

Varijabilnost virusa Epstein-Barr na temelju promotora EBER u malignim tumorima

Galov, Roberto

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:217:594515>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Roberto Galov

**Varijabilnost virusa Epstein-Barr na temelju
promotora *EBER* u malignim tumorima**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Roberto Galov

**Epstein-Barr virus variability based on
EBER promoter in malignant tumors**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Petre Korać u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Molekularna raznolikost virusa Epstein-Barr“, voditeljice naslovne izv. prof. Snježane Židovec Lepej. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije .

Želim zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Petri Korać na pomoći, ljubaznosti i susretljivosti tijekom cijelog perioda izrade ovog rada kao i na iznimno zanimljivim i poučnim kolegijima i predavanjima za vrijeme mog preddiplomskog i diplomskog obrazovanja.

Zahvaljujem i prof. Valeriji Begić, mojoj „drugoj mentorici“, koja je tijekom cijelog perioda izrade ovog rada bila dostupna i spremna pomoći u vezi svih pitanja i poteškoća.

Zahvaljujem svojoj obitelji, a posebno sestri Martini, koji su ključan dio mog života i koji mi već 24 godine pružaju neizmjernu ljubav i podršku te bez kojih sva moja postignuća ne bi bila moguća.

Hvala svim prijateljima koje sam stekao na ovom studiju na podršci, kavama, zajedničkim učenjima i najvažnije druženjima koja su mi uljepšala i olakšala studentski život.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Varijabilnost virusa Epstein-Barr na temelju promotora *EBER* u malignim tumorima

Roberto Galov

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virus Epstein-Barr (EBV, od eng. *Epstein-Barr virus*) ljudski je onkogeni virus koji se može detektirati u organizmu više od 90% ljudske populacije. U većini slučajeva asimptomatski je prisutan u organizmu do domaćinove smrti ali povezan je i s nastankom mnogih ne malignih i malignih bolesti kao što su Hodgkinov limfom, T-stanični angioimunoblastični limfom i karcinom nazofarinksa. Opisana su dva tipa replikacijskog ciklusa EBV-a: litički i latentni. Na temelju latentnih gena EBV se može podijeliti na podtipove i njihove varijante koje pokazuju različitu geografsku rasprostranjenost. Molekule EBER male su molekule RNA prisutne u svim fazama latencije te imaju razne uloge u nastanku i razvoju malignih bolesti. U ovom istraživanju analizirane su sekvencije promotora *EBER* ukupno 91 pacijenta s područja Republike Hrvatske koji boluju od malignih bolesti. Prvi puta je proučena varijabilnost EBV-a na temelju promotora gena *EBER* te je konstruiran algoritam za određivanje novoopisanih podtipova i varijanti EBV-a. Rezultati su pokazali različitu zastupljenost varijanti u analiziranoj populaciji kao i statistički značajnu povezanost novih varijanti virusa s pojedinim dijagnozama malignih bolesti. Novoopisana varijabilnost EBV-a otvara vrata novim istraživanjima u svrhu boljeg razumijevanja genetike i onkogenog potencijala ovog virusa i njegovih interakcija s domaćinom.

Ključne riječi: EBV, algoritam, genska varijabilnost, cHL, T-AIL, NPC
(39 stranica, 9 slika, 7 tablica, 64 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Petra Korać

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Petra Korać
Nasl. izv. prof. dr. sc. Snježana Židovec Lepej
Prof. dr. sc. Inga Urlić

Rad prihvaćen: 05.09.2024

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Epstein-Barr virus variability based on *EBER* promoter in malignant tumors

Roberto Galov

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Epstein-Barr virus (EBV) is a human oncogenic virus which can be detected in the organism of over 90% of the human population. In most cases, it is asymptotically present in the organism until host's death, but is also a known cause of various non-malignant and malignant diseases such as Hodgkin's lymphoma, T-cell angioimmunoblastic lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. Two types of EBV replication cycle have been described: lytic and latent. Based on latent genes, EBV can be classified into subtypes and their variants which exhibit different geographical distribution. EBERs are small RNA molecules present in all stages of latency and play various roles in oncogenesis and tumor maintenance. In this study *EBER* promoter sequence was analyzed in 91 samples from Croatian patients with various malignant diseases. This study proposes EBV variability analysis based on *EBER* promoter and presents a new algorithm used to determine new EBV variants. The results showed unequal distribution of new variants within the analyzed population as well as statistically significant connection between new variants and specific diagnoses which opens the door to future studies with a goal of better understanding the genetics and the oncogenic potential of EBV.

Keywords: EBV, algorithm, gene variability, cHL, T-AIL, NPC
(39 pages, 9 figures, 7 tables, 64 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Petra Korać, PhD

Reviewers:

Prof. Petra Korać, PhD

Assoc. Prof. Snježana Židovec Lepej, PhD

Prof. Inga Urlić, PhD

Thesis accepted: 05.09.2024

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Virus Epstein-Barr	1
1.1.1. Građa viriona virusa Epstein-Barr.....	2
1.1.2. Organizacija genoma virusa Epstein-Barr.....	3
1.2. Replikacijski ciklus virusa Epstein-Barr.....	5
1.2.1. Litički ciklus.....	5
1.2.2. Latentni ciklus.....	6
1.3. Nekodirajuće RNA.....	7
1.4. EBER	8
1.5. Varijabilnost virusa Epstein-Barr.....	11
1.6. Virus Epstein-Barr i maligne bolesti.....	12
2. Cilj istraživanja	14
3. Materijali i metode	15
3.1. Uzorci.....	15
3.1.1. Izolacija DNA i umnažanje promotora <i>EBER</i>	16
3.1.2. Sekvenciranje	17
3.2. Metode	17
3.2.1. Preklapanje sekvencija	18
3.2.2. Poravnavanje sekvencija	20
3.2.3. Uređivanje sekvencija	21
3.2.4. Izrada algoritma za određivanje varijanti virusa Epstein-Barr na temelju varijabilnosti promotora <i>EBER</i>	23
3.2.5. Statistička obrada podataka.....	23
4. Rezultati	24
4.1. Algoritam za određivanje varijanti virusa Epstein-Barr prema sekvenciji promotora <i>EBER</i>	24
4.2. Povezanost varijanti virusa Epstein-Barr na temelju promotora <i>EBER</i> s istraživanim malignim bolestima	26
5. Rasprava	29
6. Zaključak	32
7. Literatura	33

Popis kratica

BART RNA – regija desnog transkripta RNA BamHI-A (od eng. *BamHI A fragment rightward transcript RNA*)

BHRF1 – desni otvoreni okvir za čitanje 1 fragmenta BamHI-H (od eng. *BamHI H fragment rightward open reading frame 1*)

BRLF1 – lijevi otvoreni okvir za čitanje 1 fragmenta BamHI-R (od eng. *BamHI R fragment leftward open reading frame 1*)

BZLF1 – lijevi otvoreni okvir za čitanje 1 fragmenta BamHI-Z (od eng. *BamHI Z fragment leftward open reading frame 1*)

CD21 – klaster diferencijacije 21 (od eng. *cluster of differentiation 21*)

cHL – klasični Hodgkinov limfom (od eng. *classical Hodgkin's lymphoma*)

CR2 – receptor komplementa tipa 2 (od eng. *complement receptor 2*)

EBER – mala molekula RNA kodirana EBV-om (od eng. *Epstein-Barr virus-encoded small RNA*)

EBNA – jezgreni antigen virusa Epstein-Barr (od eng. *Epstein-Barr virus nuclear antigen*)

EBV – virus Epstein-Barr (od eng. *Epstein-Barr virus*)

gB – glikoprotein ovojnice B

gH – glikoprotein ovojnice H

gL – glikoprotein ovojnice L

gp350 – glikoprotein ovojnice 350

gp42 – glikoprotein ovojnice 42

HL – Hodgkinov limfom (od eng. *Hodgkin's lymphoma*)

Hrv – hrvatska varijanta EBV-a

ISH – hibridizacija *in situ* (od eng. *in situ hybridization*)

LD – limfocitna deplecija (od eng. *lymphocyte depleted*)

LMP – latentni membranski protein (od eng. *latent membrane protein*)

LR – limfocitna predominacija (od eng. *lymphocyte rich*)

MC – miješana celularnost (od eng. *mixed cellularity*)

Med – varijanta EBV-a *Mediterranean*

miRNA – mikroRNA

NC – varijanta EBV-a *North Carolina*

NPC – karcinom nazofarinksa (od eng. *nasopharyngeal carcinoma*)

NS – nodularna skleroza (od eng. *nodular sclerosis*)

OR – omjer izgleda (od eng. *odds ratio*)

oriLyt – ishodišno mjesto litičke replikacije (od eng. *origin of lytic replication*)

oriP – ishodišno mjesto replikacije plazmida (od eng. *origin of plasmid replication*)

RIG-1 – geni inducibilni retinoičnom kiselinom I (od eng. *retinoic acid-inducible gene I*)

RS – Reed-Steinberg

SLL – limfom malih stanica (od eng. *small lymphocytic lymphoma*)

T-AIL – T-stanični angioimunoblastični limfom (od eng. *T-cell angioimmunoblastic lymphoma*)

TGF- β - faktor rasta tumora beta (od eng. *tumor growth factor β*)

TPA – tkivni aktivator plazminogena (od eng. *tissue plasminogen activator*)

TR – terminalna izravna ponavljanja (od eng. *terminal direct repeats*)

1. Uvod

1.1. Virus Epstein-Barr

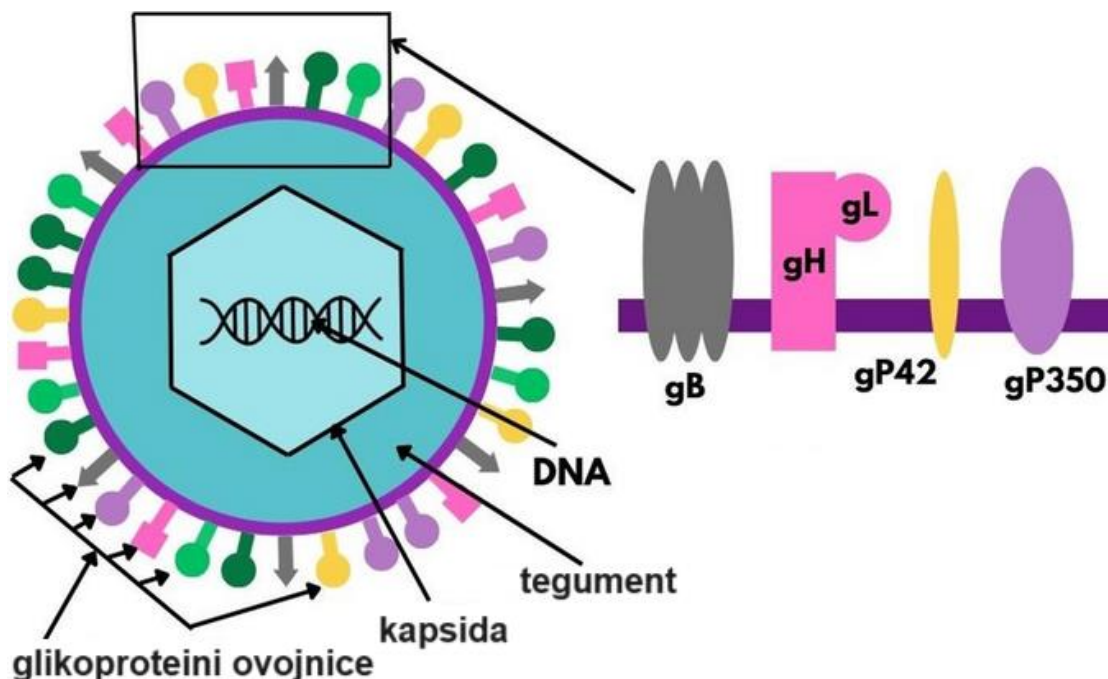
Virus Epstein-Barr (EBV, od eng. *Epstein-Barr virus*) ljudski je onkogeni virus koji pripada porodici *Orthoherpesviridae* i rodu *Lymphocryptovirus*. Pripada skupini herpesvirusa, a poznat je i pod nazivom ljudski gama-herpesvirus 4 (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2023). Prvi put je opisan 1964. godine, a otkriven je pri istraživanju Burkittova limfoma u Africi i ubrzo prepoznat kao uzročnik maligne transformacije B-limfocita *in vitro*, te je tako postao prvi opisani onkogeni virus. Naziv je dobio po staničnoj liniji u kojoj je prvi put opažen (EB1), koja je nosila naziv po dvoje znanstvenika koji su radili na projektu uzgoja tumorskih stanica Burkittova limfoma: dr. A. Epstein i Y. Barr (Epstein i sur., 1964).

EBV primarno zaražava B-limfocite, ali poznato je da inficira i epitelne stanice, pogotovo u osoba oslabljenog imunskog sustava. Prisutan je u organizmu većine ljudske populacije (> 90 %), ali u većini je slučajeva asimptomatski prisutan u organizmu do kraja domaćinova života. Do infekcije najčešće dolazi u ranom djetinjstvu, do pete godine života, a infekcije u kasnijim periodima života mogu uzrokovati pojavu infektivne mononukleoze (Nowalk i Green, 2016). EBV je povezan i s razvojem nekih autoimunih bolesti kao što su multipla skleroza i sistemski eritemski lupus (Bjornevik i sur., 2022, James i sur., 1997). Važan je etiološki faktor u nastanku oko 1% svih ljudskih malignih bolesti s preko 200 000 slučajeva godišnje (Shannon-Lowe i Rickinson, 2019).

EBV se često koristi kao model za istraživanje temeljnih mehanizama onkogeneze kod ljudi, a može pomoći i pri istraživanju boljih načina dijagnostike, terapije i prevencije malignih bolesti (Young i sur., 2016).

1.1.1. Građa viriona virusa Epstein-Barr

Virion EBV-a čini linearna dvolančana DNA duljine oko 172 kb koja se nalazi unutar ikosaedarske nukleokapside. Izvan kapside nalazi se tegument građen od proteina značajnih za razne procese kao što su replikacija virusa (Sathiyamoorthy i sur., 2016), reaktivacija replikacije (Liu i Cohen, 2016) te transport iz endotela u jezgru B-limfocita (Feederle i sur. 2016). Tegument je obavijen dvoslojnom lipidnom ovojnicom u koju su ugrađeni razni glikoproteini koji imaju ulogu u prepoznavanju B-limfocita i u procesu fuzije viriona s njima. Primjerice, gp350 je 901 aminokiselinu dug glikoprotein koji uspostavlja prvu vezu s B-limfocitima vežući se za stanični receptor komplementa tipa 2 (CR2, od eng. *complement receptor 2*) ili klaster diferencijacije 21 (CD21, od eng. *cluster of differentiation 21*) koji je bitan za razvoj imunskog odgovora (Rani i sur., 2021). Neki od ostalih glikoproteina prisutnih u ovojnici EBV-a su gp42, gB i kompleks gHgL (Slika 1).

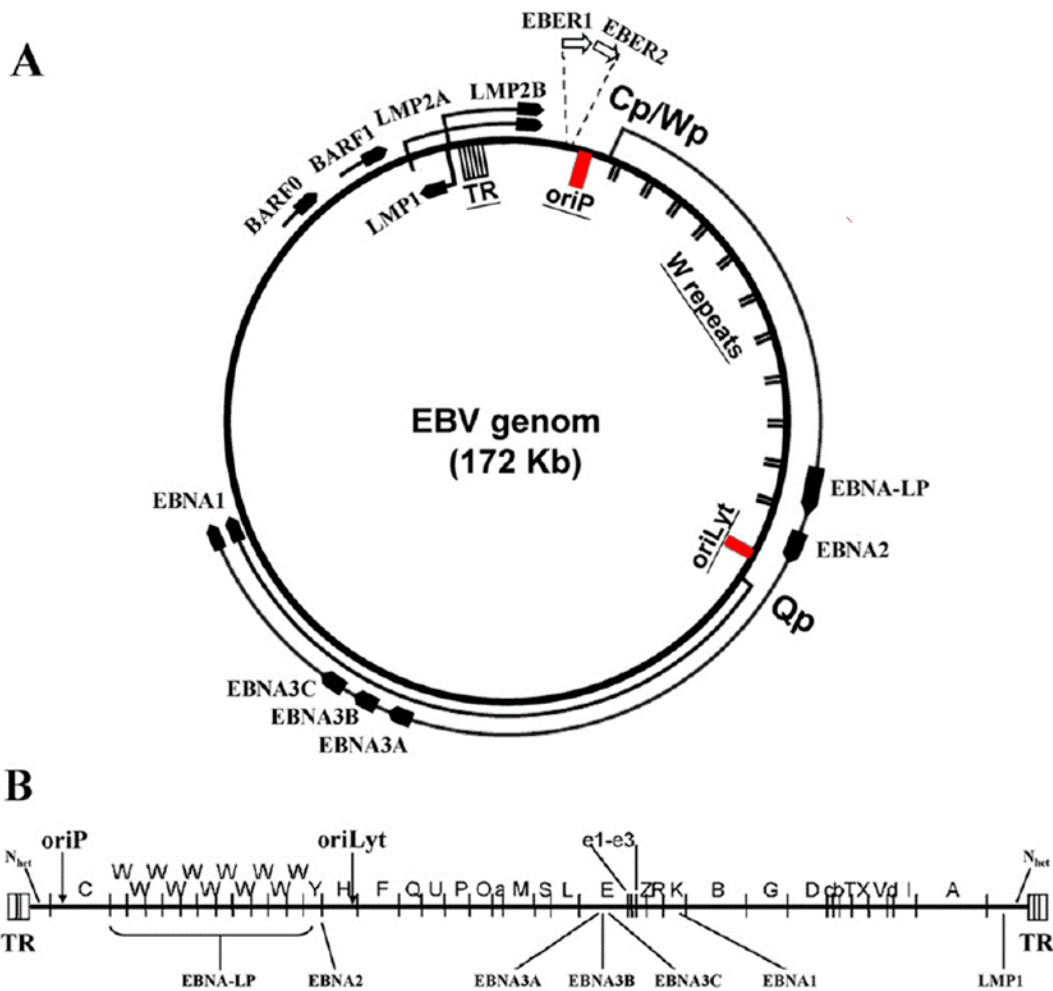


Slika 1. Shematski prikaz građe viriona virusa Epstein-Barr (lijevo) s uvećanim prikazom pojedinih glikoproteina prisutnih u ovojnici (desno) (preuzeto i prilagođeno iz Abdelfattah i sur., 2024)

1.1.2. Organizacija genoma virusa Epstein-Barr

Genom EBV-a prvi je kloniran i u potpunosti sekvenciran genom herpesvirusa. Genom laboratorijskog soja, prototipa B95-8, u cijelosti je sekvenciran 1984. godine te je sadržavao deleciju veličine oko 12 kb u odnosu na divlji soj (Baer i sur., 1984). Kasnije je ta delecija popunjena hibridizacijom prototipa B95-8 sa sekvencijama EBV-a soja *Raji*. Genom je dobiven sekvenciranjem iz biblioteke kloniranih fragmenata dobivenih korištenjem restriktivnog enzima BamHI pa se na dijelove genoma često referira slovima od A do Z, što označava određene fragmente BamHI (Tao i sur., 2006). Genom EBV-a sadrži oko 80 kodirajućih regija i kodira za 44 molekule mikroRNA (miRNA) (Cao i sur., 2021), a sadrži i 500 bp duga terminalna ponavljanja koja omogućavaju cirkularizaciju DNA te unutarne ponavljajuće sekvencije koje dijele genom na jedinstvenu dugu i kratku sekvencijsku domenu (Tao i sur., 2006).

Geni koji kodiraju proteine EBV-a dijele se na gene litičkog ciklusa i gene latentnog ciklusa, a virus kodira i mnoštvo molekula miRNA te dvije vrste malih molekula RNA kodiranih EBV-om (EBER, od eng. *Epstein-Barr virus-encoded small RNA*) (Slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz genoma EBV-a u cirkularnom (A) i linearnom obliku (B). Na prikazu A crvenom bojom označena su ishodišna mjesta replikacije plazmida (*oriP*, od eng. *origin of plasmid replication*) i litičke replikacije (*oriLyt*, od eng. *origin of lytic replication*). Pune crne strelice predstavljaju lokaciju i smjer transkripcije proteina bitnih za latentni ciklus virusa. EBNA-LP prepisuje se iz skupine ponavljajućih eksona u fragmentima BamHI W (W-ponavljanja). Sa svake strane terminalnih ponavljanja (TR, od eng. *Terminal repeats*) nalaze se eksoni koji zajedno sačinjavaju LMP-2. Vanjska linija predstavlja veliki transkript EBV-a koji je aktivan u trećem dijelu latentnog ciklusa (Lat III) i iz kojeg se prepisuju svi geni *EBNA*. Njihova transkripcija počinje od promotora Cp ili Wp te translacijom tog primarnog transkripta nastaju proteini EBNA. Unutarnjom, kraćom linijom označen je transkript EBNA-1 koji počinje od promotora Qp, a koji je značajan za Lat I i II. Bijele strelice označavaju EBER-1 i EBER-2; dvije male nepoliadenilirane molekule RNA s visokim stupnjem transkripcije koje su prisutne i nužne u svim stadijima latencije. Na prikazu B slovima su označeni fragmenti BamHI od kojih je sastavljen genom EBV-a. Regija N_{het} predstavlja varijabilnost u broju TR-ova u različitim staničnim izolatima ili klonovima o čemu ovisi i transkripcija LMP-2 (preuzeto i prilagođeno iz Tao i sur., 2006).

1.2. Replikacijski ciklus virusa Epstein-Barr

Opisana su dva tipa replikacijskog ciklusa EBV-a: litički i latentni ciklus. Ciklusi su regulirani mikrookolišem virusa i imunskim statusom domaćina. Litički ciklus karakterizira replikacija virusnih čestica te njihov izlazak iz stanica domaćina. To uzrokuje zaustavljanje rasta i razaranje stanica pa samim time i oštećenje tkiva domaćina, ali isto tako omogućuje i prijenos virusa na nove domaćine (Lee i sur., 2015). Suprotno tome, latentni ciklus obilježava zadržavanje virusa u stanici. Genom virusa zadržava se i ugrađuje u stanice domaćina kao cirkularni episom u staničnoj jezgri. U latentnoj fazi virus je u stanicama prisutan u samo oko 10 kopija i eksprimira jako ograničen broj gena. Virusni genom se tada replicira pomoću domaćinove DNA-polimeraze u S-fazi mitoze kako bi se broj virusnih kopija zadržao u što više stanica domaćina. Latentna faza EBV-a i njeni produkti povezani su s onkogenim potencijalom virusa (Kieff i Rickinson, 2001).

Prijelaz iz litičke u latentnu fazu naziva se utišavanje dok se prijelaz iz latentne u litičku fazu naziva reaktivacija. Još nije poznato kako potaknuti reaktivaciju *in vivo*, ali poznato je da neki kemijski i biološki agensi kao što su tkivni aktivator plazminogena (TPA, od eng. *tissue plasminogen activator*), natrijev butirat ili antitijela specifična za imunoglobuline mogu potaknuti reaktivaciju *in vitro* (Murata i Tsurumi, 2013).

1.2.1. Litički ciklus

Geni litičkog ciklusa dijele se u tri skupine: neposredno rane (IE), rane (E) i kasne (L) gene te se tim redoslijedom i ekspimiraju. Ishodište transkripcije gena litičkog ciklusa je oriLyt.

Glavni neposredno rani geni su *BZLF1* i *BRLF1*. To su takozvani molekularni okidači litičkog ciklusa koji su nužni za prijelaz iz latentne u litičku fazu. Ova dva gena se u genomu nalaze jedan pored drugog pa se smatra da se transkripcija svih neposredno ranih gena zajedno regulira epigenetskim procesima (metilacijom) (Murata i sur., 2013). Protein lijevog otvorenog okvira za čitanje 1 fragmenta BamHI-Z (*BZLF1*, ZEBRA, Zta, od eng. *BamHI Z fragment leftward open reading frame 1*) transkripcijski je faktor koji se veže na mjesto oriLyt i potiče transaktivaciju litičkih gena. Protein lijevog otvorenog okvira za čitanje 1 fragmenta BamHI-R (*BRLF1*, Rta, od eng. *BamHI R fragment leftward open reading frame 1*) je također transkripcijski faktor i

transaktivator litičkog ciklusa, ali njegova aktivacija je malo složenija od one BZLF1. On potiče transkripciju litičkih gena direktno se vežući na DNA preko svoje N-terminalne domene, putem interakcije s drugim transkripcijskim faktorima ili amplifikacijom signala nekih putova transdukcije. Neposredno rani geni induciraju transkripciju ranih gena (Murata, 2018).

Ranih gena ima mnogo, a njihova glavna zadaća je kodiranje enzima potrebnih za replikaciju DNA kao što je DNA-polimeraza BALF5 i enzima potrebnih za metabolizam nukleotida kao što je timidinska kinaza BXLF1. Neki od ostalih ranih gena su *BSLF1* (primaza), *BBLF4* (helikaza), *BALF2* (protein koji veže jednolančanu DNA) i drugi. Djelovanjem ovih proteina genom virusa može se umnožiti do preko 100 puta. Također, zadaća ranih gena je i poticanje ekspresije kasnih gena (Yap i sur., 2022). Produkti kasnih gena pomažu pri formiranju virusnih čestica. Neki od tih gena su *BCLF1* i *BDLF1* koji kodiraju proteine kapside, *BLRF2* i *BRRF2* su neki od gena koji kodiraju proteine tegumenta, dok *BILF2* i *BLLF2* kodiraju glikoproteine ovojnice (Murata, 2018).

1.2.2. Latentni ciklus

Ovisno o eksprimiranim genima, latentni ciklus dijeli se na četiri tipa: latencija (Lat) 0, I, II i III. U latentne gene spada šest jezgrenih antigena EBV-a (*EBNA*, od eng. *Epstein-Barr virus nuclear antigen*), tri latentna membranska proteina (*LMP*, od eng. *latent membrane protein*), dva tipa molekula EBER i molekule miRNA. U latenciji III dolazi do ekspresije najviše gena u odnosu na ostale stadije. To je faza kroz koju EBV prolazi unutar zaraženih B-limfocita za vrijeme primarne infekcije. U latenciji III dolazi do stvaranja produkata latentnog ciklusa kao što su EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBER-1, EBER-2 i BART miRNA (Kang i Kieff, 2015) (Tablica 1).

Jedan od najvažnijih latentnih proteina je EBNA-1 koji je nužan za održavanje postojanosti genoma i njegovu replikaciju u latenciji. EBNA-1 se specifično veže na ishodište plazmidne replikacije oriP fizičkom interakcijom preko C-terminalne domene (Young i Rickinson, 2004). Tim vezanjem EBNA-1 regrutira razne stanične proteine kao što su proteini zaduženi za staničnu diobu te tako osigurava diobu i virusnog genoma. U latenciji III, ekspresija proteina EBNA-1 regulirana je promotorom cP, dok u latenciji I tu ulogu preuzima promotor qP (Tempera i sur., 2010). EBNA-

1 ima i sposobnost vezanja episoma virusa za stanične kromosome preko N-terminalne domene čime se izbjegava degradacija virusne DNA u stanici domaćina te osigurava ravnomjerna raspodjela virusnog genoma u novonastalim stanicama nakon diobe (Westhoff Smith i Sugden, 2013). EBNA-2 i EBNA-LP transkripcijski su koaktivatori koji zajedno potiču virusne i stanične gene na transkripciju. Vežanjem za uzvodne elemente MYC i gene regulirane transkripcijskim faktorom MYC, mogu potaknuti stanicu na ulazak u stanični ciklus u svrhu proliferacije (Portal i sur., 2013).

Latentni membranski proteini LMP-1, LMP-2A i LMP-2B nastaju prepisivanjem s jednog zajedničkog lokusa s preklapajućim transkriptima. Aktivni su samo u latenciji II i III. LMP-1 nužan je za transformaciju B-limfocita te predstavlja jedan od glavnih onkogenih proteina EBV-a. LMP-1 oponaša signalni put receptora klastera diferencijacije 40 (CD40, od eng. *cluster of differentiation 40*) i receptora B-limfocita (BCR, od eng. *B-cell receptor*), a može djelovati i na razne molekule signalnog puta apoptoze. Na taj način se inducira signalni put kojim se nastavlja proliferacija stanice i izbjegava apoptoza (Kang i Kieff, 2015).

Tablica 1. Ekspresija gena u različitim tipovima latencije. Najmanja aktivnost prisutna je u latenciji 0 uz porast do latencije III kada je aktivnost gena najviša (preuzeto i prilagođeno iz Ahmed i Baiocchi, 2016)

TIP LATENCIJE	AKTIVNI GENI
0	<i>EBER-1, EBER-2</i>
I	<i>EBER-1, EBER-2, EBNA-1</i>
II	<i>EBER-1, EBER-2, EBNA-1, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B</i>
III	<i>EBER-1, EBER-2, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B</i>

1.3. Nekodirajuće RNA

EBV je prvi virus kod kojeg je dokazana ekspresija miRNA. U genomu su geni za miRNA prisutni u dva klastera: jedan klaster koji sadrži sekvencije za mRNA desnog otvorenog okvira za čitanje 1 fragmenta BamHI-H (BHRF1 od eng. *BamHI H fragment rightward open reading frame 1*) i jedan klaster koji sadrži sekvencije za mRNA regije desnog transkripta BamHI-A (od eng.

BamHI-A region rightward transcript). Ekspresijom prvog klastera nastaju tri prekursorske miRNA (BHRF1-1, BHRF1-2 i BHRF1-3) iz kojih nastaju četiri zrele molekule miRNA prisutne većinom u trećoj fazi latencije, dok sekvencija BART kodira 22 prekursorske miRNA (BART1-22) iz kojih nastaje ukupno 40 zrelih molekula miRNA prisutnih u svim fazama latencije (Pfeffer i sur., 2004).

Pomoću miRNA, virus može izbjeći imunski odgovor domaćina te djelovati na mehanizme stanične proliferacije i apoptoze, promovirajući onkogenezu. Ciljanjem ekspresije receptora za prepoznavanje uzoraka kao što su geni inducibilni retinoičnom kiselinom I (RIG-1, od eng. *retinoic acid-inducible gene 1*) ili receptori *toll-like* (TLR, od eng. *toll-like receptors*), miRNA mogu djelovati na prijenos signala i sintezu citokina potrebnih za imunski odgovor domaćina. miRNA reduciraju i ekspresiju faktora rasta tumora beta (TGF- β , od eng. *tumor growth factor β*) te tako sprečavaju prepoznavanje stanica karcinoma nazofarinksa (NPC, od eng. *nasopharyngeal carcinoma*) zaraženih virusom od strane prirodnih stanica ubojica (NK, od eng. *natural killer cells*). Također, mogu djelovati na sve razine prepoznavanja antigena: procesiranje antigena, njihov transport do glavnih molekula kompleksa tkivne podudarnosti (MHC, od eng. *major histocompatibility complex*) i samu prezentaciju antigena. Dokazana je povišena prisutnost molekula miRNA u velikom broju limfoma i karcinoma. Prisutnost nekih molekula miRNA povezana je sa smanjenom aktivnošću tumorskog supresora PTEN koji sudjeluje u regulaciji stanične proliferacije. Postoje još mnogi mehanizmi negativnog djelovanja miRNA EBV-a po domaćina, neki od njih još uvijek nepoznati (Židovec Lepej i sur., 2020).

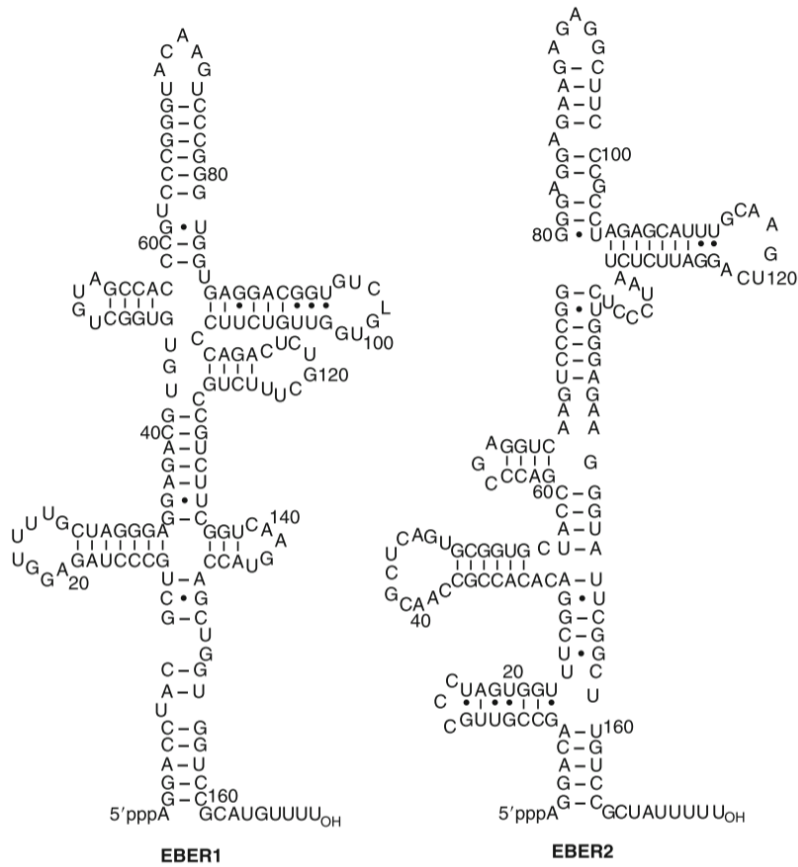
1.4. EBER

Molekule EBER-1 i EBER-2 male su, nepoliadenilirane molekule RNA koje kodira EBV te su najmnogobrojniji produkti genoma EBV-a u latentnom ciklusu. Nisu nužne za transformaciju B-limfocita ali su prisutne u svim tipovima latencije (Rymo, 1979). EBER-1 duga je 167 bp dok je EBER-2 duga 172 bp (Slika 3), a između njihovih gena nalazi se 161 bp duga regija u kojoj se nalazi njihov promotor *EBER* (Lee i sur., 2015). Transkribira ih RNA-polimeraza III (Pol III) za koju nose intragensku kontrolnu regiju. Iako je sličnost sekvencija EBER-1 i EBER-2 samo 54%, njihova sekundarna struktura jako je slična (Slika 3.) (Rosa i sur., 1981). Primarne sekvencije

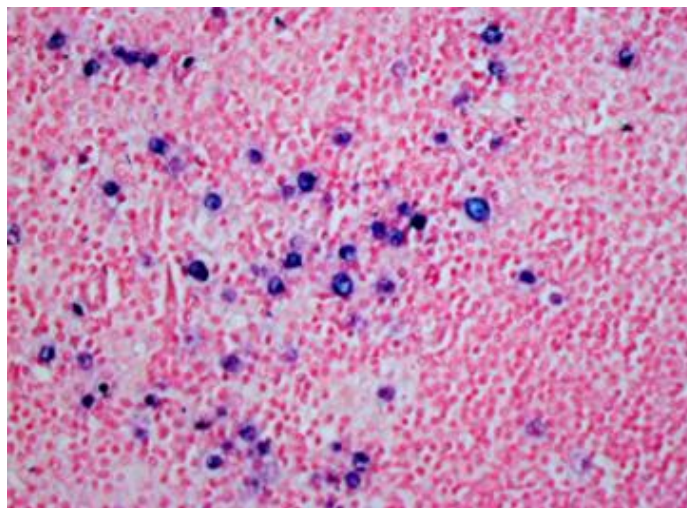
molekula EBER iznimno su konzervirane u različitim linijama EBV-a što ukazuje na njihovu važnost u životnom ciklusu virusa (Arrand i sur., 1989).

Mnogo je uloga EBER-a pri infekcijama te u razvoju i održavanju malignih bolesti. Poznato je da formiraju komplekse s proteinima u citoplazmi kao što je autoantigen La koji je povezan s razvojem sistemskog eritemskog lupusa (Iwakiri i sur., 2009). Molekule EBER se mogu vezati i na proteinsku kinazu R (PKR, od eng. *protein kinase R*) induciranu interferonom (IFN) što je nužno za antivirusno djelovanje IFN. Vezanjem, molekule EBER inhibiraju djelovanje PKR i tako virus dulje opstaje u stanici. Inhibicijom PKR može se blokirati i apoptoza inducirana interferonom alfa te put apoptoze FAS (Nanbo i sur., 2005). Molekule EBER induciraju transkripciju tri različita faktora rasta u različitim staničnim linijama te tako potiču i epitelnu i limfoidnu tumorigenezu (Iwakiri i Takada, 2010). Wu i sur. (2007) dokazali su da, iako molekule EBER nisu nužno potrebne za transformaciju B-limfocita, EBER-2 pokazuje mogućnost sudjelovanja u transformaciji dok EBER-1 nema to svojstvo. To ukazuje na činjenicu da, usprkos vrlo sličnoj strukturi i veličini, EBER-1 i EBER-2 imaju značajno različite uloge u infekciji i onkogenezi.

Zahvaljujući njihovoj mnogobrojnosti ($> 5 \times 10^6$ po stanici), molekule EBER (posebice EBER-1) mogu se koristiti kao pouzdan marker za detekciju stanica zaraženih EBV-om korištenjem hibridizacije *in situ* (ISH, od eng. *in situ hybridization*) (Slika 4) (Chang i sur., 1992).



Slika 3. Sekundarna struktura molekula EBER (preuzeto i prilagođeno iz Rosa i sur., 1981)



Slika 4. Detekcija stanica zaraženih EBV-om detekcijom molekula EBER pomoću metode EBER-ISH. Prikazane su stanice klasičnog Hodgkinovog limfoma, a stanice zaražene EBV-om obojene su plavo (preuzeto i prilagođeno iz Begić i sur., 2022).

1.5. Varijabilnost virusa Epstein-Barr

EBV se može podijeliti u dva podtipa: EBV-1 i EBV-2 (poznati i kao tipovi A i B). Podjela se temelji na varijabilnosti u sekvencijama gena *EBNA* (*EBNA-2*, *-3A*, i *-3C*). Varijabilnost po kojoj se razlikuju podtipovi najviše se očituje u genu *EBNA-2* koji između podtipova pokazuje samo 70%-tnu homologiju na nukleotidnoj te 54%-tnu na aminokiselinskoj razini dok ostali geni pokazuju razlike manje od 5% (Farrell, 2015). Poznato je da podtip EBV-1 ima veći potencijal transformacije B-limfocita u odnosu na EBV-2 (Rickinson i sur., 1987). Podtipovi pokazuju i različitu geografsku rasprostranjenost; EBV-1 je prisutan u cijelom svijetu dok se EBV-2 pojavljuje s povećanom učestalosti u Supsaharskoj Africi i Novoj Gvineji (Neves i sur., 2017).

Podtipovi EBV-a dalje se mogu dijeliti na varijante na temelju varijabilnosti gena *LMP-1* u odnosu na prototip B95-8. Uključujući prototip, identificirano je ukupno osam glavnih varijanti virusa: B95-8, *Alaskan* (AL), *China1*, *China2*, *China3*, *Mediterranean* (s delecijom od 30 bp i bez nje, Med+ i Med-) i *North Carolina* (NC) (Edwards i sur., 1999) iako postoje i druge varijante koje se pojavljuju s dosta manjom učestalosti kao što su dvije varijante *Southeastern Asia* (SEA1 i SEA2) (Smatti i sur. 2017). Varijante su nazvane po geografskoj lokaciji gdje je ta varijanta virusa izolirana. Kod jedne osobe moguće je detektirati više različitih varijanti virusa, međutim, klinički značaj koinfekcija još se istražuje (Münz, 2015).

U Republici Hrvatskoj dokazana je puno veća učestalost podtipa EBV-1 u odnosu na podtip EBV-2. Najveću učestalost u hrvatskoj populaciji pacijenata koji boluju od klasičnog Hodgkinovog limfoma čine divlji tip B95-8 i varijanta Med+ dok se varijante NC i Med- pojavljuju s dosta manjom učestalosti. Druge varijante nisu detektirane (Begić i sur., 2022). U hrvatskoj populaciji pedijatrijskih pacijenata koji boluju od infektivne mononukleoze, najučestalije varijante su: divlji tip B95-8, *China1*, Med- i NC dok se varijanta Med+ pojavljuje s dosta manjom učestalosti. Druge varijante virusa nisu detektirane (Židovec Lepej i sur., 2023).

Do sada nije napravljena podjela EBV-a na podtipove ili varijante na temelju varijabilnosti promotora *EBER*.

1.6. Virus Epstein-Barr i maligne bolesti

EBV je prvi virus prepoznat kao bitan etiološki faktor u razvoju nekih malignih bolesti. Kroz godine istraživanja, EBV je povezan s nastankom mnogih malignih bolesti, posebno s limfomima i karcinomima, putem raznih mehanizama koji promoviraju proliferaciju stanica, pomažu u izbjegavanju imunskog odgovora ili omogućavaju izbjegavanje apoptoze. Neke od bolesti za koje se EBV smatra etiološkim faktorom su: Burkittov limfom, Hodgkinov limfom, limfomi NK-stanica i T-limfocita, karcinom nazofarinksa i brojni drugi (Farrell, 2019).

Hodgkinov limfom (HL) rijetka je maligna bolest B-limfocita koja se pojavljuje u oko 9.000 slučajeva godišnje (Ansell, 2016). Poznata su dva glavna histopatološka oblika Hodgkinovog limfoma: nodularna limfocitna predominacija (NLPHL od eng. *nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma*) i klasični Hodgkinov limfom (cHL, od eng. *classical Hodgkin lymphoma*) koji se dalje dijeli na četiri podtipa: miješana celularnost (MCcHL, od eng. *mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma*), nodularna skleroza (NScHL, od eng. *nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma*), limfocitna predominacija (LRcHL, od eng. *lymphocyte rich classical Hodgkin lymphoma*) i limfocitna deplecija (LDcHL, od eng. *lymphocyte depleted classical Hodgkin lymphoma*) (Alaggio i sur., 2022). HL karakterizira transformacija B-limfocita u specifične multinuklearne tumorske stanice zvane Reed-Steinbergove stanice (RS, od eng. *Reed-Steinberg cells*). Kod slučajeva Hodgkinovog limfoma koji su inficirani EBV-om, detektirane su specifične protuapoptotske mutacije koje nisu prisutne u slučajevima bez infekcije EBV-om. Poznato je da na taj način EBV sprečava predviđenu apoptozu nekih B-limfocita koji se kasnije potencijalno mogu transformirati u RS-stanice (Vockerodt i sur., 2014). Razni produkti latentnog ciklusa EBV-a kao što su EBNA-1 i LMP-1 također imaju mogućnost poticanja mehanizama izbjegavanja imunskog odgovora domaćina inhibiranjem signalnih putova T-limfocita, kao i sposobnost supresije mehanizama zaduženih za sprečavanje rasta i razvoja RS-stanica (Murray i Young, 2019).

T-stanični angioimunoblastični limfom (T-AIL, od eng. *T-cell angioimmunoblastic lymphoma*) rijetka je maligna bolest zrelih T-limfocita. Pripada skupini perifernih T-staničnih limfoma te je najučestaliji limfom te skupine. Pojavljuje se s većom učestalosti u Europi u odnosu na druge dijelove svijeta i češće u starijoj populaciji (>60 godina). Bolest karakterizira jaka upalna reakcija i deregulacija imunskog sustava te uglavnom zahvaća folikularne pomoćničke T-

limfocite čija je glavna uloga aktivacija B-limfocita pri imunom odgovoru i njihova diferencijacija (Chiba i Sakata-Yanagimoto, 2020). EBV je povezan s oko 90% svih slučajeva T-AIL-a, a najčešće se detektira metodom EBER-ISH unutar velikih B-imunoblasta koji morfoloijom nalikuju na RS-stanice (Beer i Dorion, 2015). Postoje pretpostavke da T-AIL dovodi do imunodeficijencije koja pogoduje EBV-u i pokreće njegovu reaktivaciju u stanicama domaćina. Svojim onkološkim djelovanjem na T- i B-limfocite EBV pomaže u stvaranju i održavanju tumorskog mikrookoliša. Druga teorija je da EBV raznim mehanizmima djelovanja na pomoćničke T-limfocite inducira nastanak T-AIL-a (Dunleavy i Wilson, 2007). Točni mehanizmi djelovanja nisu u potpunosti razjašnjeni ali svi dokazi upućuju na značajnu povezanost između infekcije EBV-om i razvoj T-AIL-a.

Karcinom nazofarinksa (NPC, od eng. *Nasopharyngeal carcinoma*) maligna je bolest koja zahvaća epitelne stanice nazofarinksa. Prisutna je u cijelom svijetu, s povećanom učestalosti na područjima južne Azije, Bliskog istoka i sjeverne Afrike. Poznato je mnogo faktora koji utječu na razvoj ove bolesti, a jedan od najvažnijih okolišnih upravo je infekcija EBV-om (Chang i sur., 2021). Za vrijeme primarne infekcije, osim B-limfocita, poznato je da EBV može zaraziti i epitelne stanice nazofarinksa ovisno o tipu eksprimiranih glikoproteina u ovojnici virusa te tako započeti proces nastanka i razvoj karcinoma (Houen i Trier, 2020). Jedan od načina na koji EBV to uzrokuje je epigenetskom modifikacijom genoma domaćina putem modifikacije histona ili hipermetilacijom DNA. Na taj način može doći do smanjene transkripcije tumorskih supresora, smanjenja normalne transkripcije proteina i inaktivacije enzima koji sudjeluju u mehanizmima popravka DNA. Također, prijelaz iz litičke faze u latenciju unosi genomsku nestabilnost u stanice domaćina što dodatno djeluje na razvoj bolesti. Jedan od glavnih onkogenih mehanizama EBV-a je i mogućnost izbjegavanja imunskog odgovora domaćina. Molekule EBER mogu inaktivirati gene koje stimuliraju interferoni i tako inhibirati normalni imunski odgovor domaćina (Tsao i sur., 2017).

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je analizirati sekvencije promotora *EBER* u malignim limfomima inficiranih EBV-om te izraditi algoritam za identifikaciju podtipova virusa Epstein-Barr i njihovih varijanti prema tom promotoru. Hipoteza istraživanja je da promotor *EBER* određuje podtipove virusa koji zaražavaju različite maligne bolesti.

3. Materijali i metode

3.1. Uzorci

Za ovo istraživanje korištene su sekvencije promotora *EBER* (duljine 150 bp) virusa Epstein-Barr izolirane iz uzoraka tumorskog tkiva pacijenata oboljelih od Hodgkinovog limfoma (n=52), T-staničnog angioimunoblastičnog limfoma (n=11) i karcinoma nazofarinksa (n=28).

Uzorci tumorskog tkiva limfocitnog i epitelnog porijekla fiksirani su formalinom i uklopljeni u parafinske kocke (FFPE, od eng. *formalin-fixed, paraffin-embedded*). Svi uzorci prikupljeni su iz arhive Kliničke bolnice Merkur. Korišten je ostati biološki materijal prethodno korišten za histopatološke analize te je u njemu dokazana prisutnost EBV-a metodama imunohistokemijskog bojenja za detekciju proteina LMP-1 i/ili hibridizacijom *in situ* kojom se detektiraju molekule EBER (EBER-ISH). Korišteni su samo uzorci tkiva pacijenata koji nisu primili nikakvu terapiju prije uzorkovanja. Ovo istraživanje provedeno je u sklopu HRZZ projekta "Molekularna raznolikost virusa Epstein-Barr" (šifra projekta IP-2020-02-8961). Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo kliničke bolnice Merkur 25. rujna 2019. godine i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu 15. prosinca 2022. godine.

Od ukupno 52 pacijenta s dijagnozom klasičnog Hodgkinovog limfoma 37 je muškaraca i 15 žena u dobi od 10 do 87 godina (M = 56). Zastupljenost različitih cHL histoloških podtipova redom je: 22 MCcHL, 12 NCcHL, 3 LRcHL, 1 LDcHL, 3 slučaja limfoma malih stanica (SLL, od eng. *small lymphocytic lymphoma*) s transformacijom u cHL i 11 uzoraka nedeterminiranog podtipa. Od 11 pacijenata s dijagnozom T-staničnog angioimunoblastičnog limfoma, 6 je muškaraca i 5 žena u dobi od 49 do 82 godine (M = 70). Skupinu 28 pacijenata s dijagnozom karcinoma nazofarinksa činilo je 20 muškaraca i 8 žena, u dobi od 26 do 89 godina (M = 56) (Tablica 2).

Tablica 2. Podaci o pacijentima s dijagnosticiranim Hodgkinovim limfomom, T-staničnim angioimunoblastičnim limfomom i karcinomom nazofarinksa čiji su uzorci korišteni u ovom istraživanju.

Tip tumora		Broj pacijenata		Dob (godine)
		Žene	Muškarci	
cHL	MC	8	14	Žene 19-84
	NS	3	9	
	LR	0	3	
	LD	0	1	Muškarci 10-87
	SLL s transformacijom u cHL	2	1	
	Podtip nije determiniran	2	9	
T-AIL		5	6	Žene 61-81 Muškarci 49-82
NPC		8	20	Žene 50-89 Muškarci 26-83

3.1.1. Izolacija DNA i umnažanje promotora *EBER*

DNA tumorskih tkiva izolirana je iz FFPE rezova debljine 10 μm . Korišten je standardizirani komplet kemikalija Quick-DNA/RNA FFPE Kit (Zymo Research, CA, SAD) te je izolacija provedena prema protokolu proizvođača. Dobiveni izolati DNA pohranjeni su na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ciljana regija promotora *EBER* umnožena je pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR, od eng. *polymerase chain reaction*). Korištena je DNA-polimeraza GoTaq (Promega, SAD) i parovi početnica za umnažanje promotora *EBER* duljine 150 bp prema Lee i sur. (2015) i Gharibzadeh i sur. (2021) (Tablica 3). Uvjeti PCR reakcije navedeni su u Tablici 4.

Tablica 3. Početnice korištene za umnažanje promotora *EBER*

Tip početnice	Slijed nukleotida (5'-3')	Duljina amplikona	Referenca
uzvodna	GATCCAAACTTTAGTTTTAG	150 pb	Gharibzadeh i sur., 2021; Lee i sur., 2015
nizvodna	CGCAACCGTAACTCTATAC		

Tablica 4. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za umnažanje promotora *EBER*

Korak	početna denaturacija	40 ciklusa			završno produljenje lanaca	hlađenje
		denaturacija	vezanje početnica	produljenje lanaca		
temperatura	95 °C	95 °C	48 °C	72 °C	72 °C	4 °C
vrijeme	2 min	30 s	30 s	30 s	5 min	∞

3.1.2. Sekvenciranje

Prije sekvenciranja, PCR produkti najprije su pročišćeni korištenjem kompleta kemikalija ChargeSwitch PCR Clean-Up Kit (Life technologies, CA, SAD). Pročišćeni PCR-produkti poslani su u servis Macrogen (Republika Koreja) gdje je metodom prema Sangeru određen slijed nukleotida dobivenih amplikona. Dobivene uzvodne i nizvodne sekvencije pohranjene su u obliku datoteka .ab1 te su takve korištene za daljnju analizu.

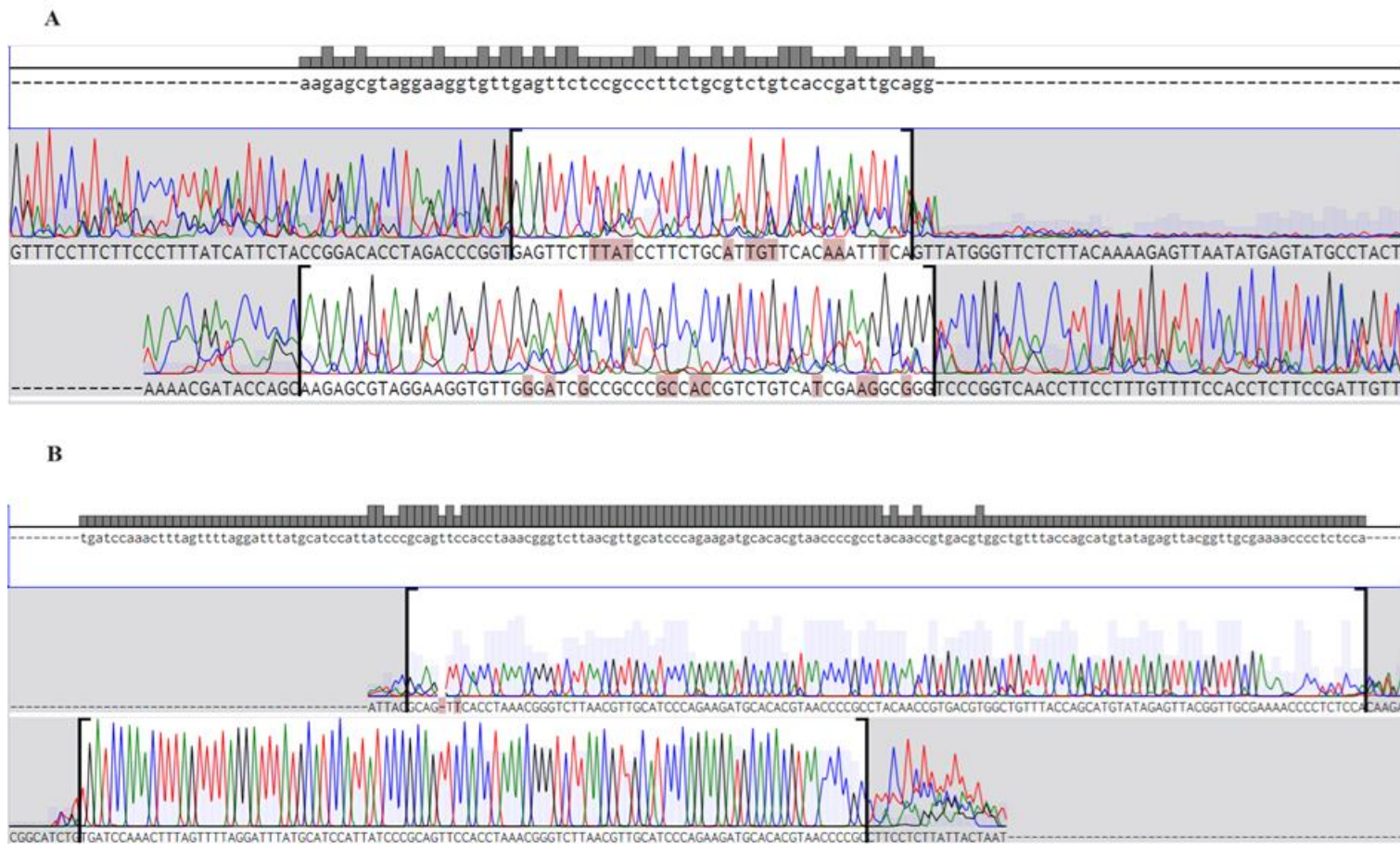
3.2. Metode

Uzorci su nazvani po skraćenici imena maligne bolesti (cHL, T-AIL, NPC) uz odgovarajući broj pacijenta: cHL1-52, T-AIL1-11 i NPC1-28.

Jedan pacijent uzorkovan je dva puta: prvi put uzorak je prikupljen iz limfnog čvora, a drugi uzorak prikupljen je biopsijom nosne šupljine i paranazalnih sinusa mjesec dana kasnije (NPC23A i NPC23B).

3.2.1. Preklapanje sekvencija

Za preklapanje dobivenih uzvodnih i nizvodnih (*forward* i *reverse*) sekvencija koristio sam program *Benchling* (Benchling Inc., San Francisco, CA). Koristio sam zadane postavke programa kako bih dobio preklapljene konsenzus sekvencije za daljnju analizu. Zbog loše kvalitete prvih sekvencija, neki su uzorci sekvencirani dva puta te sam za daljnju analizu koristio bolji od dva uzorka (Slika 5). To su uzorci cHL7, cHL26, cHL36, cHL47, T-AIL5, NPC1 i NPC23A. Na taj način analizirana je ukupno 91 sekvencija. Nakon odbacivanja neadekvatnih uzoraka, za daljnju analizu dobio sam ukupno 84 konsenzusne sekvencije koje sam pohranio u formatu FASTA.



Slika 5. Primjer (A) sekvencije neadekvatne za nastavak istraživanja i (B) kvalitetne sekvencije korištene u nastavku istraživanja. Prikaz u programu Benchling na primjeru sekvencija iz prvog (A) i drugog (B) sekvenciranja uzorka cHL7. Gornji red na slikama prikazuje preklapljenе konsenzus sekvencije dok donja dva reda prikazuju očitavanja uzvodnih i nizvodnih sekvencija s intenzitetom očitanih signala određenih nukleotida. U konsenzusnoj sekvenciji, puni sivi stupac označava da je taj nukleotid očitан na tom mjestu i u uzvodnoj i u nizvodnoj sekvenciji, dok polovični stupac označava da je očitani nukleotid prisutan samo u jednoj sekvenciji te je u konsenzusu zapisan onaj nukleotid koji daje jači signal

3.2.2. Poravnavanje sekvencija

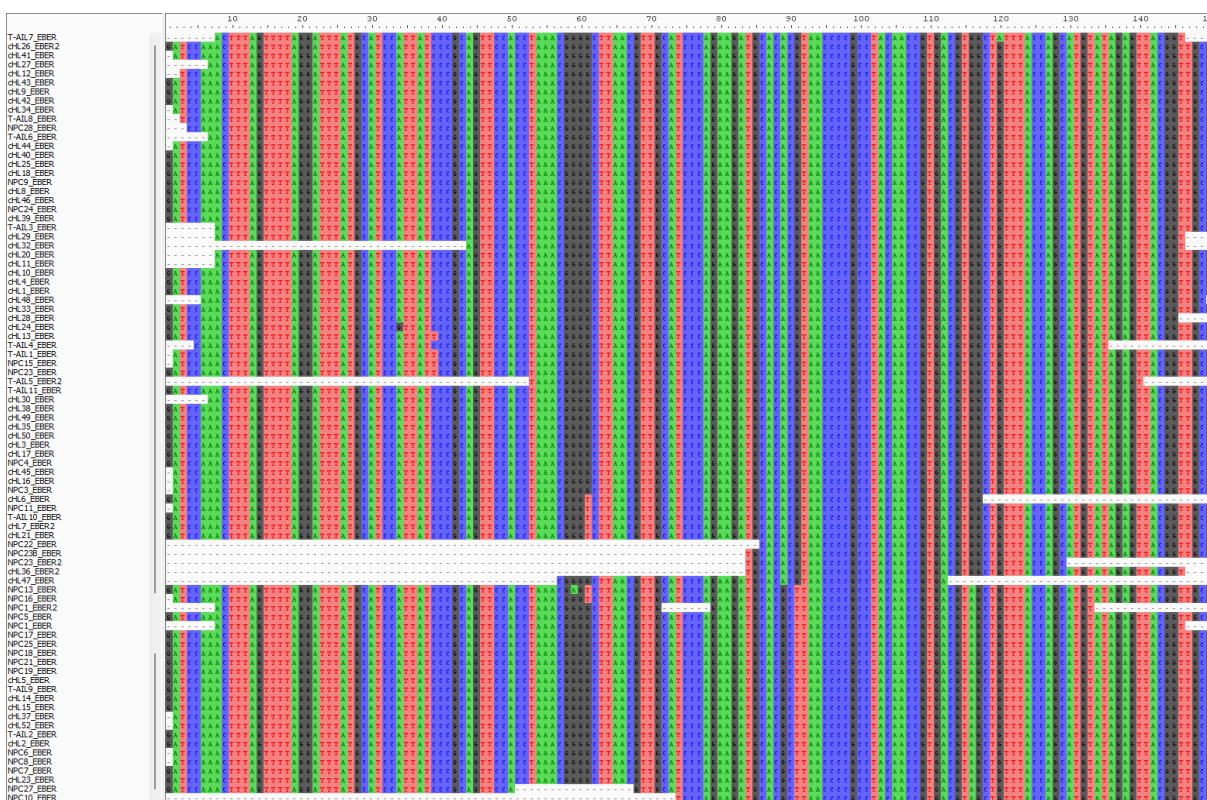
Dobivene konsenzusne sekvencije poravnao sam u programu *ClustalX* v.2.1. (Larkin i sur., 2007). Koristio sam zadane postavke programa i spremio podatke za daljnju analizu (Slika 6).



Slika 6. Prikaz svih (91) poravnatih sekvencija u programu ClustalX prije eliminacije neadekvatnih sekvencija. Različite boje označavaju različito očitane dušične baze: crvenom bojom označen je adenin (A), crvenom citozin (C), žutom gvanin (G) i zelenom bojom označen je timin (T). Sekvencije su poredane redosljedom određenim zadanim algoritmom programa ClustalX.

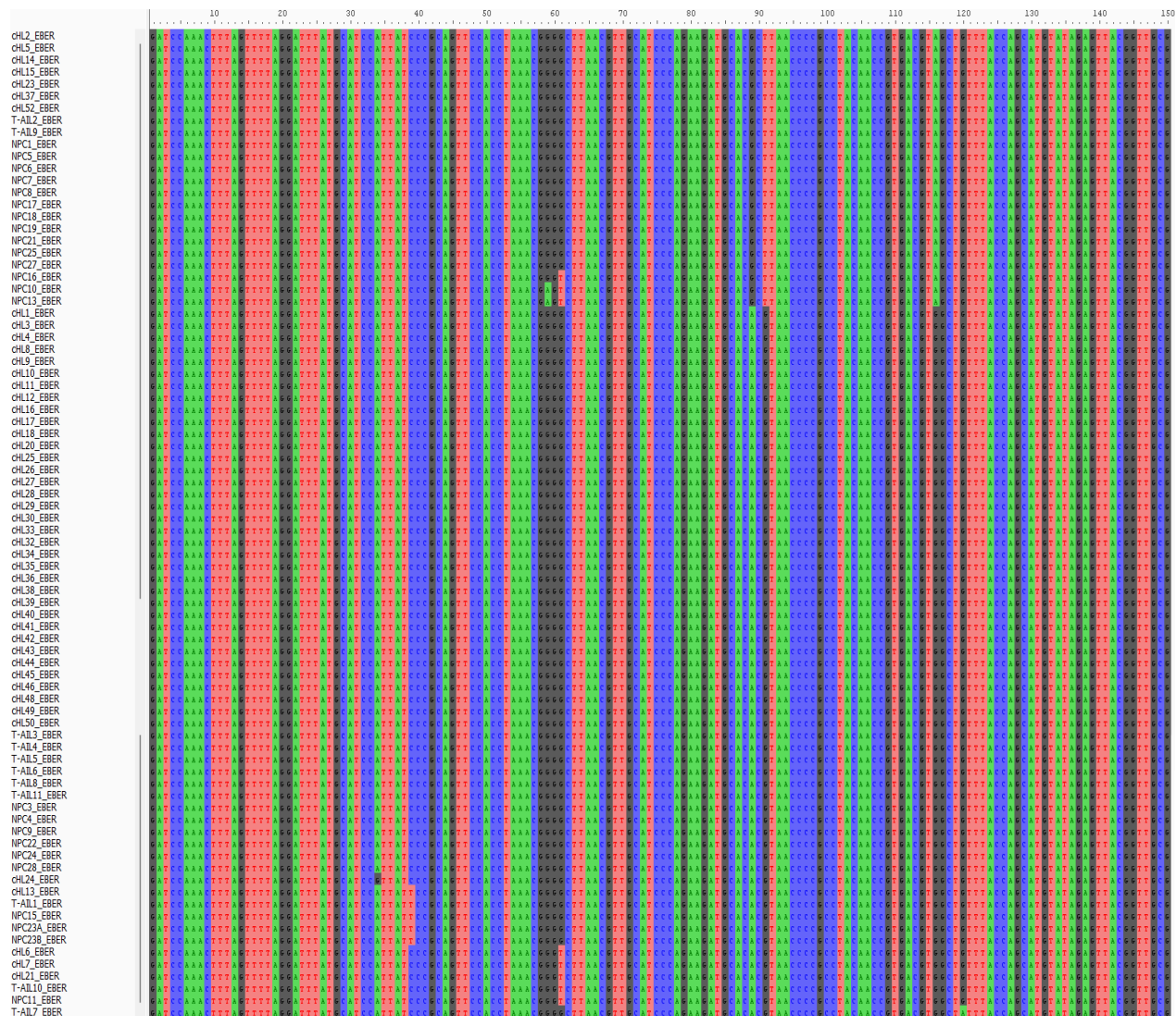
3.2.3. Uređivanje sekvencija

Za uređivanje sekvencija koristio sam program *AliView* v.1.17.1 (Larsson, 2014). Očitane sekvencije sadržavale su regije izvan područja željenih 150 parova baza (nizvodno od uzvodne sekvencije i uzvodno od nizvodne). Da bih to ispravio napravio sam korekciju krajeva varijabilnih duljina kako bih dobio sekvencije čija se duljina sastoji samo od početnica i regije između njih. Usporedbom s rezultatima iz programa *Benchling*, napravio sam ručnu provjeru svih sekvencija i korekciju dušičnih baza koje nisu davale samo jedan jasan signal. Ako se pojedino mjesto u sekvenciji moglo interpretirati na više načina na temelju jačine očitanoog signala, a jedan od signala predstavlja bazu koja je prisutna u velikoj većini ostalih sekvencija te je očekivana na tom mjestu, interpretirao sam je i ručno ispravio u očekivanu dušičnu bazu. Taj proces ponovio sam za sve sekvencije. Izrezivanjem krajeva i korekcijom baza dobio sam sekvencije prikazane na Slici 7.



Slika 7. Sekvencije promotora *EBER* u programu *AliView* nakon uređivanja. Sve prikazane sekvencije duge su najviše 150 bp, ograničene početnicama i izbačene su neadekvatne sekvencije. Različite boje označavaju različite dušične baze: zelena označava adenin (A), plava označava citozin (C), crna označava gvanin (G) i crvena boja označava timin (T). Sekvencije su poredane redosljedom određenim zadanim algoritmom programa *AliView*.

Nakon ručnog unosa očitanih baza lošije kvalitete koje program Benchling nije uspio očitati (nukleotidi van crnih granica vidljivih na Slici 5) i ispravka netočnih komplementarnih sekvencija, one sekvencije koje nisu sadržavale svih 150 parova baza nisam koristio u daljnjoj analizi. Na taj način odbacio sam dvije sekvencije: cHL22 i cHL47, te su mi konačno ostale 82 sekvencije prikazane na Slici 8.



Slika 8. Sekvencije promotora *EBER* u programu AliView nakon svih korekcija i ručnih unosa baza. Sekvencije su duge točno 150 bp te su prikazane redosljedom u odnosu na pozicije polimorfizma i abecednim redom unutar skupina jednakih sekvencija.

3.2.4. Izrada algoritma za određivanje varijanti virusa Epstein-Barr na temelju varijabilnosti promotora *EBER*

Pretraživanjem baze genoma NCBI pronašao sam dvije sekvencije prototipa B95-8 koje na istom mjestu u genomu sadrže međusobno identičnu sekvenciju promotora *EBER* dugu točno 150 parova baza. Jednu od te dvije sekvencije, sekvenciju prototipa B95-8 pod pristupnim brojem V01555, koristio sam za određivanje točne pozicije gena u genomu EBV-a i kao referentnu sekvenciju u nastavku analize.

Svaku pojedinu sekvenciju usporedio sam s referentnom pomoću programa *MEGA* v.10.2.6 (od eng. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Kumar i sur., 2018) koristeći zadane postavke programa. Kroz usporedbu identificirao sam sva polimorfna mjesta i razlike između referentne sekvencije i sekvencija uzoraka te točne pozicije tih promjena u genomu EBV-a. Koristeći dobivene podatke, sekvencije sam grupirao u podtipove i varijante virusa te izradio algoritam za njihovu identifikaciju po uzoru na algoritam za determinaciju varijanti gena *LMP-1* (Edwards i sur., 1999). Novo opisane podtipove i varijante imenovao sam u svrhu lakše identifikacije.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Za izračun statističkih podataka, izradu tablica i grafičkih prikaza koristio sam program Microsoft Excel v.2407. Fisherov test koristio sam za određivanje statističke značajnosti raspodjele podataka po kategorijama (raspodjelu varijanti EBV-a u tri istraživane maligne bolesti). Test omjera izgleda (OR, od eng. *odds ratio*) koristio sam za određivanje statističke značajnosti povezanosti pojedinih varijanti EBV-a s pojedinim malignim bolestima. Razina značajnosti bila je $P < 0,05$.

4. Rezultati

4.1. Algoritam za određivanje varijanti virusa Epstein-Barr prema sekvenciji promotora *EBER*

U ovom istraživanju analizirane su ukupno 92 sekvencije promotora *EBER* koji se u genomu EBV-a nalazi na poziciji 6796-6945, duljine 150 parova baza. Zbog loše kvalitete uzoraka, neki izolati nisu uspješno sekvencirani te nisu mogli biti korišteni u ovom istraživanju. To su uzorci: cHL19, cHL31, cHL51, NPC2, NPC12, NPC14, NPC20 i NPC26. Nakon analize, odbacivanjem sekvencija neprikladnih za analizu, konačan broj sekvencija iznosio je 82. Na temelju analize sekvencija i usporedbom s prototipom B95-8 izrađen je algoritam za određivanje podtipova i njihovih varijanti EBV-a na temelju varijabilnosti promotora *EBER* (Tablica 5).

Tablica 5. Prijedlog algoritma za određivanje varijanti virusa Epstein-Barr na temelju varijabilnosti promotora *EBER*.

Pozicija na genomu	Varijante virusa Epstein-Barr							
	B95-8	Hrv1 ^I	Hrv1 ^{II}	Hrv2 ^I	Hrv2 ^{II}	Hrv2 ^{III}	Hrv2 ^{IV}	Hrv2 ^V
6829	A				G			
6834	C					T		
6854	G		A					
6856	G	T	T				T	
6884	G			A	A	A	A	A
6886	T			G	G	G	G	G
6911	A			G	G	G	G	G
6915	G							A

Prema predloženom algoritmu, EBV se na temelju sekvencije promotora *EBER* može podijeliti na tri podtipa: podtip koji odgovara prototipnoj sekvenciji B95-8 i dva nova hrvatska

podtipa 1 i 2 (Hrv1 i Hrv2). Podtipovi su tradicionalno nazvani po geografskoj lokaciji gdje su izolirani. Hrv1 podtip dijeli se na dvije varijante: Hrv1^I i Hrv1^{II}. Hrv2 podtip dijeli se na pet varijanti: Hrv2^I, Hrv2^{II}, Hrv2^{III}, Hrv2^{IV} i Hrv2^V. Varijanta EBV-a određena je ukupno 81 pacijentu na temelju analize 82 sekvencije (Tablica 6).

Od analiziranih sekvencija, njih 20 odgovara prototipu B95-8. To su sekvencije: cHL2, cHL5, cHL14, cHL15, cHL23, cHL37, cHL52, T-AIL2, T-AIL9, NPC1, NPC5, NPC6, NPC7, NPC8, NPC17, NPC18, NPC19, NPC21, NPC25 i NPC27.

Varijanta virusa Hrv1^I razlikuje se od prototipa B95-8 samo na poziciji 6856 u genomu promjenom G>T. Od analiziranih sekvencija, samo jedna, NPC16, odgovara ovoj varijanti virusa.

Varijanta virusa Hrv1^{II} razlikuje se od prototipa B95-8 u dvije promjene: G>A promjenom na poziciji 6854 u genomu virusa te istom promjenom na poziciji 6856 (G>T). Od analiziranih sekvencija, dvije odgovaraju ovoj varijanti virusa. To su sekvencije NPC10 i NPC13.

Podtip virusa Hrv2 određen je promjenama G>A na poziciji 6884, T>G na poziciji 6886 i A>G na poziciji 6911. varijanta virusa Hrv2^I razlikuje se od prototipa B95-8 samo u tim promjenama. Od analiziranih sekvencija, njih 47 odgovara ovoj varijanti virusa. To su sekvencije: cHL1, cHL3, cHL4, cHL8, cHL9, cHL10, cHL11, cHL12, cHL16, cHL17, cHL18, cHL20, cHL25, cHL26, cHL27, cHL28, cHL29, cHL30, cHL32, cHL33, cHL34, cHL35, cHL36, cHL38, cHL39, cHL40, cHL41, cHL42, cHL43, cHL44, cHL45, cHL46, cHL48, cHL49, cHL50, T-AIL3, T-AIL4, T-AIL5, T-AIL6, T-AIL8, T-AIL11, NPC3, NPC4, NPC9, NPC22, NPC24 i NPC28.

Varijanta virusa Hrv2^{II}, osim promjenama koje određuju podtip Hrv2, razlikuje se od prototipa B95-8 promjenom A>G na poziciji 6829. Od analiziranih sekvencija, samo jedna, cHL24, odgovara ovoj varijanti virusa.

Varijanta virusa Hrv2^{III}, osim promjenama koje određuju podtip Hrv2, razlikuje se od prototipa B95-8 promjenom C>T na poziciji 6834. Od analiziranih sekvencija, njih pet odgovara ovoj varijanti virusa. To su sekvencije: cHL13, T-AIL1, NPC15, NPC23A i NPC23B tj. varijanta virusa Hrv2^{III} nađena je kod 4 pacijenta.

Varijanta virusa Hrv2^{IV}, osim promjenama koje određuju podtip Hrv2, razlikuje se od prototipa B95-8 promjenom G>T na poziciji 6856. Od analiziranih sekvencija, njih pet odgovara ovoj varijanti virusa. To su sekvencije: cHL6, cHL7, cHL21, T-AIL10 i NPC11.

Varijanta virusa Hrv2^V, osim promjenama koje određuju podtip Hrv2, razlikuje se od prototipa B95-8 promjenom G>A na poziciji 6915. Od analiziranih sekvencija, samo jedna, T-AIL7, odgovara ovoj varijanti virusa.

Tablica 6. Podjela pacijenata na temelju podtipa i varijante virusa prema predloženom algoritmu.

Varijanta	Broj pacijenata	Udio u ukupnom broju određenih podtipova (%)	Udio u ukupnom broju određenih varijanti (%)
B95-8	20	24,7	24,7
Hrv1^I	1	3,7	1,2
Hrv1^{II}	2		2,5
Hrv2^I	47	71,6	58,0
Hrv2^{II}	1		1,2
Hrv2^{III}	4		4,9
Hrv2^{IV}	5		6,2
Hrv2^V	1		1,2

4.2. Povezanost varijanti virusa Epstein-Barr na temelju promotora *EBER* s istraživanim malignim bolestima

Utvrđena je statistički značajna povezanost između varijanti promotora *EBER* i istraživanih malignih bolesti.

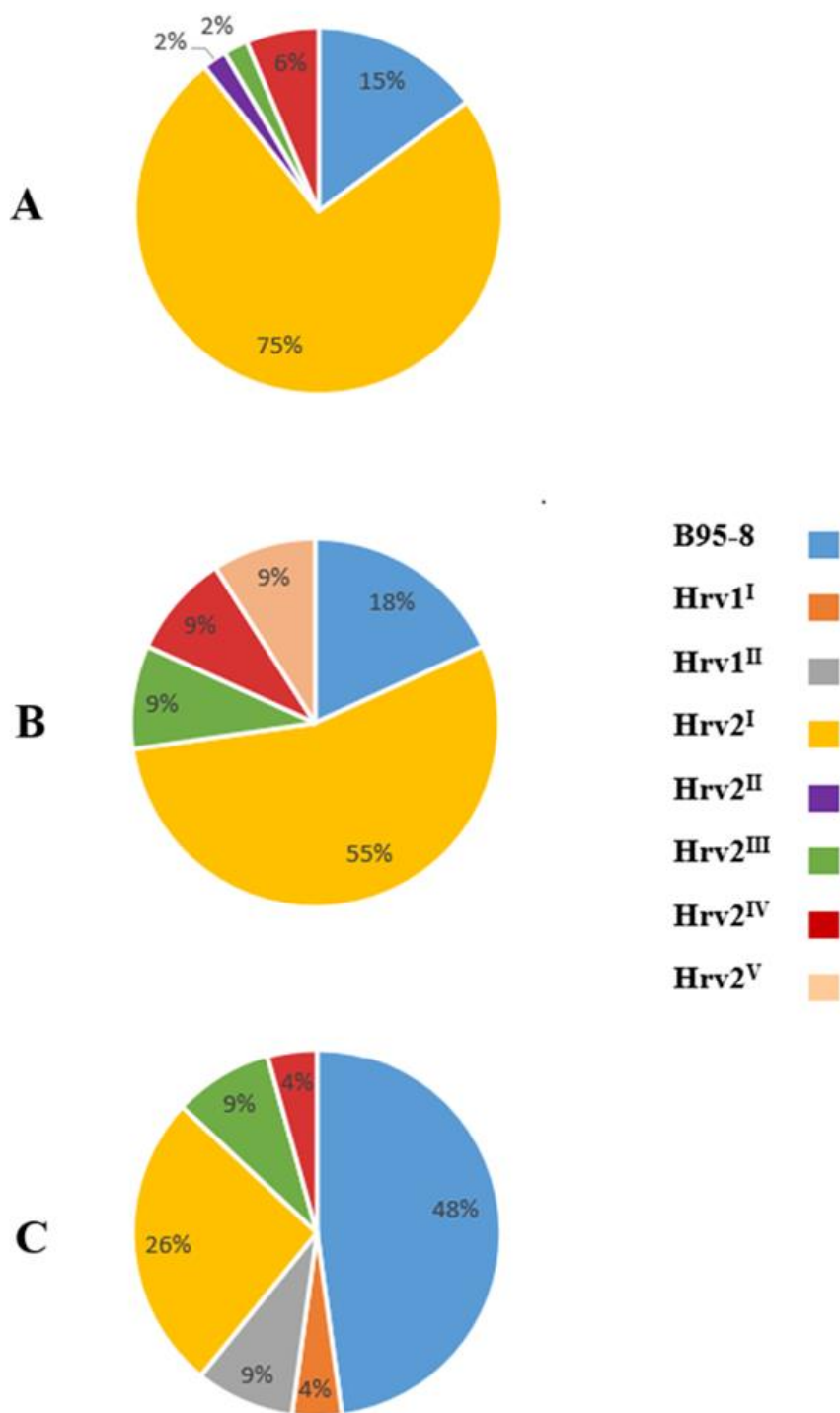
Varijanta Hrv2^I značajno je češća kod dijagnoze cHL i T-AIL u odnosu na dijagnozu NPC tj. značajno je rjeđa kod dijagnoze NPC u odnosu na ostale dijagnoze (OR = 6.83, 95% CI 2.30-20.30, P < 0.001) (Tablica 7, Slika 9).

Varijanta B95-8 značajno je češća kod dijagnoze NPC u odnosu na ostale dijagnoze tj. značajno je rjeđa kod dijagnoze cHL ili T-AIL u odnosu na dijagnozu NPC (OR = 0.20, 95% CI 0.07-0.59, P = 0.004) (Tablica 7, Slika 9).

Nije utvrđena statistički značajna povezanosti spola pacijenata, dobi pacijenata, i histološkog podtipa cHL s varijantama promotora *EBER* ($P > 0,05$).

Tablica 7. Varijante EBV-a na temelju promotora *EBER* prema istraživanim malignim bolestima..
Podebljane P-vrijednosti statistički su značajne.

EBV varijanta	cHL	T-AIL	NPC	P-vrijednost
B95-8	7	2	11	0,013
Hrv1^I	0	0	1	
Hrv1^{II}	0	0	2	
Hrv2^I	35	6	6	<0,001
Hrv2^{II}	1	0	0	
Hrv2^{III}	1	1	2	0,233
Hrv2^{IV}	3	1	1	0,999
Hrv2^V	0	1	0	



Slika 9. Udio varijanti EBV-a na temelju promotora *EBER* u (A) klasičnom Hodgkinovom limfomu, (B) T-staničnom angioimunoblastičnom limfomu i (C) karcinomu nazofarinksa.

5. Rasprava

U ovom istraživanju analizirane su 92 sekvencije promotora *EBER* u uzorcima 91 pacijenta s područja Republike Hrvatske koji boluju od tri različite maligne bolesti te je određena povezanost vrste malignog tumora s varijantom EBV-a na temelju varijabilnosti promotora *EBER*. Istraživanje je provedeno isključivo na pacijentima s područja Republike Hrvatske pa predstavlja dio jako male skupine istraživanja varijabilnosti EBV-a u ovom dijelu Europe (Židovec Lepej i sur., 2023, Banko i sur., 2016).

Rezultati istraživanja pokazali su da je EBV moguće podijeliti na podtipove i njihove varijante i na temelju promotora *EBER*. Analizom varijabilnosti sekvencija promotora *EBER* duljine 150 parova baza identificirano je ukupno osam polimorfni mjesta na temelju kojih su određene varijante virusa usporedbom s prototipnom sekvencijom B95-8 i konstruiran je novi algoritam za njihovu identifikaciju po uzoru na Edwards i sur. (1999). U ovom istraživanju, osim poznatog tipa B95-8, identificirana su dva podtipa virusa s ukupno sedam varijanti koji do sada nisu bili opisani u literaturi.

Novoopisani podtip Hrv1 minimalno se razlikuje od prototipne sekvencije B95-8. Razlika se očituje samo u promjeni jednog nukleotida na poziciji 6856 (G>T) u genomu, uz dodatnu promjenu na poziciji 6854 (G>A) za varijantu Hrv1^{II}. Zbog toga, ove bi se varijante mogle smatrati i varijantama prototipa B95-8. Međutim, s ciljem održavanja prototipne sekvencije nepromijenjenom u literaturi (Baer i sur., 1984, Edwards i sur., 1999, Židovec Lepej i sur., 2023) ove promjene definiraju se kao zaseban podtip te je prototipna sekvencija ostavljena bez varijanti. Podtip Hrv2 određen je razlikama na pozicijama 6884 (G>A), 6886 (T>G) i 6911 (A>G) koje se u svim uzorcima u kojima su prisutne javljaju zajedno.

Analiza distribucije podtipova virusa kod svih pacijenata kojima je podtip virusa mogao biti određen pokazuje najveću učestalost podtipa Hrv2 (71,6%) dok je s najmanjom učestalosti zastupljen podtip Hrv1 (3,7%).

Analiza distribucije varijanti virusa kod svih pacijenata kojima je varijanta virusa mogla biti određena pokazala je daleko najveću učestalost varijante Hrv2^I (58,0%) dok se na drugom mjestu po učestalosti nalazi varijanta prototipne sekvencije B95-8 (24,7%). Varijante Hrv1^I, Hrv2^{II} i Hrv2^V pokazuju najmanju učestalost te su opisane u samo uzorku samo jednog pacijenta (1,2%).

Varijanta virusa Hrv1^{II} pojavljuje se s malo većom učestalosti, ali kod samo dva pacijenta (2,5%). S obzirom na jako niske učestalosti u analiziranoj populaciji, postoji mogućnost da su opisane varijante zapravo rezultat pogrešnog očitavanja signala zbog varijabilne kvalitete uzoraka i sekvencija. Korišteni uzorci nisu svježi, a neki su stari i preko 15 godina. Bili su fiksirani u formalinu i uklopljeni u parafinske kocke što je svakako utjecalo na kvalitetu uzoraka pa tako i očitanih signala. Program Benchling dijelove nekih sekvencija nije mogao očitati zbog loše kvalitete signala pa su ti nukleotidi morali biti uneseni ručno za daljnju analizu. Zbog toga je postojanje ovih varijanti potrebno potvrditi u daljnjem istraživanju na većem broju uzoraka i potencijalno DNA izoliranom iz svježih, a ne arhivskih tkiva.

Navedene distribucije podtipova i varijanti pokazuju uzorke slične geografskoj distribuciji EBV podtipova na temelju gena *EBNA* i varijanti na temelju gena *LMP-1* (Neves i sur., 2017) s jednim podtipom i varijantom koji su dominantni po zastupljenosti u odnosu na druge (to su podtip Hrv2 i varijanta Hrv2^I) što ukazuje na potencijalnu povezanost novoopisanih podtipova i varijanti EBV-a i već postojećih. Begić i sur. (2022) analizirali su varijabilnost EBV-a na temelju gena *LMP-1* koristeći ista 52 uzorka cHL koja su korištena i u ovom istraživanju. Rezultati su pokazali prisutnost isključivo EBV-1 podtipa i najveću učestalost prototipne varijante B95-8 i varijante *Mediterranean* s delecijom. Usporedba određenih varijanti na temelju gena *LMP-1* i promotora *EBER* analizom istih uzoraka nije pokazala poveznicu između pojedinih varijanti na temelju gena *LMP-1* i novoopisanih varijanti EBV-a na temelju varijabilnosti promotora *EBER*. Manjak povezanosti najviše je izražen kod determinacije prototipne varijante B95-8 koja u dvije analize korištenjem istih uzoraka nije pokazala jednaku zastupljenost i nije određena istim pacijentima. Židovec Lepej i sur. (2023) analizirali su varijabilnost EBV-a na temelju gena *LMP-1* u hrvatskoj populaciji 73 pedijatrijska pacijenta koji boluju od infektivne mononukleoze. Rezultati su pokazali najveću učestalost prototipne varijante B95-8 uz manju učestalost varijanti *China1* i *Mediterranean* bez delecije što ne odgovara distribuciji varijanti iz ovog istraživanja. Dodatna istraživanja su potrebna kako bi se bolje proučila povezanost između novoopisanih varijanti EBV-a na temelju varijabilnosti promotora *EBER* i već opisanih varijanti na temelju varijabilnosti gena *LMP-1*.

Osim osam opisanih polimorfničkih pozicija, analizirane sekvencije i prototipna sekvencija međusobno imaju još neke razlike. Najveća razlika prisutna je na posljednja tri nukleotida gdje je vidljiva promjena CGC>GCG. Navedena promjena nalazi se u području početnica za umnažanje

Početnice korištene u ovom istraživanju za umnažanje regije promotora *EBER* preuzete su iz rada Gharibzadeh i sur. (2021) koji su ih preuzeli iz rada od Lee i sur. (2015). Međutim, te početnice nisu jednake te se razlikuju u već navedena posljednja tri nukleotida. U bazi NCBI nema sekvencije koja odgovara sekvenciji u potpunosti komplementarnoj početnicama prema Gharibzadeh i suradnika (2021) . Druga razlika nalazi se na poziciji 6808 u genomu virusa. Riječ je o promjeni T>A koja je prisutna u svim analiziranim sekvencijama jer se i ona nalazi u području početnica, no ta se sekvencija može naći u bazi NCBI (na primjer, sekvencija pod pristupnim brojem MG298843) pa bi ova promjena mogla predstavljati i potencijalno deveto polimorfno mjesto na temelju kojeg se mogu proširiti saznanja o varijabilnosti promotora *EBER* u daljnjim istraživanjima.

Analiza povezanosti EBV varijanti s istraživanim malignim bolestima pokazala je povezanost varijante B95-8 s karcinomom nazofarinksa i varijante Hrv2¹ s tumorima limfoidnog porijekla. Usporedba ovih rezultata sa sličnim rezultatima dobivenim na temelju analize već postojećih varijanti na temelju gena *LMP-1* nije jednoznačna. Povezanost već postojećih varijanti EBV-a i pojedinih dijagnoza još uvijek nije dokazana. Farrell i White (2022) zaključili su kako postoji mogućnost povezanosti podtipova EBV-a s dijagnozama NPC-a u južnoj Kini. Međutim, za dokazati tu povezanost potrebno je bolje istražiti točne mehanizme djelovanja različitih varijanti na nastanak i razvoj bolesti. Neves i suradnici (2017) zaključili su kako izraženija sposobnost transformacije B-limfocita podtipa EBV-1 može upućivati na različito djelovanje varijanti na razvoj pojedinih bolesti s obzirom na to da je većina genske varijacije EBV-a prisutna u genima koji sudjeluju u transformaciji stanica. Navode i kako je tu vezu teško dokazati s obzirom na specifičnu geografsku rasprostranjenost varijanti EBV-a što značajno utječe na statističke podatke jer je većina dosadašnjih istraživanja na ovu temu provedeno na azijskim populacijama. Briercheck i suradnici (2024) također stavljaju naglasak na geografsku rasprostranjenost varijanti EBV-a te upozoravaju na donošenje zaključaka o povezanosti varijanti s različitim dijagnozama u geografski ograničenim istraživanjima kao što je ovo. Zaključno, geografska rasprostranjenost uvjetuje varijabilnost EBV-a u populaciji dok različite varijante EBV-a potencijalno pridonose različitoj učestalosti razvoja bolesti. Druga mogućnost je da su i učestalost EBV varijanti i učestalost različitih bolesti povezani s geografskom rasprostranjenosti te da iz te zajedničke veze proizlazi njihova međusobna statistički značajna povezanost. U svakom slučaju, sve tri komponente

(varijante virusa, vrste malignih bolesti i geografska rasprostranjenost) dio su kompleksnog sustava čije interakcije još uvijek nisu u potpunosti jasne te je potrebno provesti daljnja istraživanja.

Analize varijabilnosti virusa i povezanosti varijanti s nastankom i razvojem malignih i ne-malignih bolesti od iznimne su važnosti za bolje razumijevanje mehanizama djelovanja virusa, kao i za potencijalan razvoj novih dijagnostičkih pristupa i terapija (Kanda i sur., 2019). Ovo istraživanje predstavlja prvu analizu varijabilnosti promotora *EBER* u svijetu te prvu podjelu EBV-a na temelju te varijabilnosti što otvara vrata novim pristupima istraživanja EBV-a u budućnosti.

6. Zaključak

Rezultati analize sekvencija promotora *EBER* pokazali su da je na temelju varijabilnosti promotora *EBER* moguće napraviti podjelu EBV-a na podtipove i njihove varijante te je izrađen algoritam po kojem su jasno definirane i imenovane novoopisane varijante. Identificirana su dva nova podtipa virusa s ukupno sedam novih varijanti. Statističkom analizom dokazana je značajna povezanost novoopisanih varijanti EBV-a s pojedinim malignim bolestima na području Republike Hrvatske. Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se bolje razumjela geografska distribucija varijanti na temelju ove podjele te mehanizmi djelovanja različitih varijanti na nastanak i razvoj bolesti.

7. Literatura

1. Abdelmonem, M., Abdullah, C. A. C., Bastawecy, I. M., Raof, A. M. A., Afify, A. F., el Naggat, R. F., Rohaim, M. A. i Munir, M. (2024). Antiviral Nanomedicine-Based Approaches against Epstein-Barr Virus Infection. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, 16(2), 58–71.
2. Ahmed, E. H. i Baiocchi, R. A. (2016). Murine Models of Epstein-Barr Virus-Associated Lymphomagenesis. *ILAR journal*, 57(1), 55–62.
3. Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Araujo, I. B. O., Berti, E., Bhagat, G., Borges, A. M., Boyer, D., Calaminici, M., Chadburn, A., Chan, J. K. C., Cheuk, W., Chng, W. J., Choi, J. K., Chuang, S. S., Coupland, S. E., Czader, M., Dave, S. S., de Jong, D., ... i Xiao, W. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, 36(7), 1720–1748.
4. Ansell, S. M. (2016). Hodgkin lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 91(4), 434–442.
5. Arrand, J. R., Young, L. S., i Tugwood1, J. D. (1989). Two Families of Sequences in the Small RNA-Encoding Region of Epstein-Barr Virus (EBV) Correlate with EBV Types A and B. *Journal of Virology*, 63(2).
6. 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. i Séguin, C. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310(5974), 207–211.
7. Banko, A. v., Lazarevic, I. B., Folic, M. M., Djukic, V. B., Cirkovic, A. M., Karalic, D. Z., Cupic, M. D. i Jovanovic, T. P. (2016). Characterization of the variability of Epstein-Barr virus genes in nasopharyngeal biopsies: Potential predictors for carcinoma progression. *PLoS ONE*, 11(4).
8. Beer, T. i Dorion, P. (2015). Angioimmunoblastic T-cell lymphoma presenting with an acute serologic epstein-barr virus profile. *Hematology Reports*, 7(2), 31–34.
9. Begić, V., Korać, P., Gašparov, S., Rozman, M., Simicic, P. i Židovec Lepej, S. (2022). Molecular Characterisation of Epstein–Barr Virus in Classical Hodgkin Lymphoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24).

10. 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. i Ascherio, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 375(6578), 296–301
11. Briercheck, E. L., Ravishankar, S., Ahmed, E. H., Carias Alvarado, C. C., Barrios Menéndez, J. C., Silva, O., Solórzano-Ortiz, E., Siliézar Tala, M. M., Stevenson, P., Xu, Y., Wohns, A. W., Enriquez-Vera, D., Barrionuevo, C., Yu, S.-C., Freud, A. G., Oakes, C., Weigel, C., Weinstock, D. M., Klimaszewski, H. L., ... Warren, E. H. (2024). Geographic EBV variants confound disease-specific variant interpretation and predict variable immune therapy responses. *Blood Advances*, 8(14), 3731–3744.
12. Cao, Y., Xie, L., Shi, F., Tang, M., Li, Y., Hu, J., Zhao, L., Zhao, L., Yu, X., Luo, X., Liao, W. i Bode, A. M. (2021). Targeting the signaling in Epstein-Barr virus-associated diseases: mechanism, regulation, and clinical study. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 15.
13. Chang, E. T., Ye, W., Zeng, Y. X. i Adami, H. O. (2021). The evolving epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 30(6), 1035–1047.
14. Chang, K. L., Chen, Y. Y., Shibata, D. i Weiss, L. M. (1992). Description of an in situ hybridization methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*, 1(4), 246–255.
15. Chiba, S. i Sakata-Yanagimoto, M. (2020). Advances in understanding of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia*, 34(10) 2592–2606.
16. Dunleavy, K. i Wilson, W. H. (2007). Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: Immune modulation as a therapeutic strategy. *Leukemia and Lymphoma*, 48(3) 449–451.
17. Edwards, R. H., Seillier-Moisewitsch, F. i Raab-Traub, N. (1999). Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology*, 261(1), 79–95.
18. Epstein M. A., Achong B. G. i Barr Y. M. (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *Lancet*, 1, 702–3.

19. Farrell P. J. (2015). Epstein-Barr Virus Strain Variation. *Current topics in microbiology and immunology*, 390(1), 45–69.
20. Farrell P. J. (2019). Epstein-Barr Virus and Cancer. *Annual review of pathology*, 14, 29–53.
21. Farrell, P. J. i White, R. E. (2021). Do Epstein-Barr Virus Mutations and Natural Genome Sequence Variations Contribute to Disease?. *Biomolecules*, 12(1), 17.
22. Feederle, R., Neuhierl, B., Baldwin, G., Bannert, H., Hub, B., Mautner, J., Behrends, U. i Delecluse, H. J. (2006). Epstein-Barr Virus BNRF1 Protein Allows Efficient Transfer from the Endosomal Compartment to the Nucleus of Primary B Lymphocytes. *Journal of Virology*, 80(19), 9435–9443.
23. Campo, E., Jaffe, E. S., Cook, J. R., Quintanilla-Martinez, L., Swerdlow, S. H., Anderson, K. C., Brousset, P., Cerroni, L., de Leval, L., Dirnhofer, S., Dogan, A., Feldman, A. L., Fend, F., Friedberg, J. W., Gaulard, P., Ghia, P., Horwitz, S. M., King, R. L., Salles, G., San-Miguel, J., ... Zelenetz, A. D. (2022). The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*, 140(11), 1229–1253.
24. Gharibzadeh, M., Azaran, A., Jalilian, S., Seyedian, S. S. i Makvandi, M. (2021). Molecular detection of Epstein-Barr virus in paran-embedded tissue samples of patients suffering gastric cancer in Ahvaz, Iran: a case-control study. *Research Square*.
25. Houen, G. i Trier, N. H. (2021). Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology*, 11, 587380.
26. International Committee on Taxonomy of Viruses (2023) <https://ictv.global/> (Pristupljeno 29.07.2024.)
27. Iwakiri, D. i Takada, K. (2010). Role of EBERs in the pathogenesis of EBV infection. *Advances in cancer research*, 107, 119–136.
28. Iwakiri, D., Zhou, L., Samanta, M., Matsumoto, M., Ebihara, T., Seya, T., Imai, S., Fujieda, M., Kawa, K. i Takada, K. (2009). Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from toll-like receptor 3. *Journal of Experimental Medicine*, 206(10), 2091–2099.
29. James, J. A., Kaufman, K. M., Farris, A. D., Taylor-Albert, E., Lehman, T. J. i Harley, J. B. (1997). An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients

- suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*, 100(12), 3019–3026.
30. Kanda, T., Yajima, M. i Ikuta, K. (2019). Epstein-Barr virus strain variation and cancer. *Cancer science*, 110(4), 1132–1139.
 31. Kang, M. S. i Kieff, E. (2015). Epstein-Barr virus latent genes. *Experimental & molecular medicine*, 47(1), e131.
 32. Kieff, E. i Rickinson, A.B. (2007): Epstein-Barr virus and its replication. U: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.M., Roizman, B. i Straus, S. E., (ur.), *Fields Virology*, 5th Edition, vol. II, Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, str. 2603-2654.
 33. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. i Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
 34. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. i Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948.
 35. Larsson, A. (2014). AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276–3278.
 36. Lee, J., Park, M., Lee, M. H., Woo, H. J., Kim, H. W., Yang, J. Y., Eom, Y. B., Kim, S. H., Yoo, C. i Kim, J. B. (2015). Development of EBV-encoded small RNA targeted PCR to classify EBV positive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) of the elderly. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(7), 7859–7868.
 37. Liu, X. i Cohen, J. I. (2016). Epstein-Barr Virus (EBV) Tegument Protein BGLF2 Promotes EBV Reactivation through Activation of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Journal of Virology*, 90(2), 1129–1138.
 38. 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, str. 45-90
 39. Murata T. (2018). *Encyclopedia of EBV-Encoded Lytic Genes: An Update*. *Advances in experimental medicine and biology*, 1045, 395–412.

40. Murata, T. i Tsurumi, T. (2014). Switching of EBV cycles between latent and lytic states. *Reviews in medical virology*, 24(3), 142–153.
41. Murata, T., Narita, Y., Sugimoto, A., Kawashima, D., Kanda, T. i Tsurumi, T. (2013). Contribution of Myocyte Enhancer Factor 2 Family Transcription Factors to BZLF1 Expression in Epstein-Barr Virus Reactivation from Latency. *Journal of Virology*, 87(18), 10148–10162.
42. Murray, P. G. i Young, L. S. (2019). An etiological role for the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 134(7), 591–596.
43. Nanbo, A., Yoshiyama, H. i Takada, K. (2005). Epstein-Barr Virus-Encoded Poly(A) – RNA Confers Resistance to Apoptosis Mediated through Fas by Blocking the PKR Pathway in Human Epithelial Intestine 407 Cells . *Journal of Virology*, 79(19), 12280–12285.
44. Neves, M., Marinho-Dias, J., Ribeiro, J. i Sousa, H. (2017). Epstein-Barr virus strains and variations: Geographic or disease-specific variants?. *Journal of medical virology*, 89(3), 373–387.
45. Nowalk, A. i Green, M. (2016). Epstein-Barr Virus. *Microbiology spectrum*, 4(3).
46. Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F. A., Chien, H., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., Sander, C. i Tuschl, T. (2004). Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science*, 304(5671), 734–736.
47. Rani, A., Jakhmola, S., Karnati, S., Parmar, H. S. i Chandra Jha, H. (2021). Potential entry receptors for human γ -herpesvirus into epithelial cells: A plausible therapeutic target for viral infections. *Tumour virus research*, 12, 200227.
48. Rickinson, A. B., Young, L. S. i Rowe, M. (1987). Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *Journal of virology*, 61(5), 1310–1317.
49. Rosa, M. D., Gottlieb, E., Lerner, M. R. i Steitz, J. A. (1981). Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Molecular and cellular biology*, 1(9), 785–796.
50. Rymo L. (1979). Identification of transcribed regions of Epstein-Barr virus DNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *Journal of virology*, 32(1), 8–18.

51. Sathiyamoorthy, K., Hu, Y. X., Möhl, B. S., Chen, J., Longnecker, R. i Jardetzky, T. S. (2016). Structural basis for Epstein-Barr virus host cell tropism mediated by gp42 and gHgL entry glycoproteins. *Nature communications*, 7, 13557.
52. Shannon-Lowe, C. i Rickinson, A. (2019). The Global Landscape of EBV-Associated Tumors. *Frontiers in oncology*, 9, 713.
53. Smatti, M. K., Al-Sadeq, D. W., Ali, N. H., Pintus, G., Abou-Saleh, H. i Nasrallah, G. K. (2018). Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Frontiers in oncology*, 8, 211.
54. Westhoff Smith, D. i Sugden, B. (2013). Potential cellular functions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) of Epstein-Barr Virus. *Viruses*, 5(1), 226–240.
55. Tao, Q., Young, L. S., Woodman, C. B. i Murray, P. G. (2006). Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers--genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics. *Frontiers in bioscience*, 11, 2672–2713.
56. Tempera, I., Wiedmer, A., Dheekollu, J. i Lieberman, P. M. (2010). CTCF prevents the epigenetic drift of EBV latency promoter Qp. *PLoS Pathogens*, 6(8), 41–42.
57. Tsao, S. W., Tsang, C. M. i Lo, K. W. (2017). Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 372(1732), 20160270.
58. Vockerodt, M., Cader, F. Z., Shannon-Lowe, C. i Murray, P. (2014). Epstein-Barr virus and the origin of Hodgkin lymphoma. *Chinese journal of cancer*, 33(12), 591–597.
59. Wu, Y., Maruo, S., Yajima, M., Kanda, T. i Takada, K. (2007). Epstein-Barr Virus (EBV)-Encoded RNA 2 (EBER2) but Not EBER1 Plays a Critical Role in EBV-Induced B-Cell Growth Transformation. *Journal of Virology*, 81(20), 11236–11245.
60. Yap, L. F., Wong, A. K. C., Paterson, I. C. i Young, L. S. (2022). Functional Implications of Epstein-Barr Virus Lytic Genes in Carcinogenesis. *Cancers*, 14(23), 5780.
61. Young, L. S. i Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature reviews. Cancer*, 4(10), 757–768.
62. Young, L. S., Yap, L. F. i Murray, P. G. (2016). Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nature reviews. Cancer*, 16(12), 789–802.
63. Židovec Lepej, S., Batovic, M., Rozman, M., Bodulić, K., Prtorić, L., Šokota, A., Nikcevic, A., Simicic, P. i Tešović, G. (2023). Distribution of Epstein-Barr Virus LMP1 Variants in

- Patients with Infectious Mononucleosis and Association with Selected Biochemical and Hematological Parameters. *Pathogens*, 12(7), 915.
64. Židovec Lepej, S., Matulić, M., Gršković, P., Pavlica, M., Radmanić, L. i Korać, P. (2020). miRNAs: EBV Mechanism for Escaping Host's Immune Response and Supporting Tumorigenesis. *Pathogens*, 9(5), 353

Životopis

Rođen sam 02.08.2000. godine u Dubrovniku. Završio sam Osnovnu školu Lapad i Osnovnu glazbenu školu Luke Sorkočevića u Dubrovniku 2015. godine. Te iste godine upisao sam prirodoslovno-matematički smjer u Gimnaziji Dubrovnik i Srednju umjetničku školu Luke Sorkočevića. Godine 2019. maturirao sam u Gimnaziji Dubrovnik i Umjetničkoj školi Luke Sorkočevića. Iste godine preselio sam u Zagreb i upisao Preddiplomski sveučilišni studij Biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme prve godine preddiplomskog studija primao sam državnu stipendiju u STEM područjima znanosti. Preddiplomski studij završio sam 2022. godine kada sam na istom fakultetu upisao Sveučilišni diplomski studij Eksperimentalne biologije modul Fiziologija i imunobiologija. Za vrijeme treće godine preddiplomskog studija radio sam laboratorijsku stručnu praksu na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-Matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić. Na prvoj godini diplomskog studija radio sam laboratorijsku stručnu praksu pri Klinici za infektivne bolesti “dr. Fran Mihaljević” pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Snježane Židovec Lepej. Osim hrvatskog koji mi je materinji jezik, tečno govorim i pišem engleski jezik.