nove V436M, P486S i M539I. Također dvije od 5 tih mutacija, 486(CCG>CCA), 510(GAA>GAG), već su bile prethodno zabilježene na području Azije (Jia i sur. 2010). Najčešće zabilježena supstitucija u infektivnoj mononukleozi je S542N, koja je zahvaćala i većinu izolata zdravih donora i pacijenata sa dijagnosticiranim limfomima i karcinomima nazofarinksa i želuca s područja Azije te ona potencijalno može imati značajan utjecaj na transaktivacijsku aktivnost proteina BRLF1 (Jia i sur. 2010, Yang i sur. 2014). U ovom istraživanju sekvencirane su samo subterminalna i terminalna regija gena *BRLF1* stoga nije moguće klasificirati primijećene uzorke mutacija kao neke od dosad definiranih varijanti koje obuhvaćaju i ostatak gena. Međutim, rezultati ovog istraživanja su pokazali da uz supstitucije aminokiselina postoje i ponavljajući uzorci tih mutacija koji prethodno nisu bili detaljnije opisani.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je distribucija uzoraka mutacija gena *BZLF1* i *BRLF1* međusobo ovisna, što je zabilježeno i ranije (Yang i sur. 2014). Iako se uzorak mutacija BZLF1-Mut206 od varijante BZLF1-C razlikuje samo u mutaciji A206S, pokazana je značajna razlika u obrascu distribucije sa uzorcima mutacija *BRLF1*. BZLF1-Mut206 je u izolatima većinom zabilježen uz uzorak mutacija BRLF1-1, dok je varijanta BZLF1-C bila distribuirana sa uzorcima mutacija BRLF1-3 i BRLF1-4. Uzorci mutacije BZLF1-A2 i BZLF1-A2-Mut206 pokazuju veće sličnosti u distribuciji i uvijek su u izolatima zabilježeni uz uzorak mutacija BRLF1-2.

Rezultati ovog istraživanja mogu poslužiti kao podloga budućem istraživanju u kojem bi trebalo sekvencirati veći broj uzoraka i veći dio gena *BRLF1*. Na sekvencama bi trebalo provesti filogenetsku analizu kako bi se potencijalno definirale nove varijante gena *BZLF1* i provjerilo pripadaju li zabilježeni uzorci mutacija *BRLF1*, uključujući i tihe mutacije, novoj varijanti gena *BRLF1* u infektivnoj mononukleozi ili nekoj od dosad definiranih varijanti te mogu li oni poslužiti kao markeri za detekciju prisutnosti određenih varijanti. Većina dosadašnjih istraživanja molekularne raznolikosti virusa EBV bila je usmjerena na latentne gene virusa iako bi i reaktivacija kao i ekspresija litičkih gena mogle imati vrlo značajnu ulogu u nastanku i patogenezi malignih bolesti povezanih s ovim virusom te predstavljati mogući čimbenik vjerojatnosti njihove progresije (Bristol i sur. 2018, Lorenzetti i sur. 2014). Također,

dosadašnja istraživanja u ovom području su najčešće bila provedena na modelima različitih malignih bolesti tj. na izolatima virusa izoliranih iz karcinoma ili limfoma. Stoga zaključujem da je molekularna raznolikost vrlo ranih litičkih gena virusa EBV u akutnoj infekciji područje u kojem bi trebalo nastaviti genska istraživanja.

6. Zaključak

Sangerovim sekvenciranjem gena *BZLF1* i subterminalne i terminalne regije gena *BRLF1* virusa Epstein-Barr na modelu infektivne mononukleoze u izolatima iz Hrvatske detektirana su četiri uzorka mutacija u genima *BZLF1* i *BRLF1*. Dva uzorka mutacija gena *BZLF1* odgovarala su prethodno definiranim varijantama, BZLF1-A2 i BZLF1-C. Ostali uzorci mutacija označeni kao BZLF1-A2-Mut206 i BZLF1-Mut206, odnosno BRLF1-1, BRLF1-2, BRLF1-3 i BRLF1-4 mogu poslužiti kao podloga za definiciju novih varijanti dodatnom filogenetskom analizom. Distribucija uzoraka mutacija pokazala je značajnu međusobnu ovisnost, s najviše izolata u kojima su zabilježeni i BZLF1-Mut206 i BRLF1-1, koji su ujedno i najčešće zabilježeni uzorci mutacija dotičnih gena u svim izolatima. Najčešća mutacija u genu *BZLF1* je A206S te, uzimajući u obzir dosadašnja istaživanja u različitim geografskim regijama, ovakvi rezultati dodatno sugeriraju da je ova mutacija geografski ograničena. U genu *BRLF1* otkrivene su tri nove mutacije koje dovode do supstitucije, V436M, P486S i M539I, kao i tihe mutacije 478(CCG>CCT), 484(CCA>CCG), 486(CCG>CCA), 510(GAA>GAG) i 541(CTG>CTA) koje su detektirane u pravilnim uzorcima. Opisani rezultati nedvojbeno pokazuju da je potrebno detaljnije istražiti molekularnu raznolikost vrlo ranih litičkih gena virusa EBV.

7. Literatura

- Amon, W., Farrell, P. J. (2005): Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Reviews in Medical Virology* 15(3): 149-156.
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., Seguin, C., Tuffnell, P. S. (1984): DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein—Barr virus genome. *Nature* 310(5974): 207-211.
- Bernaumat, F., Gustems, M., Günther, J., Oliva, M.F., Buschle, A., Göbel, C., Pagniez, P., Lupo, J., Signor, L., Müller, C.W., Morand, P. (2022): Structural basis of DNA methylation-dependent site selectivity of the Epstein—Barr virus lytic switch protein ZEBRA/Zta/BZLF1. *Nucleic Acids Research* 50(1): 490-511.
- Bhende, P. M., Seaman, W. T., Delecluse, H. J., Kenney, S. C. (2004): The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nature Genetics* 36(10): 1099-1104.
- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L., Ascherio, A. (2022): Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* 375(6578): 296-301.
- Bristol, J.A., Djavadian, R., Albright, E.R., Coleman, C.B., Ohashi, M., Hayes, M., Romero-Masters, J.C., Barlow, E.A., Farrell, P.J., Rochford, R., Kalejta, R.F. (2018): A cancer-associated Epstein-Barr virus BZLF1 promoter variant enhances lytic infection. *PLoS Pathogens* 14(7): e1007179.
- Chang, C.M., Kelly, J.Y., 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 Research* 143(2): 209-221.
- Chang, L. K., Liu, S. T. (2000): Activation of the BRLF1 promoter and lytic cycle of Epstein—Barr virus by histone acetylation. *Nucleic Acids Research* 28(20): 3918-3925.

- Chang, P. J., Liu, S. T. (2001): Function of the intergenic region of BRLF1-BZLF1 bicistronic mRNA in translating the Zta protein of Epstein-Barr virus. *Journal of Virology* 75(3): 1142-1151.
- Chen, L., Li, N., Luo, C. (2012): Vaccines and Antiviral Drugs for Diseases Associated with the Epstein-Barr Virus. U: Garcia, M. L., Romanowski, V. (ur.) *Viral Genomes - Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions*. InTech, str. 241-260.
- Debuysschere, C., Nekoua, M. P., Hober, D. (2023): Markers of Epstein-Barr Virus Infection in Patients with Multiple Sclerosis. *Microorganisms* 11(5): 1262.
- Dunmire, S. K., Verghese, P. S., Balfour Jr, H. H. (2018): Primary Epstein-Barr virus infection. *Journal of Clinical Virology* 102: 84-92.
- Epstein, M. A., Achong, B. G., Barr, Y. M. (1964): Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *The Lancet* 283(7335): 702-703.
- Farrell, P. J. (2001): Epstein-Barr virus. The B95-8 strain map. U: Wilson, J.B., May, G.H.W. (ur.) *Epstein-Barr Virus Protocols. Methods in Molecular Biology*. Human Press, str. 3-12.
- Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W., Delecluse, H.J. (2000): The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *The EMBO Journal* 19(12): 3080-3089.
- Fujii, Y., Shimizu, T., Toda, T., Yanagida, M., Hakoshima, T. (2000): Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nature Structural Biology* 7(10): 889-893.
- Germini, D., Sall, F. B., Shmakova, A., Wiels, J., Dokudovskaya, S., Drouet, E., Vassetzky, Y. (2020): Oncogenic properties of the EBV ZEBRA protein. *Cancers* 12(6): 1479.
- Gruffat, H., Sergeant, A. (1994): Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R. *Nucleic Acids Research* 22(7): 1172-1178.
- Grunewald, V., Bonnet, M., Boutin, S., Yip, T., Louzir, H., Levrero, M., Seigneurin, J.M., Raphael, M., Touitou, R., Martel-Renoir, D., Cochet, C. (1998): Amino-acid change in the Epstein-Barr-virus ZEBRA protein in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas from Europe and North Africa. *International Journal of Cancer* 75(4): 497-503.

- Hammerschmidt, W., Sugden, B. (2013): Replication of Epstein–Barr Viral DNA. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 5(1): a013029.
- Hatton, O. L., Harris-Arnold, A., Schaffert, S., Krams, S. M., Martinez, O. M. (2014): The interplay between Epstein–Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. Immunologic Research 58: 268-276.
- Hicks, M. R., Balesaria, S., Medina-Palazon, C., Pandya, M. J., Woolfson, D. N., Sinclair, A. J. (2001): Biophysical analysis of natural variants of the multimerization region of Epstein-Barr virus lytic-switch protein BZLF1. Journal of Virology 75(11): 5381-5384.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): <https://ictv.global/taxonomy/> (pristupljeno 26. 06. 2023.).
- Jenkins, P. J., Binné, U. K., Farrell, P. J. (2000): Histone acetylation and reactivation of Epstein-Barr virus from latency. Journal of Virology 74(2): 710-720.
- Jia, Y., Wang, Y., Chao, Y., Jing, Y., Sun, Z., Luo, B. (2010): Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) *BRLF1* gene in nasopharyngeal and gastric carcinomas. Virology Journal 7(1): 1-8.
- Kalla, M., Schmeinck, A., Bergbauer, M., Pich, D., Hammerschmidt, W. (2010): AP-1 homolog BZLF1 of Epstein–Barr virus has two essential functions dependent on the epigenetic state of the viral genome. Proceedings of the National Academy of Sciences 107(2): 850-855.
- Kenney, S. C. (2007): Reactivation and lytic replication of EBV. U: Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K. (ur.) Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge, Cambridge University Press, str. 403-433.
- Lanz, T. V., Brewer, R. C., Ho, P. P., Moon, J. S., Jude, K. M., Fernandez, D., Fernandes, R. A., Gomez, A. M., Nadj, G. S., Bartley, C. M., Schubert, R. D. (2022): Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. Nature 603(7900): 321-327.
- Laux, G., Perricaudet, M., Farrell, P. J. (1988): A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. The EMBO Journal 7(3): 769-774.

- Lorenzetti, M. A., Gantuz, M., Altchek, J., De Matteo, E., Chabay, P. A., Preciado, M. V. (2014): Epstein–Barr virus *BZLF1* gene polymorphisms: malignancy related or geographically distributed variants?. *Clinical Microbiology and Infection* 20(11): 861-869.
- Luo, B., Tang, X., Jia, Y., Wang, Y., Chao, Y., Zhao, C. (2011): Sequence variation of Epstein-Barr virus (EBV) *BZLF1* gene in EBV-associated gastric carcinomas and nasopharyngeal carcinomas in Northern China. *Microbes and Infection* 13(8-9): 776-782.
- Luzuriaga, K., Sullivan, J. L. (2010): Infectious Mononucleosis. *New England Journal of Medicine* 362(21): 1993-2000.
- Manet, E., Rigolet, A., Gruffat, H., Giot, J. F., Sergeant, A. (1991): Domains of the Epstein-Barr virus (EBV) transcription factor R required for dimerization, DNA binding and activation. *Nucleic Acids Research* 19(10): 2661-2667.
- Miller, G., El-Guindy, A., Countryman, J., Ye, J., Gradoville, L. (2007): Lytic Cycle Switches of Oncogenic Human Gammaherpesviruses. *Advances in Cancer Research* 97: 81-109.
- Murata, T. (2018): Encyclopedia of EBV-Encoded Lytic Genes: An Update. U: Kawaguchi, Y., Mori, Y., Kimura, H. (ur.) *Human Herpesviruses. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, str. 395-412.
- Murata, T., Sugimoto, A., Inagaki, T., Yanagi, Y., Watanabe, T., Sato, Y., Kimura, H. (2021): Molecular Basis of Epstein–Barr Virus Latency Establishment and Lytic Reactivation. *Viruses* 13(12), 2344.
- Odumade, O. A., Hogquist, K. A., Balfour Jr, H. H. (2011): Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clinical Microbiology Reviews* 24(1): 193-209.
- Petosa, C., Morand, P., Baudin, F., Moulin, M., Artero, J. B., Müller, C. W. (2006): Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Molecular Cell* 21(4): 565-572.
- Price, A. M., Luftig, M. A. (2014): Dynamic Epstein–Barr virus gene expression on the path to B-cell transformation. *Advances in Virus Research* 88: 279-313.

- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021): MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022-3027.
- Thompson, M. P., Kurzrock, R. (2004): Epstein-Barr virus and cancer. *Clinical Cancer Research* 10(3): 803-821.
- Tsurumi, T., Fujita, M., Kudoh, A. (2005): Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Reviews in Medical Virology* 15(1): 3-15.
- Tzellos, S., Farrell, P. J., (2012): Epstein-Barr virus sequence variation—biology and disease. *Pathogens* 1(2): 156-175.
- Wille, C. K., Nawandar, D. M., Panfil, A. R., Ko, M. M., Hagemeyer, S. R., Kenney, S. C. (2013): Viral genome methylation differentially affects the ability of BZLF1 versus BRLF1 to activate Epstein-Barr virus lytic gene expression and viral replication. *Journal of Virology* 87(2): 935-950.

Životopis

Rođen sam 10. 3. 2000. godine u Zagrebu, završio sam Osnovnu školu Jure Kaštelana i XV. gimnaziju u Zagrebu. Za vrijeme srednje škole sudjelovao sam na državnim natjecanjima iz matematike i logike. Sveučilišni preddiplomski studij Molekularna biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 2018. godine, a završio 2021. godine, te sam iste godine upisao Sveučilišni diplomski studij Molekularna biologija u istoj ustanovi. Primao sam državnu stipendiju u STEM područjima znanosti od 2018. do 2021. godine. Od stranih jezika govorim engleski, a u slobodno vrijeme bavim se glazbom i učim svirati gitaru.