



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Marija Rozman

**Genska varijabilnost i filogenija virusa
Epstein-Barr u infektivnoj mononukleozi**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Marija Rozman

**Genetic variability and phylogeny of
Epstein-Barr virus in infectious
mononucleosis**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, pod vodstvom naslovne izv. prof. dr. sc. Snježane Židovec Lepej, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost naslovljenog „Molekularna raznolikost virusa Epstein-Barr“ (voditeljica projekta naslov. izv. prof. dr. sc. Snježane Židovec Lepej), u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORICI

Naslovna izv.prof.dr.sc. Snježana Židovec Lepej voditeljica je Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti »Dr. Fran Mihaljević« u Zagrebu, naslovna izvanredna profesorica na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu te znanstvena savjetnica Medicinskog fakulteta (MF) Sveučilišta u Zagrebu iz područja kliničkih medicinskih znanosti. Diplomski studij biologije, smjer molekularna biologija, završila je 1993.g. na PMF-u Sveučilišta u Zagrebu, 1997.g. magistrirala je biomedicinu, a 2003.g. obranila doktorsku disertaciju iz područja prirodnih znanosti na istom fakultetu. Nasl.izv.prof. Židovec Lepej je *Fellow* stručnog društva European Society for Clinical Microbiology and Immunology (ESCMID). Članica je Vijeća za poslijediplomski studij biologije PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica je nagrade Akademije medicinskih znanosti R. Hrvatske »Dr. Ante Šercer« za najbolji rad hrvatskih znanstvenika objavljen 2007.g. Glavna područja njezinog znanstvenog interesa su imunologija i mikrobiologija. Obavila je ukupno 126 znanstvenih radova koji su prema bazi Web of Science citirani 1719 puta uz h-indeks 22 (prema bazi Scopus 1804 citata, h-index 22). Voditeljica je znanstveno-istraživačkog projekta iz potpore Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) naslovljenog »Molekularna raznolikost virusa Epstein-Barr«, a bila je i voditeljica projekta iz potpore Ministarstva obrazovanja i športa R. Hrvatske (MOZŠ) te voditeljica bilateralnog znanstvenog projekta (Hrvatska/Slovenija). U svojstvu istraživača sudjelovala je u radu 3 projekta iz potpore HRZZ, 4 projekta iz potpore MZOŠ, te na projektu Znanstvenog centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva. Do sada je bila mentorica i komentorica deset obranjenih doktorskih disertacija na PMF-u i na MF-u Sveučilišta u Zagrebu. Članica je stručnog društva ESCMID u kojem je obnašala funkciju članice *Educational Subcommittee* (2016. do 2020.g.) kao i stručnog društva European Society for Antiviral Research u kojem obnaša funkciju *country representative*. Predsjednica je Hrvatskog biološkog društva u zdravstvu, članica Upravnog odbora Hrvatskog društva za putničku, tropsku i migracijsku medicinu Hrvatskoj liječničkog zbora te rizničarka Hrvatskog društva za urogenitalne i spolno prenosive infekcije Hrvatskog liječničkog zbora. U svojstvu voditeljice predmeta sudjeluje u nastavi dokorskog studija biologije na PMF-u te specijalističkog poslijediplomskog studija infektologije MF-a Sveučilišta u Zagrebu. U svojstvu predavača sudjeluje u nastavi na diplomskom studiju biologije PMF-a Sveučilišta u Zagrebu, studiju medicinske biokemije i farmacije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i na studiju medicine na engleskom jeziku MF-a Sveučilišta u Zagrebu. Također predaje na poslijediplomskom studiju kliničke mikrobiologije s parazitologijom te dva doktorska studija MF-a Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici naslovnoj izv.prof. dr. sc. Snježani Židovec Lepej na njenim savjetima, podršci i usmjeravanju koje mi je pružila tijekom doktorskog studija te na svim prilikama koje mi je omogućila za iskustvo na međunarodnim izlaganjima.

Želim se zahvaliti i svim svojim kolegicama na Odjelu imunološke i molekularne dijagnostike na svim savjetima, pomoći i veselom okruženju.

Posebno se zahvaljujem kolegi Kristianu Boduliću za svu pomoć koju mi je pružio tijekom izrade doktorskog rada te za sve savjete i emocionalnu podršku.

Također se zahvaljujem kolegama iz Zavoda za pedijatrijsku infektologiju na pomoći u prikupljanju bioloških uzoraka analiziranih u ovoj disertaciji.

Veliko hvala svim mojim prijateljima, obitelji i dečku Karlu čija su mi potpora i razumijevanje najviše pomogli kroz cijeli proces izrade doktorskog rada

GENSKA VARIJABILNOST I FILOGENIJA VIRUSA EPSTEIN-BARR U INFEKTIVNOJ MONONUKLEOZI

MARIJA ROZMAN

Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

Virus Epstein-Barr (EBV) pripada porodici *Orthoherpesviridae* čiji se genom sastoji od dvolančane linearne DNA. Temeljem varijabilnosti sekvencija pojedinih gena, EBV se klasificira u različite tipove, podtipove i varijante. Ciljevi ovog istraživanja bili su odrediti varijabilnost gena *LMP-1*, *EBNA-1*, *EBNA-2*, *BLLF1* i promotora *Zp* u infektivnoj mononukleози (IM), filogenetskom analizom proučiti arhitekturu virusne populacije te provjeriti mogućnost koinfekcije metodom sekvenciranja nove generacije u uzorcima s više varijanti gena *LMP-1*. Najčešća varijanta gena *LMP-1* bila je divlji tip, dok su druge varijante (China1, Med-, North Carolina) i rekombinanti bili rjeđe zastupljeni. Analizom gena *EBNA-1* dokazani su prototipovi P-ala i P-thr te novootkriveni polimorfizam Arg594Lys. Analizom gena *EBNA-2* dokazana su oba tipa virusa uz novotkrivenu adiciju Leu212. Najzastupljeniji podtip gena *BLLF1* bio je *BLLF1*-a s polimorfizmom Q201, dok je najčešća varijanta promotora *Zp* bio *Zp-P*. Rezultati ovog rada pokazali su, po prvi puta, molekularnu raznolikost EBV-a u IM u ovom geografskom području.

(132 stranice / 13 slika / 39 tablica / 135 literaturnih navoda / jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi:

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

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Maja Matulić, izv. prof. dr. sc. Tatjana Vilibić-Čavlek, prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić

Zamjena: prof. dr. sc. Petra Korać

**GENETIC VARIABILITY AND PHYLOGENY OF EPSTEIN-BARR VIRUS IN
INFECTIOUS MONONUCLEOSIS**

MARIJA ROZMAN

University Hospital for Infectious Diseases „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

Epstein-Barr virus (EBV) belongs to the *Orthoherpesviridae* family whose genome consists of double-stranded linear DNA. Based on the variability of individual gene sequences, EBV is classified into different types, subtypes and variants. The aims of this study were to determine the variability of *LMP-1*, *EBNA-1*, *EBNA-2*, *BLLF1* genes and Zp promoter in infectious mononucleosis (IM), to study the architecture of the viral population by phylogenetic analysis, and to check the possibility of co-infection using the new generation sequencing method in samples with multiple variants of the *LMP-1* gene. The most frequent variant of the *LMP-1* gene was the wild type, while other variants (China1, Med-, North Carolina) and recombinants were less frequently represented. The analysis of the *EBNA-1* gene showed the presence of prototypes P-ala and P-thr and the newly discovered polymorphism Arg594Lys. Analysis of the *EBNA-2* gene showed the presence of both viral types as well as newly discovered addition of Leu212. The most frequent *BLLF1* gene subtype was *BLLF1*-a with the Q201 polymorphism, while the most common variant of the Zp promoter was Zp-P. The results of this study showed, for the first time, the extent of the molecular diversity of EBV in IM in this geographical area.

(132 pages/ 13 figures/ 39 tables/ 135 references/ original in Croatian)

Keywords:

Supervisor: Prof. Snježana Židovec Lepej

Reviewers: Prof. Maja Matulić, Assoc. Prof. Tatjana Vilibić-Čavlek, Prof. Maja Šegvić Klarić

Replacement: Prof. Petra Korać

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Literaturni pregled.....	4
2.1 Klasifikacija EBV-a.....	4
2.2 Građa EBV-a	4
2.2.1 Građa genoma.....	6
2.3 Mehanizam infekcije	8
2.3.1 Primarna infekcija i litička replikacija	8
2.3.2 Latencija	9
2.3.3 Litička reaktivacija replikacije EBV-a.....	10
2.4 Izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina	12
2.5 Bolesti povezane s EBV-om.....	13
2.5.1 Infektivna mononukleoza	14
2.6 Molekularna raznolikost.....	15
2.6.1 Raznolikost gena <i>LMP-1</i>	15
2.6.2 Raznolikost gena <i>EBNA-1</i>	18
2.6.3 Raznolikost gena <i>EBNA-2</i>	21
2.6.4 Raznolikost gena <i>BLLF1</i>	22
2.6.5 Promotor <i>Zp</i>	24
3. Materijali i metode	26
3.1 Biološki uzorci	26
3.2 Izolacija DNA i PCR	26
3.3 Elektroforeza	32
3.4 Sangerovo sekvenciranje.....	33
3.5 Određivanje virusnih varijanti.....	35
3.7 Filogenetska analiza	38
3.8 Statistička analiza.....	38
4. Rezultati	39
4.1. Određivanje varijanti.....	39

4.1.1 Gen <i>LMP-1</i>	39
4.1.2 Gen <i>EBNA-1</i>	49
4.1.3. Gen <i>EBNA-2</i>	58
4.1.4 Gen <i>BLLF1</i>	62
4.1.5 Promotor Zp	67
4.2 Sekvenciranje nove generacije	71
4.3 Filogenija.....	75
4.3.1 Gen <i>LMP-1</i>	76
4.3.2 Gen <i>EBNA-1</i>	78
4.3.3 Gen <i>EBNA-2</i>	79
4.3.4 Gen <i>BLLF1</i>	81
4.3.5 Promotor Zp	83
4.4 Analiza pojave različitih kombinacija gena.....	85
4.4.1 Gen <i>LMP-1</i>	85
4.4.2 Gen <i>EBNA-1</i>	89
4.4.3 Gen <i>EBNA-2</i>	92
4.4.4 Gen <i>BLLF1</i>	95
4.4.5 Promotor Zp	97
5. Rasprava	99
5.1 Gen <i>LMP-1</i>	99
5.2 Gen <i>EBNA-1</i>	103
5.3 Gen <i>EBNA-2</i>	106
5.4 Gen <i>BLLF1</i>	108
5.5 Promotor Zp	110
6. Zaključak	113
7. Popis literature.....	115
8. ŽIVOTOPIS	132

1. Uvod

Virus Epstein-Barr (EBV) pripada porodici *Orthoherpesviridae*, potporodici *Gammaherpesvirinae* te rodu *Lymphocryptovirus* (Gurtsevitch i sur., 2024). Najvažnija obilježja porodice *Orthoherpesviridae* su kompleksna građa, prisutnost ovojnice, dvolančana genomski DNA te sposobnost uspostavljanja doživotne latencije u domaćina. Genom ovog virusa sastoji se od dvolančane molekule DNA veličine 172 kb s nizom ponavljajućih sljedova unutar genoma te na terminalnim krajevima. Terminalni krajevi sadrže ponavljajuće sljedove veličine 500 pb koji omogućuju cirkularizaciju EBV-a odnosno formiranje episoma nakon ulaska u stanicu domaćina. Genom EBV-a kodira približno 80 proteina. Prvi sekvencirani genom EBV-a pripada soju B95-8 (pristupni broj baze GenBank: V01555.2) koji se smatra divljim tipom ovog virusa (Xu i sur., 2019). Replikacijski ciklus EBV-a sastoji se od litičke i latentne faze. Tijekom latentne faze replikacijskog ciklusa EBV sintetizira minimalan broj proteina kako bi se izbjegla aktivacija imunološkog odgovora domaćina. Litičku fazu replikacijskog ciklusa karakterizira formiranje viriona, kao i liza zaražene stanice. Litička faza se, prema različitim profilima genske ekspresije, dijeli na neposrednu-ranu, ranu i kasnu fazu. Izostanak kontrole virusne replikacije putem mehanizama urođene i specifične imunosti tijekom akutne faze infekcije može se u djece i adolescenata očitovati kao infektivna mononukleoza (IM) s pojavom povišene tjelesne temperature, grloboljom i limfadenopatijom (McKenzie i El-Guindy, 2015). Prirodnoubilačke stanice (NK stanice, od eng. *Natural killer cells*) i citotoksični CD8⁺ limfociti T najvažnije su komponente urođene i specifične stanične imunosti odgovorne za kontrolu proliferacije zaraženih limfocita B. Infekcija limfocita B EBV-om *in vitro* uzrokuje intenzivnu staničnu proliferaciju i transformaciju pri čemu nastaju limfoblastoidne stanične linije. EBV može uzrokovati neoplastičnu transformaciju i epitelnih te mezenhimalnih stanica (Hu i sur., 2016). Onkogeni potencijal EBV-a rezultat je nepravilno regulirane aktivnosti gena *LMP-1*. LMP-1 je transmembranski protein koji pokreće kaskadu signalnih puteva te dovodi do aktivacije puta jezgrenog faktora kappa B (NF-κB, od eng. *Nuclear factor kappa B*) odnosno transkripcije gena koji potiču proliferaciju stanica. LMP-1 dijeli strukturne sličnosti s molekulom CD40 (klaster diferencijacije 40, od eng. *Cluster of differentiation 40*), transmembranskim proteinom koji je izražen na limfocitima B, pri čemu se obje molekule vežu za identičnu grupu staničnih signalizirajućih proteina TRAF (proteini povezani s receptorom faktora nekroze tumora, od eng. *Tumor necrosis factor receptor-associated factor*). Na temelju genske varijabilnosti *LMP-1*, EBV može biti svrstan u nekoliko

različitih varijanti: China1, China2, North Carolina, Alaskan, Mediterranean s delecijom i Mediterranean bez delecije (Edwards i sur., 1999). Molekularna raznolikost gena *LMP-1* većinom je istražena u malignim bolestima kod kojih je EBV etiološki kofaktor, poput nazofaringealnog karcinoma (Edwards i sur., 2004). Obzirom na sekvenciju gena *EBNA-2*, EBV se klasificira u genotipove 1 i 2 (Mendes i sur., 2008). Literaturni podatci o prevalenciji tipova 1 i 2 EBV-a u europskim populacijama iz različitih geografskih cjelina vrlo su oskudni, a za Hrvatsku nisu dostupni. Temeljem sekvencije gena *EBNA-1*, EBV se klasificira u najmanje dvije varijante (P-Ala i P-Thr) te pripadajuće podvarijante. Raznolikost gena *EBNA-1* istražena je kod zdravih osoba i u osoba s malignim bolestima, dok su podaci o raznolikosti ovog gena u IM oskudni (Dheekollu i sur., 2017). Analiza genske sekvencije promotora Zp pokazala je postojanje varijanti Zp-V3 i Zp-V4 čija biološka i klinička značajnost nije u potpunosti poznata, dok gen *BLLF1* možemo svrstati u tip a i tip b s njima pridruženim podvarijantama. Molekularna raznolikost gena *BLLF1* u malignim bolestima povezanim s EBV-om istražena je na modelima nazofaringealnog karcinoma i karcinoma želuca, no prisutnost mogućih virusnih varijanti klasificiranih temeljem gena *BLLF1* u IM nije poznata (Luo i sur., 2012). Klasifikacija EBV-a je iznimno kompleksna, ovisi o odabranim genima te nedostavno istražena na globalnoj i regionalnoj razini. Usprkos brojnim istraživanjima *in vitro* i *in vivo*, cjepiva protiv EBV-a za sada nisu dostupna (Rozman i sur., 2022). Podaci o raznolikosti EBV genotipova, varijanti i podvarijanti posebno su oskudni u pedijatrijskoj populaciji, a većina je istraživanja provedena na modelima malignih bolesti koje su učestale u području Afrike i Azije.

Cilj ove doktorske disertacije je odrediti gensku varijabilnost EBV-a na razini genotipova i genskih varijanti u IM te analizirati učestalost koinfekcija različitim molekularnim oblicima virusa.

Specifični ciljevi istraživanja:

- 1) Odrediti gensku varijabilnost gena *EBNA-2*, *EBNA-1*, *LMP-1*, *BLLF1* i promotora Zp u IM
- 2) Sekvenciranjem nove generacije istražiti učestalost koinfekcija varijantama *LMP-1*
- 3) Filogenetskom analizom detaljnije istražiti evolucijsku povezanost i arhitekturu virusne populacije

Hipoteza istraživanja je da u IM, divlji tip EBV-a kao i genske varijante *LMP-1*, *EBNA-1*, *EBNA-2*, *BLLF1* i promotora *Zp* više su zastupljene u usporedbi s koinfekcijama različitim varijantama virusa.

DNA izolirana je iz periferne krvi djece s IM te su odabrani virusni geni odnosno regije gena *EBNA-1*, *EBNA-2*, *LMP-1*, *BLLF1* i promotora *Zp* umnožene metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Produkti PCR-a sekvencirani su metodom prema Sangeru te su analizom dobivenih elektroferograma i preklapanjem s pripadajućim referentnim sekvencijama svrstani u definirane tipove, varijante i podvarijante. Dio sekvencija gena *LMP-1* koje su na temelju rezultata Sangerova sekvenciranja određene kao rekombinanti dodatno su analizirane sekvenciranjem nove generacije na uređaju *Illumina MiSeq* kako bi se provjerila mogućnost koinfekcije zasebnim varijantama virusa. Korištenjem programa MEGA konstruirana su filogenetska stabla te je provedena statistička analiza kako bi se utvrdila kategorija povezanosti između različitih varijanti gena.

Predložena doktorska disertacija značajno će proširiti postojeća znanja o molekularnoj raznolikosti EBV-a na razini genotipova i genskih varijanti virusa u infektivnoj mononukleozu. Primjena populacijskog sekvenciranja i filogenetske analize omogućit će sveobuhvatniju i precizniju analizu EBV-a u odnosu na prethodna istraživanja. Rezultati predložene doktorske disertacije će primjenom sekvenciranja nove generacije pridonijeti boljem razumijevanju učestalosti koinfekcija *LMP-1* varijantama EBV-a.

2. Literaturni pregled

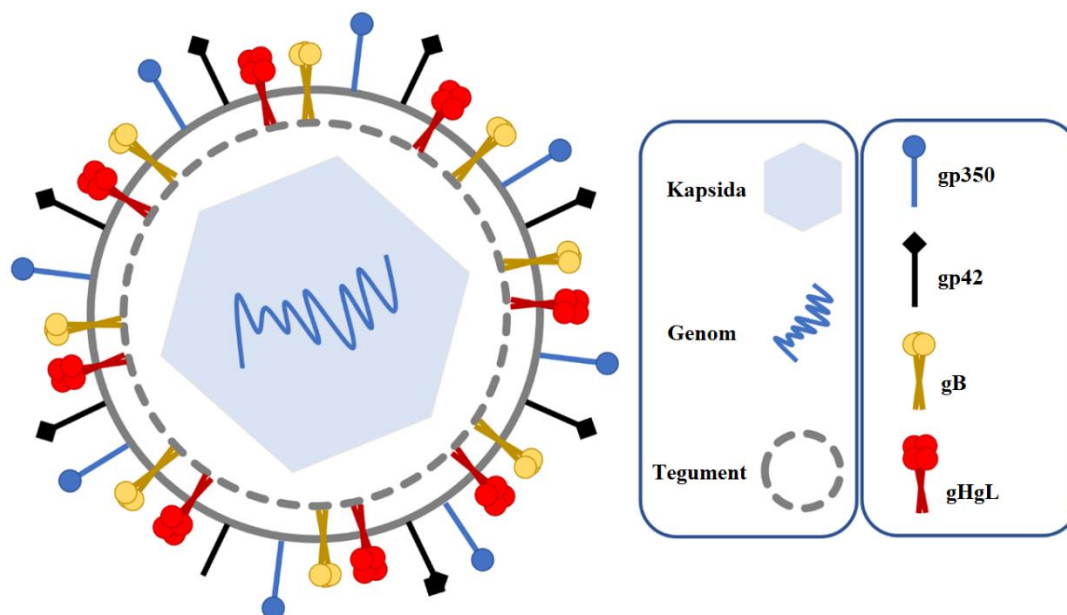
2.1 Klasifikacija EBV-a

Prema klasifikaciji *International Committee on Taxonomy of Viruses*, EBV pripada redu *Herpesvirales*, porodici *Orthoherpesviridae*, potporodici *Gammaherpesvirinae* i rodu *Lymphocryptovirus* (Gatherer i sur., 2021). Predstavnici porodice *Orthoherpesviridae* karakteristični su po tome što uspostava infekcije kod domaćina većinom prolazi asimptomatski, no nakon što jednom zaraze domaćina, doživotno ostaju u stanici s mogućnošću reaktivacije (Gatherer i sur., 2021). Virusi potporodice *Gammaherpesvirinae* posjeduju jedinstvene karakteristike koje ih odvajaju od preostalih dviju potporodica *Orthoherpesviridae*, *Alphaherpesvirinae* i *Betaherpesvirinae*, kao što su uspostavljanje doživotne latentne infekcije u limfocitima i mogućnost njihove infekcije *in vitro* (Zheng i sur., 2016). Također, pojedini predstavnici potporodice *Gammaherpesvirinae* posjeduju sposobnost induciranja malignih i limfoproliferativnih bolesti (Zheng i sur., 2016).

2.2 Građa EBV-a

Veličina virusne čestice EBV-a raspona je 120-150 nm te se njegova građa sastoji od 4 osnovna sloja koji čine genom, ikozaedralna kapsida građena od 162 kapsomere, proteinski sloj tegument i vanjska ovojnica koja potječe od membrane domaćina i sadrži virusne glikoproteine (Slika 1.). Na vanjskoj ovojnici EBV-a nalaze se glikoproteini koji sudjeluju u prijanjanju i spajanju ovojnice virusa sa staničnom membranom stanice domaćina te se 11 od ukupno 13 glikoproteina EBV-a nalazi na njegovoj vanjskoj ovojnici (Hutt-Fletcher, 2015). Glikoproteini EBV-a podijeljeni su u 3 skupine: glikoproteine koji sudjeluju u ulasku virusa u stanicu, glikoproteine uključene u sastavljanje viriona te glikoproteine koji sudjeluju u izbjegavanju imunološkog odgovora domaćina (Hutt-Fletcher, 2015). Najvažniji glikoproteini za ulazak EBV-a u stanicu domaćina su gp350, gp42, gB i kompleks gHgL među kojima je gp350 najbrojniji (Hutt-Fletcher, 2007). Glikoprotein B također sudjeluje u završnoj fuziji koja prethodi ulasku virusa u stanicu (Hutt-Fletcher, 2015). Ispod ovojnice, nalazi se tegument građen od slojeva virusnih i staničnih proteina koji tvore mrežu proteina povezanih s ovojnicom i nukleokapsidom te su visoko konzervirani u virusima koji pripadaju porodici *Orthoherpesviridae* (Murata, 2023). Proteini tegumenta sudjeluju u morfogenezi viriona i u izbjegavanju staničnog odgovora (Mei i sur., 2022). Primjerice, protein BKRF4 stupa u

interakciju s histonima H3, H4, H2A i H2B čime sprječava stanični odgovor na oštećenje DNA domaćina (Mei i sur., 2022). Kompleksi tegumenta vezani za kapsidu (CATCs, od eng. *Capsid-associated tegument complexes*) sudjeluju u stabilizaciji nukleokapside te povećanju unutarnjeg pritiska koji će olakšati ispuštanje genoma EBV-a prilikom primarne infekcije (Mei i sur., 2022). Također, proteini tegumenta BGLF1 i BVRF1 sudjeluju u procesu stvaranja nukleokapside (Nanbo, 2024). Nukleokapsida EBV-a formira se u nukleoplazmi jezgre domaćinske stanice i u blizini jezgrine ovojnice pri čemu se linearna molekula DNA EBV-a pakira u strukturne jedinice kapside, tj. kapsomere (Nanbo, 2024). Nukleokapsida sadrži 162 kapsomere sastavljene od velikog kapsidnog proteina VCA, 3 manja kapsidna proteina BDLF1 i BORF1 i malog kapsidnog proteina BFRF3 (Huang i sur., 2024). Kapsomere se mogu formirati u oblik heksona ili pentona, te su također visoko očuvane unutar porodice *Orthoherpesviridae* (Huang i sur., 2024). Prilikom ulaska EBV-a u stanicu, proteini kapside stupaju u interakciju s motornim staničnim proteinima kako bi prenijeli genom do jezgre te nakon sinteze novih viriona sudjeluju u njihovom prijenosu do citoplazmatskih mjesta gdje će se nastaviti proces sastavljanja (Mei i sur., 2022). Unutar nukleokapside smješten je genom EBV-a u obliku dvolančane i linearne DNA (Hutt-Fletcher, 2007).



Slika 1. Virus Epstein-Barr (EBV) sastoji se od jezgre s dvolančanom linearnom DNA, nukleokapside, tegumenta i vanjske ovojnice. Dio prikazanih glikoproteina smješten je na vanjskoj ovojnici (gp350, gp42), a dio na tegumentu (gB, gHgL).

2.2.1 Građa genoma

Prvi genom EBV-a sekvenciran je iz uzorka krvi ispitanika s IM 1984. godine i pripada soju B95-8 (GenBank pristupni broj: V01555.2), koji se danas smatra referentnim sojem EBV-a (Hudson i sur., n.d.). Do sada je sekvencirano više od 500 genoma različitih sojeva EBV-a, uključujući AG876 soj (GenBank pristupni broj: DQ279927) koji se smatra referentnim genomom EBV-a za određena endemska geografska područja (Dolan i sur., 2006). Predstavnike porodice *Orthoherpesviridae* karakteriziraju veliki genomi veličine 125-171 kbp te međusobno posjeduju 43 gena zajednički naslijeđena od pretka herpesvirusa (Gatherer i sur., 2021). Genom EBV-a veličine je 172 kb i sadrži najmanje 80 otvorenih okvira čitanja (ORF, od eng. *Open reading frame*) koji kodiraju proteine, mikroRNA (miRNA, od eng. *microRNA*) te male RNA kodirane EBV-om 1 (EBER1, od eng. *Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1*) i male RNA kodirane EBV-om 2 (EBER2, od eng. *Epstein-Barr virus-encoded small RNA 2*) koje, kao nepoliadenilirani transkripti RNA polimeraze III, ostaju u jezgri domaćina (Skalsky i Cullen, 2015) (Slika 2.). EBV sadrži dvije vrste početnih mjesta replikacije, dva mjesta početne litičke replikacije (*OriLyt*, od eng. *Origin of lytic replication*) i jedno mjesto početne plazmide replikacije (*OriP*, od eng. *Origin of plasmid replication*) (Mei i sur., 2022, Rennekamp i Lieberman, 2011). *OriLyt* aktivan je u litičkoj fazi za vrijeme virusne replikacije i sastavljanja viriona, a građen je od uzvodnih i nizvodnih elemenata koji se protežu uzduž promotora BHLF1 i BHRF1 odgovornih za aktivaciju litičkih E gena (Rennekamp i Lieberman, 2011). Uzvodni elementi *OriLyt* obuhvaćaju četiri Z-responzivna elementa nužna za pravilnu replikaciju episoma, dok nizvodni elementi obuhvaćaju sekvencije bogate pirimidinima koje formiraju H-palindrome te sudjeluju u aktivaciji replikacije (Portes-Sentis, 1997). S druge strane, *OriP* je aktivan u prilikom genomske forme episoma, veličine je 1,7 kB i građen od dvije glavne funkcionalne jedinice, elemenata dijadne simetrije (DS, od eng. *Dyad symmetry*) i porodice ponavljanja (FR, od eng. *Family of repeats*) (Yates i sur., 2000). Za *OriP* vežu se proteini koji sudjeluju u održavanju replikacije EBV genoma usporedno s replikacijom genoma domaćina (Zhang i sur., 2022). Uzduž genoma EBV-a nalaze se 4 velike unutarnje ponavljajuće regije (IR1-4. od eng. *Internal reiteration 1-4*) te velik broj tandemskih ponavljanja na krajevima veličine oko 500 pb (Kwok i sur., 2012). IR1 najveća je ponavljajuća regija EBV-a koja se sastoji od 5.6-8.6 ponavljanja jedinica veličine 3 kb te je njena heterogenost primijećena u 70% sojeva EBV-a (Mei i sur., 2022). Također, C-terminalni krajevi pojedinih EBV gena pokazuju veliku varijabilnost, pri čemu C-terminalni kraj gena latentnog membranskog proteina 1 (*LMP-*

2.3 Mehanizam infekcije

Čovjek je dugo bio jedini poznat domaćin EBV-a sve dok 2017. godine Wang i sur. nisu potvrdili mogućnost zaraze verirovki (*Tupaia belangeri chinensis*) intravenskom aplikacijom viriona EBV-a. Uspješnost zaraze ovih životinja potvrđena je praćenjem kinetike virusne replikacije, ekspresije virusnih gena kao i sintezom protutijela specifičnih za EBV (Wang i sur., 2017). Verirovka je sisavac koji živi na području tropskih šuma južnoistočne Azije, pripada redu verirovki (*Scadentia*), ali posjeduje velike genske sličnosti s primatima (Xia i sur., 2022). Naime, receptor sustava komplementa 2 (CR2, od eng. *Complement receptor 2*) poznat i kao klaster diferencijacije 21 (CD21, od eng. *Cluster of differentiation 21*) sadrži 4 vezna mjesta, I27, F96, K108 i T100, na površini limfocita B verirovke koja homologijom u potpunosti odgovaraju sekvencijama za 4 vezna mjesta CR2 kod čovjeka (Xia i sur., 2022). Receptor CR2 na površini limfocita B nužan je za vezanje proteina gp350 odnosno uspostavu kontakta između EBV-a i ciljne stanice tijekom početka infekcije (Murata i sur., 2021).

Glavne ciljne stanice EBV-a su limfociti B i epitelne stanice, ali virus može inficirati limfocite T te NK stanice (Gru i sur., 2015). Infekcija EBV-om dijeli se u 3 osnovne faze: primarna infekcija i litička replikacija, latencija i litička reaktivacija (Huang i sur., 2024).

2.3.1 Primarna infekcija i litička replikacija

Glavni put prijenosa EBV-a je putem sline zaraženih osoba u akutnoj fazi infekcije ili osoba kod kojih je došlo do reaktivacije replikacije virusa (Murata i sur., 2021). Epitelne stanice orofarinksa stoga su prve stanice koje EBV zaražava *in vivo* (Chen i Longnecker, 2019). Zaraza EBV-om moguća je i prilikom transfuzije krvi ili transplantacije alografta (Shechter i sur., 2022). Istraživanja *in vitro* pokazala su da zaraza epitelnih stanica u kulturi EBV-om najčešće dovodi do zastoja staničnog ciklusa i litičke faze ciklusa virusa (Chen i Longnecker, 2019). Hayman i sur. (2022) dokazali su uspostavu latencije u nediferenciranim epitelnim stanicama na organotipskom modelu stratificiranog epitela zaraženog EBV-om (Hayman i sur., 2023). Međutim, EBV prilikom primarne infekcije u većini slučajeva u epitelnim stanicama uspostavlja litičku fazu kojom se novonastali virioni šire na limfocite B (Chen i Longnecker, 2019). Osim litičkom aktivacijom, EBV do limfocita B i T može doći i procesom transcitoze kroz epitelne stanice (Murata i sur., 2021). Ulazak EBV-a u epitelnu stanicu omogućen je na 2 načina: direktnom fuzijom virusne vanjske ovojnice sa staničnom membranom ciljne stanice

domaćina ili procesima endocitoze i mikropinocitoze. U fuziji membrana endocitozom sudjeluju glikoproteini EBV-a gp350, BMRF2 te proteini gB i gH/gL koji čine glavni proteinski fuzijski kompleks (Murata i sur., 2021). Protein gB pokreće fuziju virusne ovojnice i stanične membrane domaćina, dok heterodimer gH/gL mijenja prvu konformaciju gB-a kako bi se dvije membrane spojile. Stanični receptor neuropilin 1 (NRP1) veže se za gB i smatra se najvažnijim receptorom za infekciju epitelnih stanica pri čemu učinkovitost ovog procesa ovisi i o broju receptora gB na vanjskoj ovojnici EBV-a (Chen i Longnecker, 2019).

Infekcija epitelnih stanica i limfocita B dijeli brojne sličnosti, glavni protein EBV-a koji sudjeluje u procesu primarne infekcije limfocita B je protein vanjske ovojnice EBV-a, glikoprotein gp350 koji se veže za CR2 na površini limfocita B. Uz gp350, u procesu primarne infekcije limfocita B nužan je i gp42 koji se veže za antigen ljudskog leukocita razreda II (HLAII, od eng. *Human leukocyte antigen 2*) (Silva i sur., 2024). Također, kao i kod epitelnih stanica, u procesu fuzije membrana sudjeluje kompleks gH/gL i gB koji približava dvije membrane (Möhl i sur., 2016). Virusi nastali unutar epitelnih stanica imaju visoku ekspresiju trimeričnog kompleksa glikoproteina gH/gL–gp42 zbog čega imaju i veću tendenciju za infekciju limfocita B u usporedbi s epitelnim stanicama (Chen i Longnecker, 2019). Limfociti B imaju visoku ekspresiju kompleksa HLA razreda II koji se veže za gp42 i razgrađuje ga u Golgijevu tijelu. Virusi nastali unutar limfocita B stoga sadrže više heterodimera gH/gL nego trimeričnog kompleksa gH/gL – gp42 što ih čini pogodnijima za infekciju epitelnih stanica (Chen i Longnecker, 2019). Tegument i nukleokapsida razgrađuju se u citoplazmi pomoću staničnih enzima domaćina, a genom se u obliku linearne dvolančane DNA kroz nuklearnu poru ubacuje u jezgru (Deakyne i sur., 2017). Prije ulaska u jezgru, nekromatizirana i linearna dvolančana molekula DNA virusa se, pomoću enzima domaćina, cirkularizira u obliku episoma kako bi se utišali geni EBV-a (Deakyne i sur., 2017). Cirkulariziran genom EBV-a stupa u interakciju s trodimenzionalnom strukturom genoma domaćina na mjestima veće transkripcijske aktivnosti odnosno na dijelu genoma gdje se nalazi više pojačivača koji će privući transkripcijske faktore odnosno omogućiti uspostavu latentne faze (Buschle i Hammerschmidt, 2020).

2.3.2 Latencija

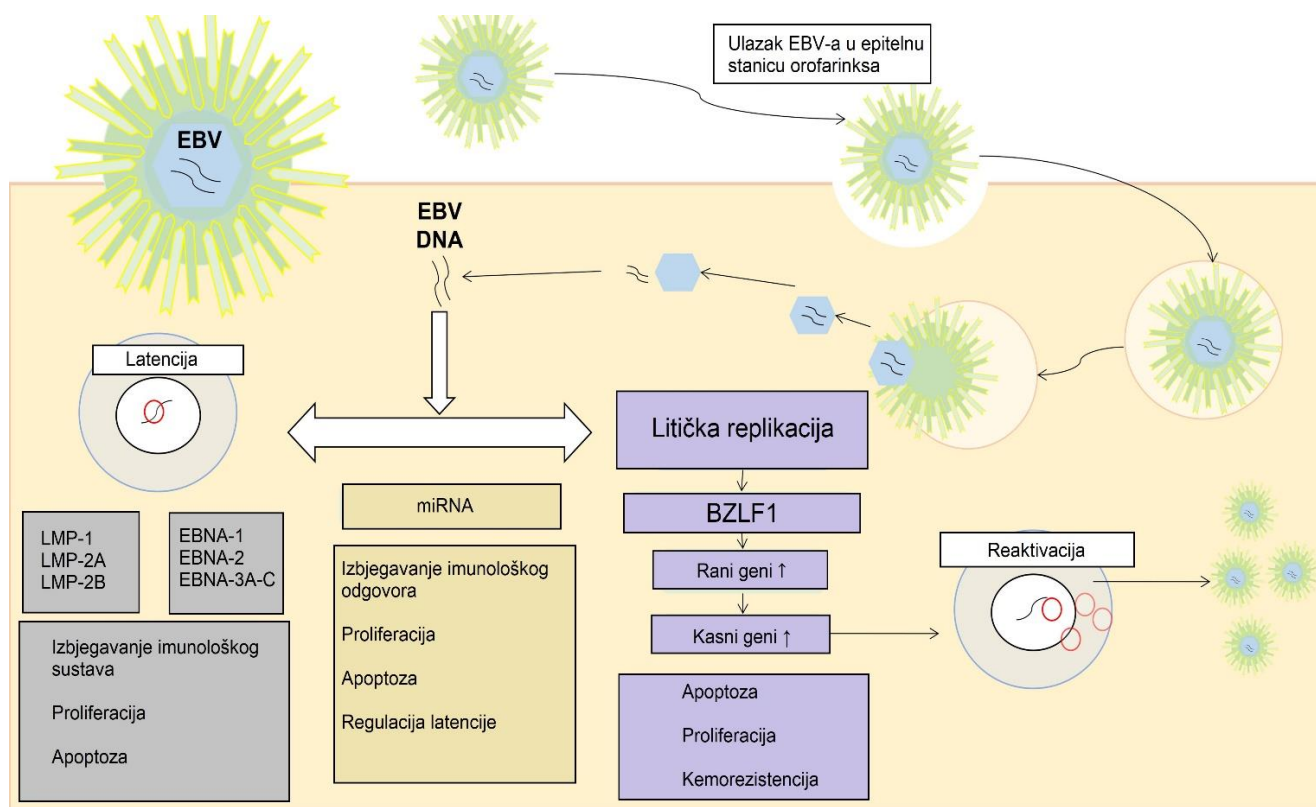
EBV najčešće uspostavlja latenciju u memorijskim limfocitima B, ali može je u uspostaviti i u limfocitima T, stanicama NK te nediferenciranim epitelnim stanicama. Tijekom latencije,

molekula DNA EBV-a nalazi se u formi episoma te se tijekom faze S staničnog ciklusa, pomoću enzima domaćina, replicira paralelno s genomom kako bi se osigurala pravilna raspodjela episoma u novonastale stanice kćeri (Murata i sur., 2021). Definirane su četiri različite vrste latencije: latencija III, II, I i 0 koje se međusobno razlikuju po uzorku ekspresije gena i nekodirajućih RNA. Cilj uspostave različitih vrsta latencije je održavanje episoma EBV-a uz istovremeno izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina (Ayee i sur., 2020). Slijed uspostave različitih vrsta latencije ide u smjeru od latencije III s najviše eksprimiranih gena do latencije 0 koja nema eksprimirane proteine uz iznimku predlatentne faze gdje je prisutna latencija IIB (Caruso i sur., 2022). Latencija tipa 0, koja se uspostavlja u memorijskim limfocitima B, nema eksprimiranih proteina odnosno eksprimirane su samo EBER i miRNA (Caruso i sur., 2022). Antigen-prezentirajuće stanice domaćina stoga ne izlažu proteine EBV-a koji će potaknuti imunološki odgovor te se ovaj oblik latencije uspostavlja u limfocitima B periferne krvi (Price i Luftig, 2015). Najveći broj gena prepisuje se tijekom latencije tipa III u kojoj su eksprimirani geni za EBV jezgrine antigene (*EBNA*, od eng. *EBV nuclear antigen*) *EBNA1*, *EBNA-2*, *EBNA-3A*, *EBNA-3B*, *EBNA-3C*, geni za latentni protein (*LP*, od eng. *Latent protein*), geni za latentne membranske proteine (*LMP*, od eng. *Latent membrane protein*) *LMP-1*, *LMP-2A* i *LMP-2B* te nekodirajuće RNA, EBER i miRNA (Huang i sur., 2024). Latencija tipa II dijeli se na latenciju IIA i IIB prilikom čega se latencija tipa IIA uspostavlja u limfocitima B unutar germinalnog centra, dok se latencija tipa IIB, koja prethodi latenciji tipa III, uspostavlja u predlatentnoj fazi unutar inficiranih naivnih limfocita B (Murata i sur., 2021). U latenciji tipa IIA su, uz molekule EBER i miRNA, eksprimirani geni *EBNA-1*, *LMP-1*, *LMP-2A* i *LMP-2B*, dok su u latenciji IIB, uz molekule EBER i miRNA, eksprimirani geni *EBNA-1*, *EBNA-2*, *EBNA-3A*, *EBNA-3B*, *EBNA-3C* i *LP*. U latenciji I, uspostavljenoj u proliferirajućim memorijskim limfocitima B je, uz EBER i miRNA, eksprimiran samo gen *EBNA-1* (Torne i Robertson, 2024). Nerger i sur. (2023) dokazali su da jezgreni protein SFPQ ima važnu ulogu u održavanju latencije potičući ekspresiju histona H1 koji, osim što stabilizira nukleosom, prikriva promotor *BZLF-1*, gen odgovoran za litičku reaktivaciju (Murray-Nerger i sur., 2024).

2.3.3 Litička reaktivacija replikacije EBV-a

Litička faza replikacijskog ciklusa EBV-a može započeti već tijekom primarne infekcije EBV-om kod imunokompromitiranih osoba ili osoba koje prethodno nisu stupile u kontakt s virusom

(Nowalk i Green, 2016). Naime, većina primarnih infekcija završava uspostavom latencije u memorijskim limfocitima B te se novi virioni sposobni za infekciju drugih stanica domaćina stvaraju prilikom litičke reaktivacije koja se događa u terminalno diferenciranim limfocitima B odnosno plazma stanicama (McKenzie i El-Guindy, 2015). Ukoliko je imunološki sustav domaćina oslabljen, EBV započinje litičku reaktivaciju ekspresijom vrlo ranih (IE, od eng. *Immediate early*), ranih (E, od eng. *Early*) i kasnih (L, od eng. *Late*) gena (Gruffat i sur., 2016). Vrlo rani geni, *BZLF1* i *BRLF1* kodiraju za transkripcijske faktore koji će se vezati za *OriLyt* mjesto genoma i time aktivirati vlastite i promotore od 40 ranih (E) gena (Dickerson i sur., 2009). Rani geni sintetiziraju proteine potrebne za replikaciju DNA, metabolizam virusa te dovođenje molekule RNA polimeraze II do promotora čime aktiviraju 36 kasnih (L) gena (Dickerson i sur., 2009). Kasni geni kodiraju proteine nužne za sastavljanje viriona kao što su glikoproteini, proteini kapside, proteine odgovorne za pakiranje genoma u kapsidu te proteine koji sudjeluju u otpuštanju novonastalih viriona iz stanice domaćina (Aubry i sur., 2014) (Slika 3.). Litička reaktivacija kontrolirana je metilacijom molekule DNA odnosno prisutstvom histona na mjestima *OriLyt* čime se održava stanje latencije (Guo i Gewurz, 2022). Tijekom stvaranja novih viriona, EBV uspostavlja ekspresiju seta gena koji će limfocite B potaknuti na proliferaciju i diferencijaciju u memorijske stanice unutar germinalnog centra (Guo i Gewurz, 2022). Također, određeni bakterijski sojevi kao što su *Streptococcus pyogenes* i *Helicobacter pylori* mogu potaknuti reaktivaciju EBV-a aktivacijom staničnih proteina koji sudjeluju u procesima apoptoze i proliferacije (Indari i sur., 2024). Genom EBV-a nakon replikacije je nemetiliran te ne posjeduje kromatin, a metilacija genoma događa se ukoliko EBV ulazi u latentnu fazu kako bi se onemogućila ekspresija određenih gena (Kong i Giulino-Roth, 2024). Završetkom replikacije, novonastali genomi u formi episoma lineariziraju se pomoću virusnog terminaza kompleksa i pakiraju u nukleokapside (Huang i sur., 2023). Tegument i vanjsku ovojnicu novonastali virus dobiva u citoplazmi gdje se formirani virioni, pomoću staničnih vezikula i procesom egzocitoze, izbacuju van iz stanice (Huang i sur., 2023).



Slika 3. Prikaz replikacijskog ciklusa virusa Epstein-Barr (EBV). EBV nakon primarne infekcije može uspostaviti latentnu fazu u kojoj je genom EBV-a cirkulariziran u oblik episoma te ostaje u neaktivnom stanju unutar jezgre domaćina, ili litičku fazu koja započinje prijepisom vrlo ranih (*BZLF1*), ranih te kasnih gena čiji će produkti formirati nove virione. Preuzeto i prilagođeno prema Wen i sur., (2022).

2.4 Izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina

U svrhu održavanja doživotne latencije u stanicama domaćina, EBV je razvio brojne mehanizme za izbjegavanje imunološkog odgovora koji djeluju na urođenu i stečenu imunost domaćina (Silva i sur., 2024). Jedan način izbjegavanja imunološkog odgovora domaćina je blokada sinteze, ekspresije ili signalizacije TLR-a. Protein LMP-1 pridonosi smanjenju ekspresije promotora gena za TLR9, dok protein tegumenta BPLF1, uklanjajući ubikvitin sa proteina, negativno regulira signaliziranje potaknuto vezanjem na TLR (Silva i sur., 2024). Obrambeni mehanizmi EBV-a djeluju i na skupinu molekula HLA, protein BGLF5 blokira sintezu HLA klase I što pridonosi smanjenoj citotoksičnoj aktivnosti CD8⁺ limfocita T. Protein BNLF2a sprječava vezanje tj. prezentaciju virusnih antigena na već sintetiziranim molekulama

HLA klase I, dok protein BILF1 sudjeluje u njihovoj endocitozi i degradaciji (Albanese i sur., 2022). Na kompleks molekula HLA klase II može se vezati protein BZLF2 čime onemogućava prezentiranje antigena a time i aktivaciju CD4⁺ limfocita T (Albanese i sur., 2022). Osim proteina, u inhibiciji odgovora imunološkog sustava sudjeluje i nekoliko miRNA poput EBV-miR-BART6-3p koja inhibira receptor sličan molekuli RIG-I čime sprječava signalizaciju koja bi dovela do apoptoze zaražene stanice (Lu i sur., 2017). Osim miR-BART6-3p, i druge miRNA poput miR-BART3 i miR-BART19 djeluju na netranslantiranu 3' regiju RIG-I mRNA čime također blokiraju njenu funkciju te veći broj EBV-om zaraženih stanica nastavlja proliferaciju (Lu i sur., 2017). Također, stanice zaražene EBV-om otpuštaju izvanstanične vezikule s virusnim proteinima do drugih stanica domaćina. LMP-1 jedan je od proteina prenošen vezikulama koji regulira staničnu ekspresiju liganda 1 programirane stanične smrti (PD-L1, od eng. *Programmed cell death protein 1 ligand*) važnog za supresiju imunološkog sustava (Abou Harb i sur., 2023). Primjerice, EBV-pozitivne stanice NPC-a sadrže veću količinu PD-L1 (Dias i sur., 2022). Genomom EBV-a kodiran je i virusni protein koji iskazuje homologiju s ljudskim protuupalnim citokinom interleukinom-10 koji također omogućuje ovom virusu uspješno izbjegavanje imunskog odgovora.

2.5 Bolesti povezane s EBV-om

EBV je prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje tumora (IARC, od eng. *International agency for research on cancer*) svrstan među karcinogene prvog razreda te se procjenjuje da uzrokuje približno 1-2% malignih bolesti godišnje (Münz, 2019). Prvi je izoliran ljudski onkogeni virus koji može uzrokovati maligne promjene u limfocitima B, limfocitima T, epitelnim stanicama i stanicama NK (Yu i Robertson, 2023). Maligne bolesti uzrokovane EBV-om uključuju limfome te epitelne i mezenhimalne karcinome (Shechter i sur., 2022). Za malignu transformaciju stanica domaćina u kojima je uspostavljena latencija potrebna je promjena genskog uzorka ekspresije. Ekspresija više od 11 000 gena domaćina regulirana je EBV-om u svrhu prekidanja latencije limfocita B odnosno poticanja njihove diferencijacije i proliferacije (Shechter i sur., 2022). Infekcija EBV-om *in vitro* uzrokuje transformaciju naivnih memorijskih limfocita B u kontinuirane proliferirajuće limfoblastoidne linije (LCL, od eng. *Lymphoblastoid cell lines*) (Bauer i sur., 2021). Proces transformacije limfocita EBV-om i dalje je nepotpuno razjašnjen *in vivo* (Bauer i sur., 2021) (Bauer i sur., 2021). Osim malignih bolesti, infekciju EBV-om povezuje se i s brojnim drugim bolestima kao što su IM, multipla skleroza, sindrom

kroničnog umora, Alzheimerova bolest, encefalitis, cerebelarna ataksija i reumatoidni artritis (Sausen i sur., 2021). Također, longitudinalno istraživanje koje su proveli Hendstrom i sur. (2020) pokazalo je statistički značajnu povezanost između povećanog titra antitijela za EBNA-1 i incidencije multiple skleroze (MS) (Hedström i sur., 2020). Učinak zaraze EBV-om na incidenciju MS potvrđen je longitudinalnim istraživanjem koje su proveli Bjornevik i sur. (2022) čime je dokazano da osobe zaražene EBV-om imaju 32 puta veću mogućnost da će u budućnosti razviti MS što nije bilo primijećeno prilikom zaraze citomegalovirusom (CMV) (Bjornevik i sur., 2022).

2.5.1 Infektivna mononukleoza

Većina primarnih infekcija EBV-om događa se tijekom djetinjstva te ostaje asimptomatska (Abbott i sur., 2017). Primarna infekcija kod djece ili adolescenata može biti i simptomatska pri čemu se klinički očituje kao IM (Münz, 2019). Najčešći način prijenosa EBV-a je putem sline u kojoj se nalaze epitelne stanice orofarinksa zaražene EBV-om u litičkoj fazi replikacijskog ciklusa, te se IM često naziva „bolest poljupca” (Abbott i sur., 2017). Incidencija IM veća je u razvijenim zemljama u usporedbi sa zemljama u razvoju koje imaju lošije higijenske uvjete i u kojima većina djece u ranoj dobi stupa u kontakt s EBV-om (Tattevin i sur., 2006). Klinička prezentacija IM ovisi o dobi osobe pri čemu uobičajena klinička slika uključuje povišenu temperaturu, generalizirano povećanje limfnih čvorova te povećanje jetre i slezene (Vince i sur., 2007). Najvažnije promjene u bijeloj krvnoj slici koje su karakteristične za IM su leukocitoza s relativnom i apsolutnom limfocitozom, povećan postotak CD8+limfocita T te smanjen postotak CD4+ limfocita T i omjer navedenih subpopulacija (Vince i sur., 2007). U osoba s IM prisutni su neuobičajeno veliki limfociti u perifernoj krvi poznati kao Downey stanice, odnosno aktivirani limfociti T koji sudjeluju u obrani stanica zaraženih EBV-om (Dunmire i sur., 2015). IM praćena je potpunim ozdravljenjem u 95% oboljelih, a najčešće komplikacije uključuju autoimunosnu hemolitičku anemiju i trombocitopeniju, dok neurološke komplikacije nastaju u manje od 1% oboljelih (Vince i sur., 2007). Puknuće slezene rijetka je komplikacija infekcije EBV-om koja u imunokompromitiranih osoba može uzrokovati smrtni ishod. Također, u kasne komplikacije IM ubrajamo i maligne bolesti koje nastaju kao posljedica onkogenog djelovanja virusa u fazi latencije (Vince i sur., 2007).

2.6 Molekularna raznolikost

S obzirom na gensku varijabilnost, EBV se može klasificirati na određene tipove i varijante. Najpoznatija podjela EBV-a je na tip 1 i tip 2 koji su poznati još i kao tip A i tip B, na temelju raznolikosti gena *EBNA-2* i gena za jezgreni antigen EBV-a 3C (*EBNA-3C*, od eng. *EBV nuclear antigen 3C*) (Mendes i sur., 2008) (Damania i sur., 2022). Osim tipova I i II, EBV može biti razvrstan u nekoliko varijanti s obzirom na raznolikosti gena *LMP-1*, EBV jezgrenog antigena 1 (*EBNA-1*, od eng. *EBV nuclear antigen 1*), na temelju raznolikosti gena *BLLF1* koji kodira za glikoprotein gp350/220 te na temelju raznolikosti promotora Zp (Edwards i sur., 1999; Lorenzetti i sur., 2010; Luo i sur., 2012; Jin i sur., 2010). Tipovi, podtipovi i varijante EBV-a određeni na temelju genske raznolikosti ovog virusa mogu biti geografski vezani te su određene varijante imenovane prema geografskoj lokaciji (Damania i sur., 2022). EBV tip 1 uspostavlja primarnu infekciju i latenciju u limfocitima B, dok EBV tip 2, češći na području ekvatorijalne Afrike, primarno zaražava limfocite T i stanice NK (Tzellos i Farrell, 2012). Gen *EBNA-2* EBV tipa 1 s genom *EBNA-2* EBV tipa 2 dijeli tek nešto više od 50% sličnosti (Tzellos i Farrell, 2012). Genska varijabilnost EBV-a u najvećoj mjeri istraživana je u kontekstu malignih bolesti s naglaskom na Hodgkinove limfome i NPC (Begić i sur., 2022; Alanazi i sur., 2024). Međutim, genska varijabilnost EBV-a u osoba s IM s područja Hrvatske oskudno je istražena.

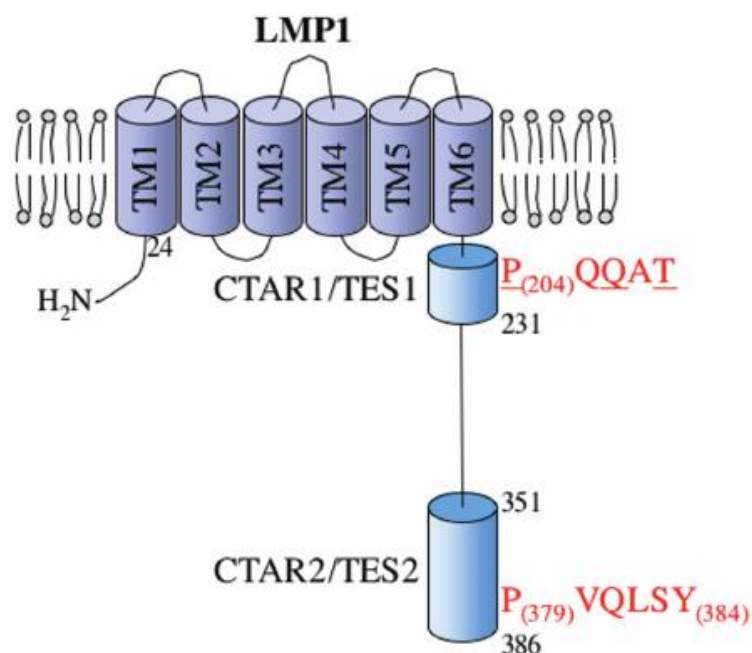
2.6.1 Raznolikost gena *LMP-1*

Gen *LMP-1*, poznat i pod nazivom *BNLFI*, kodira istoimeni protein koji se smatra glavnim onkoproteinom EBV-a. Signalizacijom oponaša molekulu klastera diferencijacije 40 (CD40, od eng. *Cluster of differentiation 40*), člana superporodice receptora faktora tumorske nekroze (TNFR, od eng. *Tumor necrosis factor receptor*) (Kim i sur., 2015). Građen je od 386 aminokiselina koje čine 3 glavne domene proteina: citoplazmatski N-terminalni kraj, transmembransku regiju i C-terminalni kraj (Kieser i Sterz, 2015). N-terminalni kraj proteina LMP-1 najkraći je dio proteina te se sastoji od svega 24 aminokiseline smještene u citoplazmi, transmembranski dio sastavljen od šest hidrofobnih alfa lanaca proteže se do aminokiseline 186, dok zadnjih 200 aminokiselina čini citoplazmatski C-terminalni kraj (Salahuddin i sur., 2019) (Slika 4.). C-terminalni kraj proteina LMP-1 sadrži tri aktivirajuće C-terminalne regije (CTAR, od eng. *C-terminal activating region*), CTAR1, CTAR2 i CTAR3 odgovorne za transformaciju stanica (Salahuddin i sur., 2019). Regija CTAR1 obuhvaća aminokiseline 194-

232 i aktivira signalni put NF- κ B dovodeći faktore povezane s receptorima TNFR dok CTAR3, koji prethodi CTAR2, obuhvaća aminokiseline 275-330 i sudjeluje u aktivaciji transkripcije STAT signalnog puta (Zhang i sur., 2019). CTAR2 obuhvaća aminokiseline 351-386 i posreduje u aktivaciji puta NF- κ B na način da stupa u interakciju s proteinom domene smrti TRA (Zhang i sur., 2019). Ove regije nazivaju se i temeljna transformacijska mjesta (TES, od eng. *Transformation essential site*) te su regije TES1 (CTAR1) i TES2 (CTAR2) nužne za transformaciju limfocita B u besmrtnu limfoblastoidnu staničnu liniju (Zhang i sur., 2019). Također, regije CTAR1 i CTAR2 sadrže specifična aminokiselinska mjesta Gln-Gln-Ala-Thr (QQAT) odnosno Val-Gln-Leu-Ser-Tyr (VQLSY), na koje se vežu proteini koji će pokrenuti kaskadu signalnih puteva (Slika 4.) (Kieser, 2007). Za razliku od molekule CD40, protein LMP-1 provodi konstitutivnu signalizaciju koja je neovisna o ligandu već se samoaktivira samoudruživanjem u homodimere koji prelaze u oligomere međusobno se povezujući na način da C-terminalni krajevi budu slobodni za početak signalizacije (Huang i sur., 2024). Sposobnost maligne transformacije proteinom LMP-1 potvrđena je preobrazbom limfocita B i fibroblasta *in vitro* kao i indukcijom epitelno-mezenhimske tranzicije (Davis i sur., 2021). Protein LMP-1 ima ključnu ulogu u preživljenju stanice i prijenosu unutarstaničnih signala, djeluje kao receptor faktora nekroze tumora (TNF, od eng. *Tumor necrosis factor*) čime pokreće unutarstaničnu signalizaciju i u konačnici aktivira brojne signalne puteve poput NF- κ B, ERK-MAPK i p38-MAPK koji će stanični ciklus preusmjeriti u proliferaciju i izbjegavanje apoptoze (Cheerathodi i Meckes, 2018). Inhibicijom apoptotskih i diferencirajućih procesa, potiče neovisan rast stanica i njihov gubitak kontaktne inhibicije sa susjednim stanicama (Cheerathodi i Meckes, 2018).

C-terminalni kraj *LMP-1*, odgovoran za indukciju stanične signalizacije, ujedno je i najvarijabilnija regija čije su pojedine mutacije karakteristične za određene varijante virusa. Raznolikost C-terminalnog kraja prvi put definirana je u radu Edwards i sur. (1999) u kojem su opisane pozicije aminokiselina s prisutnim polimorfizmom u usporedbi s divljim tipom B95-8 (Edwards i sur., 1999). Primijećen je uzorak mutacija koji odgovara određenom geografskom području te su stoga definirane varijante China1, China2, Mediterranean bez delecije, Mediterranean s delecijom, Alaskan i North Carolina (Edwards i sur., 1999). Definiran je i China 3 kao mogući produkt homologne rekombinacije varijanti China 1 i North Carolina s obzirom da su pojedine aminokiseline svake od dviju varijanti pronađene u China 3. Analiza raznolikosti gena *LMP-1* provedena je većinom na malignim bolestima povezanim s EBV-om s naglaskom na NPC, dok su istraživanja raznolikosti EBV-a u osoba s IM oskudnija (Alanazi

i sur., 2024). U našem preliminarnom istraživanju (2023) dokazali smo da je u bolesnika s IM na području Hrvatske najčešća zaraza EBV-om divljeg tipa (B95-8), dok su na ostalim sekvencijama definirane tri varijante: China1, North Carolina i Mediterranean (Zidovec-Lepej i sur., 2023). U dijelu uzoraka (<10%) prisutnost delecije od 30 pb obuhvaćajući aminokiseline 346-355, prvi put definirane na uzorcima iz područja Kine kao karakteristična delecija varijante CAO LMP-1, pronađene na uzorcima NPC (Hu i sur., 1991). Delecija 30 pb gena *LMP-1* većinom se veže za CAO LMP-1 i NPC, no otkrivena je i u 66% djece s IM sa područja SAD-a (Berger i sur., 1997). Osim delecije 30 pb, na jednom uzorku dokazana je delecija od 69 pb koja je također otkrivena prilikom analize NPC-a na području Tunisa gdje je pokazano da snižava aktivaciju transkripcijskog faktora proteinskog aktivatora 1 (AP-1, od eng. *Activator protein 1*) važnog za inicijaciju apoptoze u uvjetima stresa (Hadhri-Guiga i sur., 2006). Također, mjereći određene hematološke parametre, dobivene sekvencije koje su polimorfizmima odgovarale dvjema ili više varijanti povezane su i s biokemijskim i imunološkim parametrima poput koncentracije C-reaktivnog proteina i omjera CD4+/CD8+ limfocita T (Zidovec-Lepej i sur., 2023). Istraživanje koje je prema geografskoj lokaciji blisko našem preliminarnom istraživanju (Zidovec-Lepej i sur., 2023) proveli su Banko i sur. (2012.) na 30 pacijenata iz Srbije s dijagnozom IM i pokazali najveću zastupljenost divljeg tipa virusa (B95-8) i varijante China1 (Gurtsevitch i sur., 2024). Istraživanje koje su Banko i sur. proveli 2016. godine na ispitanicima s dijagnozom IM iz područja Srbije pokazalo je dominaciju varijante China1 (Banko i sur., 2016). Sekvenciranje *LMP-1* na skupini etničkih Kazanskih Tatara i etničkih Slavena iz područja Moskve koje su proveli Gurtsevitch i sur. (2020) pokazalo je različit obrazac molekularne raznolikosti virusa obzirom na skupinu ispitanika (Gurtsevitch i sur., 2024). Naime, u svih Slavena iz područja Moskve dokazane su četiri definirane varijante: China1, Mediterranean bez delecije, North Carolina ili divlji tip B95-8, dok je većina sekvencija dobivenih iz uzorka krvi pripadnika Tatara pokazala dosad nedefinirane polimorfizme (Gurtsevitch i sur., 2024). Raznolikost promotora gena *LMP-1* analizirana među pedijatrijskim pacijentima s dijagnozom IM potomaka europskih imigranata i američkih domorodaca u najvećoj mjeri obuhvaća divlji tip te je na filogenetskom stablu većina dobivenih sekvencija bila grupirana s B95-8 (Gantuz i sur., 2013). Raznolikost C-terminalnog kraja *LMP-1* u osoba s IM na području Hrvatske ograničena je na naša prethodna istraživanja, dok su jedina istraživanja bliska našem geografskom području proveli Banko i sur. na području Srbije. Ovisnost raznolikosti gena *LMP-1* o raznolikosti ostalih gena EBV-a te njihova međusobna statistička značajnost, oskudno su istraženi (Banko i sur., 2016).



Slika 4. Građa transmembranskog proteina LMP-1 (LMP1). LMP-1 građen je od citoplazmatskog N-terminalnog kraja i citoplazmatskog C-terminalnog kraja koji sadrži aktivirajuće regije, regija CTAR3 nalazi se između regije CTAR1 i CTAR2. Aminokiselinski sljedovi QQAT odnosno VQLSY na CTAR-u mjesta su vezanja proteina TRAF I TRADD koji pokreću kaskadu signalnih puteva (Kieser, 2007).

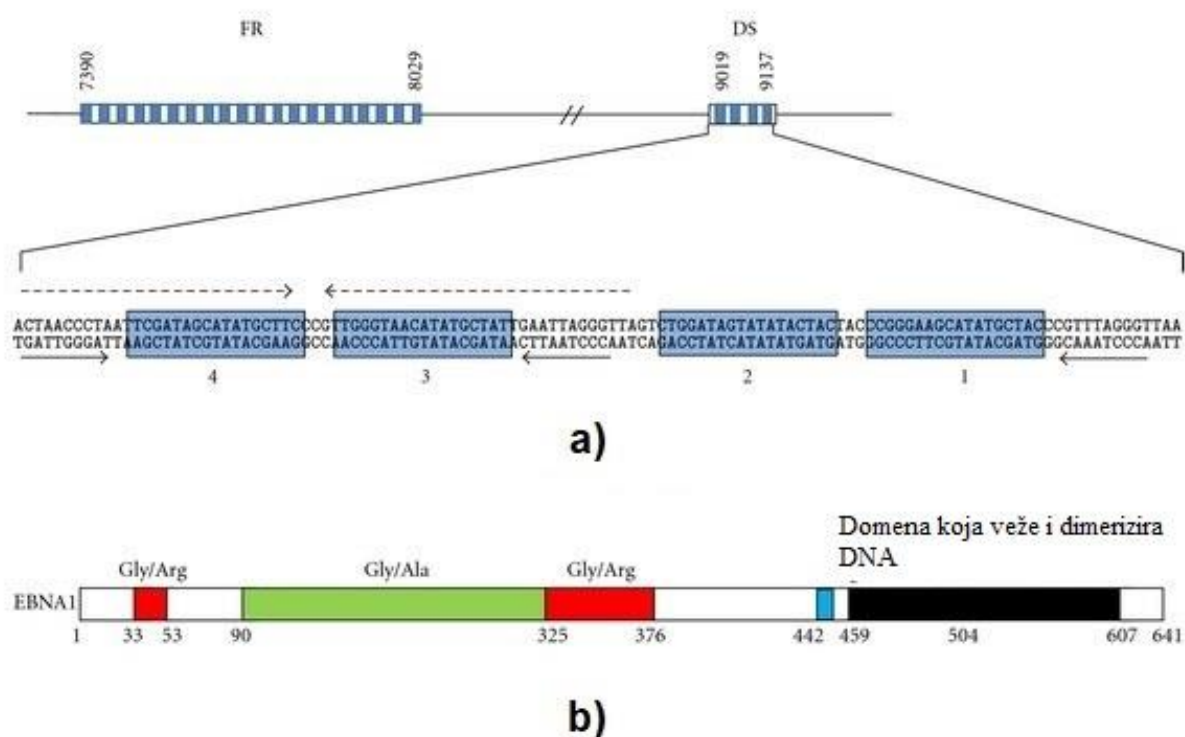
2.6.2 Raznolikost gena *EBNA-1*

Gen *EBNA-1* kodira protein koji se sastoji od 641 aminokiseline i koji interakcijom triju dimera stvara strukturu heksamernog prstena (Deakyne i sur., 2017). Gen *EBNA-1* eksprimiran je tijekom litičke faze te tijekom svih vrsta latencije osim u latenciji tipa 0 (Huang i sur., 2023). Također, EBNA-1 jedini je protein eksprimiran u svim malignim bolestima koje su povezane s EBV infekcijom (Mei i sur., 2022). Protein EBNA-1 sastoji se od dvije osnovne regije tj. od N-terminalnog kraja nužnog za prijanjanje uz kromosom domaćina i aktivaciju replikacije episoma i od C-terminalnog kraja koji sadrži domenu koja veže DNA (Frappier, 2015). Tijekom latencije, uloga proteina je očuvanje integriteta te pravilne replikacije i segregacije episoma čija se replikacija odvija jednom po staničnom ciklusu odnosno u skladu s replikacijom genoma domaćina (Frappier, 2015). EBNA-1 je DNA vezujući protein koji se zahvaljujući specifičnosti sekvencije može vezati na genom domaćina unutar mjesta *OriP* i samog promotora *EBNA-1* (Kim i sur., 2020). Unutar *OriP*, protein EBNA-1 veže se na elemente DS čime sudjeluje u

indukciji replikacije episoma (Slika 5.) (Mei i sur., 2022). Naime, protein EBNA-1 se može vezati na više od 1000 mjesta unutar genoma domaćina od kojih neki utječu na regulaciju transkripcije gena domaćina, no funkcija većine vezujućih mjesta i dalje je nepoznata (Kim i sur., 2020).

Gen *EBNA-1* ima varijabilan C-terminalni kraj čija je raznolikost primarno temeljena na mutaciji za aminokiselinu 487 (Lorenzetti i sur., 2010). S obzirom na prisutnu aminokiselinu, razlikuju se 2 *EBNA-1* prototipa koji na ovoj poziciji imaju treonin (P-thr) odnosno alanin (P-ala) i 3 varijante koje na poziciji 487 imaju leucin (V-leu), valin (V-val) ili prolin (V-pro) (Lorenzetti i sur., 2010). Referentni soj B95-8, prema klasifikaciji gena *EBNA-1*, pripada prototipu P-ala (Gutiérrez i sur., 1998). Lorenzetti i sur. (2010) definirali su i određene podvarijante gena *EBNA-1* u čiju je klasifikaciju, uz aminokiselinu 487, uključeno još 15 dodatnih aminokiselinskih mjesta (Lorenzetti i sur., 2010). Podvarijante gena *EBNA-1* pronađene su kod IM, ali i kod limfoma te su neke od njih definirane u istraživanjima koja su proveli Fassone i sur. (2000) te Thuan i sur. (2019) (Fassone i sur., 2000, Thuan i sur., 2019). Raznolikost varijanti i podvarijanti gena *EBNA-1* u bolesnika s IM istražena je na području Brazila na 26 uzoraka iz različitih dobnih skupina te je primijećeno je da su dvije najčešće varijante bili prototip P-ala i varijanta V-leu, dok je najčešća podvarijanta bila V-leuAg (Taf i sur., 2024). Istraživanjem raznolikosti C-terminalnog kraja gena *EBNA-1* provedenom u Kini kod djece s IM najčešća varijanta gena *EBNA-1* bila je V-val te je 98% uzoraka imalo podvarijantu V-val-v1 (Ai i sur., 2012). Istraživanje Sullivan i sur. (2019) na području grada Toronta pokazalo je da je *EBNA-1* prototip P-thr najčešći u bolesnika s IM kao i u bolesnika nakon postupka transplantacije od kojih je dio razvio posttransplantacijsku limfoproliferativnu bolest (Sullivan i sur., 2019). U geografskoj blizini Hrvatske, istraživanje raznolikosti *EBNA-1* proveli su Banko i sur. (2016) na uzorcima plazme odraslih pacijenata iz Srbije s dijagnozom IM (Banko i sur., 2016). Istraživanje je pokazalo prisutnost dva prototipa, P-thr (61,3%) i P-ala (38,7%), te nije dokazana statistički značajna korelacija između varijanti *EBNA-1* sa biokemijskim i kliničkim parametrima (Banko i sur., 2016). Također, Banko i sur. (2019) proveli su analizu varijanti gena *EBNA-1* na uzorcima biopsije (uzorcima bioptata bolesnika s NCP-om) NPC-a, uzorcima plazme prikupljene od pacijenata s IM te uzorcima plazme pacijenta nakon transplantacije bubrega (Banko i sur., 2019). U ispitanika su dokazani prototipovi P-thr i P-ala, te varijante V-val i V-ala, a dokazali su i statistički značajnu povezanost

između podvarijante P-thr-sv-5 i NPC-a (Banko i sur., 2019). Varijacije C-terminalnog kraja gena *EBNA-1* mogu biti predispozicija za nastanak malignih bolesti poput primjerice varijante V-val čija je pojava vezana za NPC, mogući uzrok veće incidencije NPC-a uz V-val varijantu je povećanje transkripcije virusnih gena kao i gena domaćina koje je primijećeno kod EBV-a s ovom varijantom (Neves i sur., 2017). Na području Hrvatske, istraživanja koja obuhvaćaju EBNA-1 usmjerena su na protein te provedena u kontekstu analize povezanosti anti-EBNA antitijela s remisijom MS, kao i utjecaja proteina EBNA-1 na kromosomske aberacije (Koščak Lukač i sur., 2024; Gruhne i sur., 2009). Raznolikost odnosno sistematizacija varijanti gena *EBNA-1* među IM zasad još nije dokumentirana na području Hrvatske.



Slika 5. Definirane domene mjesta *OriP* (a) i gena *EBNA-1* (b). Unutar DS elemenata promotora *OriP*, plavim kvadratima naznačena su 4 mjesta na koje se veže EBNA-1. Preuzeto i prilagođeno prema Frappier (2015).

2.6.3 Raznolikost gena *EBNA-2*

Gen *EBNA-2* je, uz *EBNA-3A* i *EBNA-3C*, jedan od triju gena na temelju čije se raznolikosti može definirati EBV tip 1 odnosno tip 2 (Zanella i sur., 2019). Osim što se razlikuju prema staničnom tropizmu prilikom čega su limfociti B primarna ciljna stanica EBV tipa 1 odnosno limfociti T primarne ciljne stanice EBV tipa 2, tipovi EBV-a razlikuju se i u sposobnosti imortalizacije limfocita B za što je odgovorna varijabilnost njihova C-terminalnog kraja (Friberg i sur., 2015). Uspoređujući EBV tip 1 i 2, *EBNA-2* se najviše razlikuje u aminokiselinskom slijedu N-terminalnog kraja, no varijabilnost C-terminalnog kraja odgovorna je za sposobnost transformacije stanica (Cancian i sur., 2011). Veličina proteina *EBNA-2* kod EBV tipa 1 je 487 aa, dok je kod EBV tipa 2 veličine 455 aa (Teshome i sur., 2023). Sličnost između proteina je 70,0%, dok je sličnost gena 54,0% (Teshome i sur., 2023). Protein *EBNA-2* referentnog soja B95-8 pripada tipu 1 i veličine je 487 aa, posjeduje dvije transaktivacijske domene te mogućnost formiranja dimera odnosno multimera (Friberg i sur., 2015). Većina istraživanja koristi EBV tip 1 koji u usporedbi s tipom 2 ima veću sposobnost transformacije limfocita B *in vitro* (Romero-Masters i sur., 2020). Dokaz da je protein *EBNA-2* ključan za sposobnost transformacije otkrili su Cohen i sur. (1989) u istraživanju u kojem je EBV tipa 2 s rekombinantnim genomom odnosno genom *EBNA-2* unesenim iz tipa 1, preuzeo razinu njegove sposobnosti transformacije limfocita B (Cohen i sur., 1989). Osim transaktivacijske domene, karakteristične regije proteina *EBNA-2* su dvije samo-asocirajuće N-terminalne domene, regija bogata prolinom, regija koja sudjeluje u interakciji s proteinom koji veže DNA RBP-Jk, regija bogata argininom i glicinom i C-terminalni kraj koji djeluje kao lokalizacijski signal jezgre (Cancian i sur., 2011). Protein *EBNA-2* djeluje kao aktivator transkripcije na način da reorganizacijom kromatina regulira ekspresiju gena virusa i domaćina te je najviše eksprimiran tijekom latencije tipa III (Price i Luftig, 2015). Reorganizaciju kromatina provodi na dijelu genoma koji kontrolira transkripcijski program i regulira proliferaciju stanice domaćina te je stoga ključan protein u samom početku transformacije limfocita B (Friberg i sur., 2015). Transkripcijski aktivira kaskadu gena među kojima je i protoonkogen *MYC* odgovoran za regulaciju staničnog ciklusa i apoptoze (Teshome i sur., 2023). Istražuje se mogućnost primjene proteina *EBNA-2* u regulaciji diobe proliferativnih stanica pozitivnih na EBV postranstplantacijskih limfoproliferativnih bolesti (PTLD, od eng. *Post-transplant lymphoproliferative disorders*) (Friberg i sur., 2015).

Većina dosadašnjih istraživanja raznolikosti tipova EBV-a pokazala su najčešću zastupljenost EBV tipa 1 u svim dijelovima svijeta, dok je EBV tip 2 u području subsaharske Afrike i Nove Gvineje najčešći te ujedno i endemski tip EBV-a (Farrell, 2015). Naime, pojedina istraživanja pokazala su prisutnost EBV tipa 2 i u drugim dijelovima svijeta. U istraživanju koje je provedeno u djece s dijagnozom MS-a u Kanadi dokazana je prisutnost EBV tipa 2 (Yea i sur., 2013). Također, istraživanje koje su proveli Santon i sur. (2011) pokazalo je prisutnost oba tipa EBV-a kod 90,0% odraslih osoba s MS-om (Santón i sur., 2011). U djece s EBV infekcijom i tonzilarnom hiperplazijom na području Argentine u najviše uzoraka dokazan je EBV tip I, ali je dokazana i prisutnost tipa 2 kao i koinfekcije s oba tipa (Ferressini Gerpe i sur., 2020). U području jugoistočne Europe, Banko i sur. (2016) analizirali su raznolikosti gena *EBNA-2* u bolesnika s NPC-om te su rezultati pokazali prisutnost EBV tipa 1 u 93,7% uzoraka (Friberg i sur., 2015). U našem prethodnom istraživanju (Židovec Lepej i sur., 2022.) provedenom u djece s IM, EBV tip određen je na temelju varijabilnosti gena *EBNA-2* prilikom čega su svi uzorci klasificirani kao EBV tip 1 (Židovec Lepej i sur., 2023). Također, u našem istraživanju (Begić i sur., 2022) molekularne raznolikosti EBV-a u bolesnika s Hodgkinovim limfomom, tipovi EBV-a određeni su na temelju varijabilnosti gena *EBNA-3C* te su svi bili određeni kao tip 1 (Begić i sur., 2022). Određivanje tipova EBV-a u bolesnika s IM kao i ovisnost određenog tipa s varijabilnošću ostalih gena, oskudno je istražena na području Hrvatske. Detekcija EBV tipa 2 u ostalim dijelovima svijeta pridonosi hipotezi da prisutnost EBV tipa 2 na ovom području zasad nije dokazana zbog nedovoljnog broja istraživanja te nedovoljno velikih i raznolikih studija koje će obuhvatiti više različitih bolesti vezanih uz EBV.

2.6.4 Raznolikost gena *BLLF1*

Gen *BLLF1* kodira za protein gp350/220 koji je najbrojniji protein prisutan na vanjskoj ovojnici EBV-a te nužan za primarnu infekciju stanice domaćina (Cai i sur., 2021). Protein gp350/220 nazvan je po prisutnosti dvaju oblika proteina kodirana genom *BLLF1* nastala različitim postranslacijskom obradom mRNA prilikom čega nastaje protein gp350 koji je u svom glikoziliranom stanju mase 350 kDa i protein gp220 koji je u glikoziliranom stanju molekularne mase 220 kDa (Jackman i sur., 1999). N-terminalna regija gp350/220 sadrži domenu slobodnu od glikana raspona 1-470 aa koja se veže na CR2 prisutan na limfocitima B te ovu regiju zadržavaju oba oblika proteina (Luo i sur., 2012). Glikoprotein gp350 dijeli identične gene s glikoproteinom gp220 nastalim iz istog transkripta doradom mRNA što je prvi put dokazano u

istraživanju koje su proveli Beisel i sur., 1985. S druge strane, funkcija glikoproteina gp220 nije u potpunosti istraжена, no predložena je hipoteza da sudjeluje u nasumičnom prijanjanju EBV-a uz vanjsku ovojnica limfocita B nakon prvotnog vezanja gp350 za CR2 (Hutt-Fletcher, 2015). Glikoprotein gp350 najviše je eksprimiran u kasnoj litičkoj fazi prilikom stvaranja viriona te njihova izlaska iz stanice, građen je od 907 aminokiselina te, uz mnoge druge proteine ovojnice, pripada membranskim proteinima tipa I (Hutt-Fletcher, 2015). Osim što sudjeluje u procesu ulaska EBV-a u limfocit B procesom endocitoze, glikoprotein gp350 sudjeluje i u ulasku EBV-a u epitelnu stanicu direktnom fuzijom membrana (Bu i sur., 2022). Virus Rhesus majmuna iz roda *Lymphocryptovirus* rekombiniran s EBV gp350, učinkovito transformira stanice majmuna te uzrokuje akutnu infekciju nakon oralne inokulacije (Herrman i sur., 2016). Stoga su istraživanja s ciljem razvoja cjepiva za EBV usmjerena upravo na glikoprotein gp350. Pročišćen ili rekombinant glikoprotein gp350 pokazao se uspješnim kao cjepivo EBV-pozitivnog limfoma kod pamučnih tamarina (Cui i Snapper, 2021). Također, rekombinant glikoprotein gp350 proizveden u stanicama jajnika kineskog hrčka uzrokovao je porast neutralizirajućih antitijela na EBV kod 70,0% ispitanika te smanjio incidenciju IM (Sokal i sur., 2007).

Istraživanja raznolikosti gena *BLLF1* vrlo su oskudna te usmjerena na samu funkciju proteina gp350 i njegovu moguću ulogu u izradi cjepiva. Varijabilnost gena *BLLF1* dokazana je i u uzorcima nazofaringealnog karcinoma i karcinoma želuca gdje se mogu definirati 2 podtipa, *BLLF1-a* i *BLLF1-b*, s dodatnom podjelom *BLLF1-a* na Q201 i V252 (Luo i sur., 2012). Dokazano je da podjela na *BLLF1-a* i *BLLF1-b* ovisi o tipu EBV-a određenom prema varijabilnosti *EBNA-2* pri čemu su uzorci određeni kao *BLLF1-a* bili EBV tip 1 odnosno uzorci određeni kao *BLLF1-b* bili EBV tipa 2 (Luo i sur., 2012). Također, u istom istraživanju su na svim dobivenim EBV sekvencijama dokazane mutacije C-terminalnog kraja Q642P, N672I i Q754K (Luo i sur., 2012). Povezanost tipova EBV-a s podtipovima *BLLF1* dokazana je i u istraživanju koje su na području Rusije proveli Solomaj i sur. (2022) u zdravih odraslih osoba s EBV infekcijom pri čemu je u 96,7% ispitanika dokazan EBV tip 1 i *BLLF1* podtip *BLLF1-a* dok je kod 3,7% ispitanika dokazan EBV tip 2 sa podtipom *BLLF1-b* (Solomaj i sur., 2022). Varijabilnost gena *BLLF1* nedostatan je istraжена na svjetskoj razini, a postojeći podaci o raznolikosti obuhvaćaju samo maligne bolesti, dok raznolikost *BLLF1* u Hrvatskoj ili bliskom geografskom području nije istraжена.

2.6.5 Promotor Zp

Zp je promotor gena *BZLF1* te je, uz prethodno navedene gene *LMP-1*, *EBNA-1*, *EBNA-2* i *BLLF1*, dio genoma na temelju kojega se EBV može sistematizirati u definirane varijante (Jin i sur., 2010). Gen *BZLF1* kodira istoimeni transkripcijski faktor koji je, zajedno s transkripcijskim faktorom BRLF1, eksprimiran u vrlo ranoj litičkoj fazi (IE geni) čija je funkcija kontrola ekspresije 25 gena EBV-a u ranoj litičkoj fazi (McDonald i sur., 2010). Promotor Zp dugačak je 233 bp i smješten uzvodno od gena *BZLF1*, a njegovi regulatorni elementi pokrivaju veći raspon nukleotida, od mjesta -221 do +40 preklapajući se s genom *BZLF1* (Novalic i Van Rossen, 2016). Građen je od tri skupine elemenata, pozitivni elementi (ZI, ZII i ZIIIA) s dodatnom podjelom na ZIA, ZIB, ZIC i ZID, negativni elementi (H1, ZIIR, ZIV, i ZV) i transaktivacijski elementi (ZIIA i ZIIIB) (Kraus i sur., 2001). Elementi ZI i ZIIIA nužni za ranu indukciju litičke faze potaknute aktivacijom receptora limfocita B, dok element ZIIIB posreduje u autoaktivaciji (Binné i sur., 2002). Za vrijeme latencije, Zp je u visokometilirajućem stanju te njegova aktivacija ovisi o ravnoteži metilirajućih i acetilirajućih enzima domaćina (Novalic i Van Rossen, 2016). Tijekom litičke reaktivacije prelazi iz hipoacetiliranog u hiperacetilirano stanje kao i u stanje niže metiliranosti čime reorganizira kromatin i omogućuje transkripciju (Jenkins i sur., 2000). Aktivnost Zp-a mogu kontrolirati transkripcijski faktori domaćina, primjerice transkripcijski faktor čimbenika pojačivača miocita 2D (MEF2D, od eng. *protein myocyte enhancer factor 2D*) vezanjem na regiju ZI elemenata smanjuje litičku reaktivaciju, dok se deforsforilacijom MEF2D, ekspresija *BZLF1* vraća na prvotnu razinu (McDonald i sur., 2010).

Varijante promotora Zp kod nemalighnih bolesti prvi put su definirali Gutiérrez i sur. (2002.) prilikom čega su definirane varijante Zp-V3 i Zp-V4, dok se promotor Zp prisutan u referentnom soju B95-8 obilježava kao prototip Zp-P (Gutierrez, 2002). Zp-PV varijanta je Zp-a različita od Zp-P po jednom polimorfizmu i prvi put je opisana u bolesnika s infekcijama HIV i EBV (Martini i sur., 2007). Istraživanje koje su proveli Jin i sur. (2010) u skupini djece s EBV infekcijom bez malignih bolesti na području Kine, definiralo je novu varijantu Zp-V1 koja se od prototipa Zp-P razlikuje u jednoj supstituciji nukleotida na mjestu -196 uzvodno od promotora (Jin i sur., 2010). Također, ovo istraživanje pokazalo je najveću zastupljenost prototipa Zp-P u ispitanika s IM kao i u osoba s hemofagocitnom limfohistiocitozom izazvanom EBV-om (Jin i sur., 2010). Unatoč visokoj zastupljenosti Zp-P, u bolesnika s IM pronađene su sve definirane varijante promotora kao i njihove kombinacije (Jin i sur., 2010). Sekvenciranje

Zp-a u bolesnika s IM i s kroničnom aktivnom EBV infekcijom iz Japana pokazalo je prisutnost varijanti Zp-P i Zp-V3 te na dijelu uzoraka određena je varijanta Zp-V1 prisutna u kombinaciji sa Zp-P (Imajoh i sur., 2012). Istraživanje varijanti Zp-a pokazalo je da je varijanta Zp-V3 često prisutna u EBV-pozitivnom Burkittovom limfomu i karcinomu želuca, kao i u bolesnika s NPC-om na području Indonezije čime se smatra varijantom koju povezujemo s malignim oboljenjima EBV-a (Bristol i sur., 2018). Bristol i sur. (2018.) pokazali su da varijanta Zp-V3 sadrži vezno mjesto za stanični transkripcijski faktor NFATc1 čime je njena aktivnost povećana prilikom signaliziranja receptora limfocita B. Također, istraživanje raznolikosti promotora Zp na uzorcima sline zdravih ispitanika različitih geografskih lokacija i etniciteta, pokazala je da su svi uzorci određeni kao EBV tip 2 sadržavali varijantu Zp-V3, kao i 50% uzoraka određenih kao EBV tip 1 (Correia i sur., 2017). Istraživanja raznolikosti promotora Zp u Hrvatskoj ili bliskom geografskom području nisu dostupna.

3. Materijali i metode

3.1 Biološki uzorci

U ovom istraživanju analizirano je 100 uzoraka periferne krvi ispitanika s IM uzrokovanom akutnom infekcijom EBV-om. Uzorci su prikupljeni u Klinici za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu u periodu od siječnja 2021. do prosinca 2023. godine. Medijan dobi ispitanika uključenih u ovo istraživanje iznosio je 14 godina (raspon 1-16 godina). Korišteni uzorci ostatni su dijelovi periferne krvi uzete tijekom dijagnostičke obrade u svrhu kvantifikacije EBV-a metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu (qPCR-a, od eng. *quantitative polymerase chain reaction in real time*). Svi roditelji ili skrbnici pacijenata čiji su uzorci korišteni u ovom istraživanju obaviješteni su putem obavijesti te su potpisali informirani pristanak. Ovo istraživanje u sklopu doktorske disertacije odobrilo je Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu 17. ožujka 2023. godine (broj odobrenja: 01-575-2-2023) te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 25. siječnja 2024. godine (broj odobrenja: 251-59-10106-24-111/10).

3.2 Izolacija DNA i PCR

Za izolaciju DNA iz uzoraka periferne krvi korišten je komplet reagensa QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Njemačka) te je viremija određena pomoću kompleta reagensa LightCycler EBV Quantification Kit (Roche Diagnostics, Švicarska) na instrumentu LightCycler® 2.0 (Roche). Za daljnju analizu izabrani su uzorci čija je izmjerena koncentracija bila >1000 EBV kopija/mL. Geni odnosno specifične regije gena *LMP-1*, *EBNA-1*, *EBNA-2*, *BLLF1* i promotora *Zp* umnožene su dvjema PCR reakcijama pomoću kompleta reagensa FastStart™ High Fidelity PCR System, dNTPack (Roche) na PCR uređaju LightCycler® 2.0 (Roche). Početnice za PCR preuzete su iz prethodnih radova ili su dizajnirane korištenjem javno dostupnog programa Primer-BLAST. Početnice za *LMP-1* preuzete su iz Li i sur. (2009), za *EBNA-2* iz Mendes i sur. (2008) te za *BLLF-1* iz Luo i sur. (2012) (Li i sur., 2009) (Mendes i sur., 2008) (Luo i sur., 2012). Početnice za gene *EBNA-1* i promotor *Zp* dizajnirane su korištenjem programa Primer-BLAST gdje je kao referentni genom za odabrane regije korišten genom soja B95-8 (GenBank pristupni broj: V01555.2). Za gene *LMP-1*, *EBNA-1* i promotor *Zp* korišten je jedan par početnica za prvi PCR te jedan par početnica za ugnježđen PCR, početnice i njihove koordinate odnosno pozicija u genomu soja B95-8 prikazane su u Tablici 1. Za umnažanje središnje regije

gena *EBNA-2* korišten je jedan par početnica za prvi PCR dok su za ugnježđen PCR korištena dva para početnica. Prvi par početnica dizajniran je za umnažanje dijela regije dobivenog PCR produkta karakterističnog za tip I, dok drugi par početnica umnaža dio regije PCR produkta karakterističnog za tip II. Početnice korištene za gen *EBNA-2*, s pripadajućim koordinatama preuzetih iz soja B95-8, prikazane su u Tablici 2. Zbog veličine od 2724 pb, gen *BLLF1* umnožen je pomoću pet pari početnica od kojih svaka umnaža regiju gena *BLLF1* veličine 489-949 pb koje su dizajnirane sukladno početnicama korištenima u Luo i sur. (2012) (Luo i sur., 2012). Početnice korištene za umnažanje gena *BLLF1* prikazane su, s pripadajućim koordinatama iz soja B95-8, u Tablici 3. Uvjeti PCR-a postavljeni za gene *LMP-1*, *EBNA-1*, *EBNA-2*, *BLLF1* i promotor *Zp* prikazani su u Tablici 4. Koncentracija produkata ugnježđenog PCR-a izmjerena je na uređaju QUBIT 3 fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific USA) korištenjem kompleta reagensa za širok spektar detekcije DNA Qubit™ dsDNA Broad Range (BR) Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher scientific). Uzorak je korišten za daljnje sekvenciranje ukoliko mu je vrijednost koncentracije bila veća od 20 ng/μL odnosno ukoliko se smatralo da priložena koncentracija nije rezultat zaostalih početnica već umnažanja gena od interesa. Za uzorke čija je koncentracija bila niža od 20 ng/μL, ponovljen je ugnježđeni PCR te po potrebi i prvi PCR.

Tablica 1. Uzvodne i nizvodne početnice korištene tijekom prvog i ugnježđenog PCR-a za umnažanje gena *LMP-1*, *EBNA-1* i promotora *Zp*. Početnice korištene za ugnježđen PCR korištene su i za Sangerovo sekvenciranje. Prva početnica označava uzvodnu, dok druga označava nizvodnu početnicu te su obje napisane u smjeru 5'-3'. Koordinate početnica preuzete su iz baze GenBank referentnog soja EBV-a B95-8 (GenBank pristupni broj: V01555.2).

Gen/ promotor	Početnice za 1.PCR	Koordinate početnica	Početnice za ugnježđen PCR	Koordinate početnica
LMP-1	5'-gccagtaccctgtggaagtaag-3' 5'-agtgatgaacaccaccacgatg-3'	167,799-167,820 168,726-168,747	5'-aaaagcagcgtaggaagg-3' 5'-tgacggaagagggtgaaaa-3'	168,230-168,247 168,335-168,353
EBNA-1	5'-agaagggtggcccagatggt-3' 5'-ccgtcatctccgtcatcacc-3'	109,206-109,224 109,810-109,830	5'-cgcatgacccaggagaag-3' 5'-gcagcccctccaccatag-3'	109,263-109,282 109,784-109,802
Zp	5'-cccgaggcaagtcactgtt-3' 5'-agtcggagcgggtgaaacat-3'	103,670-103,689 102,943-102,962	5'-gtggacagatggacctgagc-3' 5'-agttagctggccttgtggc-3'	103,558-103,577 102,970-102,988

Tablica 2. Početnice korištene za umnažanje gena *EBNA-2*. Početnice korištene za 1. PCR umnažaju regiju gena *EBNA-2* prisutnu kod oba tipa EBV-a (tip I i tip II), dok početnice korištene za ugnježđen PCR umnažaju regiju prvog PCR produkta karakterističnu za EBV tip I odnosno tip II. Početnice korištene za ugnježđen PCR korištene su i za Sangerovo sekvenciranje. Prva početnica označava uzvodnu, dok druga označava nizvodnu početnicu te su obje napisane u smjeru 5'-3'. Koordinate početnica za prvi PCR te za ugnježđen PCR tipa I preuzete su iz baze GenBank referentnog soja EBV-a B95-8 (GenBank pristupni broj: V01555.2), dok su početnice za ugnježđen PCR EBV-a tipa II preuzete iz soja AG876 (GenBank pristupni broj: DQ279927), referentnog soja za EBV tip II.

	Početnice za gen <i>EBNA-2</i>	Koordinate početnica za gen <i>EBNA-2</i>
prvi PCR	5'-agggatgcctggacacaaga-3' 5'-tggtgctgctgggtg gtggcaat-3'	48,810-48,829 49,385-49,406
ugnježđen PCR za tip I	5'-tcttgataggatccgctaggata-3' 5'-accgtgggttctggactatctggatc-3'	48,839-48,862 49,311-49,335
ugnježđen PCR za tip II	5'-catggtagccttaggacata-3' 5'-agacttagttgatgccctag-3'	36,701-36,720 36,843-36,862

Tablica 3. Početnice korištene za umnažanje gena *BLLF1* tijekom prvog i ugnježđenog PCR-a. Gen *BLLF1* umnožen je s 5 pari početnica od kojih svaka pokriva jednu regiju gena *BLLF1* koje se međusobno preklapaju. Početnice korištene za ugnježđen PCR korištene su i za Sangerovo sekvenciranje. Prva početnica označava uzvodnu, dok druga označava nizvodnu početnicu te su obje napisane u smjeru 5'-3'. Koordinate početnica preuzete su iz baze GenBank referentnog soja EBV-a B95-8 (GenBank pristupni broj: V01555.2).

	Početnice za gen <i>BLLF1</i>	Koordinate početnica za gen <i>BLLF1</i>
<i>BLLF1</i> 1. par (PCR)	5'-ccgcattcaagtatctat-3' 5'-gaaacagttccacatcca-3'	89,263-89,280 89,936-89,953
<i>BLLF1</i> 1. par (ugnježđen PCR)	5'-acgagaatcaaacgacccc-3' 5'-cagttccacatccacaaa-3'	89,326-89,343 89,932-89,949
<i>BLLF1</i> 2. par (PCR)	5'-cggcgctcatcatatgggtg-3' 5'-gccctactgtgggagaaa-3'	89,444-89,461 90,299-90,316
<i>BLLF1</i> 2. par (ugnježđen PCR)	5'-ctgttgaggtgaccgtgg-3' 5'-gccctactgtgggagaaa-3'	89,828-89,845 90,299-90,316
<i>BLLF1</i> 3. par (PCR)	5'-catggaagaggttgaactt-3' 5'-gagcaatcggacatttga-3'	90,159-90,177 90,985-91,002
<i>BLLF1</i> 3. par (ugnježđen PCR)	5'-tggaagaggttgaacttg-3' 5'-ttatcacacgaacggcta-3'	90,161-90,178 90,943-90,926
<i>BLLF1</i> 4. par (PCR)	5'-gttggtaggcacgtgagt-3' 5'-gccatacataaagtgggata-3'	90,783-90,800 91,683-91,664
<i>BLLF1</i> 4. par (ugnježđen PCR)	5'-ggtaggcacgtgagtaga-3' 5'-gctcggtaatgagataga-3'	90,786-90,803 91,548-91,531
<i>BLLF1</i> 5. par (PCR)	5'-atctccccgctgcctt-3' 5'-aacaccgcaccccccttg-3'	91,266-91,283 92,214-92,197
<i>BLLF1</i> 5. par (ugnježđen PCR)	5'-ggaacatggctctcgatccac-3' 5'-aacaccgcaccccccttg-3'	91,435-91,456 92,214-92,197

Tablica 4. Uvjeti PCR-a za umnažanje gena *LMP-1*, *EBNA-1*, *EBNA-2*, *BLLF1* i promotora Zp. Prikazani uvjeti korišteni su i za prvi i za ugnježđen PCR.

Gen/promotor	Preddenaturacija	Denaturacija	Vezanje početnica	Elongancija	Završna elongacija	Broj ciklusa
<i>LMP-1, EBNA-1</i> i promotor Zp	95°C 2 min	95°C 30 s	60°C 30 s	72°C 1 min	72°C 7 min	45
<i>EBNA-2</i>	95°C 5 min	95°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 5 min	40
<i>BLLF1</i>	94°C 5 min	94°C 30 s	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 10 min	35

3.3 Elektroforeza

Prije Sangerovog sekvenciranja, za gen *EBNA-2* provedena je gel elektroforeza. Produkti ugnježđenog PCR-a gena *EBNA-2* umnoženi slijedom početnica specifičnim za tip I odnosno za tip II (Tablica 2.) prikazani su na gelu uz prisutstvo standarda veličine 1000 pb kako bi se odredila veličina produkta koja determinira tip EBV-a (Slika 5.). Za pripremu gela korištena je agarozna i sterilan TE pufer. Prilikom nanošenja uzoraka korišteno je 4 µL markera GeneRuler 100 bp DNA (Thermoscientific) i 4 µL ugnježđenog PCR produkta gena *EBNA-2* za oba tipa sa 2 µL boje za nanošenje. Elektroforeza je provedena na 80 V u trajanju od 25 minuta. Uzorci koji su na gelu dali vidljiv fragment korišteni su za daljnje sekvenciranje.



Slika 6. Primjer razlike u veličini fragmenta između EBV tipa 1 i tipa 2. Jažica 1 – uzorak EBVCROLMP-1_77 umnožen s početnicama za EBV tip 1, jažica 2 – uzorak EBVCROLMP-1_77 umnožen s početnicama za EBV tip 2, jažica 3 – uzorak EBVCROLMP-1_86 umnožen s početnicama za EBV tip 1, jažica 4 – uzorak EBVCROLMP-1_86 umnožen s početnicama za EBV tip 2, jažica 4 – uzorak EBVCROLMP-1_63 umnožen s početnicama za EBV tip 2, jažica 5 – uzorak EBVCROLMP-1_63 umnožen s primerima za EBV tip 1, jažica 5 – uzorak EBVCROLMP-1_3 umnožen s početnicama za EBV tip 2, jažica 5 – uzorak EBVCROLMP-1_3 umnožen s primerima za EBV tip 1. Na prva 2 uzorka vidljiv je fragment veličine približno 500 pb što odgovara tipu 2, dok na istim uzorcima geni nisu uspješno umnoženi s početnicama za tip 2. Na zadnja 2 uzorka vidljiv je fragment približno 150 pb što odgovara specifičnom fragmentu gena *EBNA-2* karakterističnom za EBV tip 2, dok na istim uzorcima nisu uspješno umnoženi s početnicama za tip 1.

3.4 Sangerovo sekvenciranje

Produkti ugnježđenog PCR-a razrijeđeni su do koncentracije raspona 5-20 ng/μL prema uputama za razrjeđivanje umnoženih fragmenata veličine do 500 pb (Thermo Fischer Scientific). Reakcija sekvenciranja provedena je korištenjem kompleta reagensa BigDye™

Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, SAD) u uređaju ProFlex PCR System (Applied Biosystems). Za svaki gen ili promotor napravljene su dvije reakcije sekvenciranja, jedna sa uzvodnom i jedna sa nizvodnom početnicom. Reakcija sekvenciranja provedena je s početnom denaturacijom na 96°C u trajanju od 10 sekundi i sa 25 ciklusa umnažanja postavljena na sljedeći način: denaturacija na 95°C u trajanju od 10 sekundi, vezanje početnica na 50°C u trajanju od 5 sekundi i elongacija na 60°C u trajanju od 55 sekundi. Pročišćavanje produkata sekvenciranja provedeno je korištenjem natrijeva acetata, 96%-tnog i 70%-tnog etanola. U svaki produkt sekvenciranja dodano je 2 µL natrijeva acetata (NaAc) i 50 µL 96%-tnog etanola te su uzorci centrifugirani 20 min na 2000 rpm. Centrifugiranjem invertiranih epruveta jednu minutu na 150 rpm uklonjena je smjesa 96%-tnog etanola i NaAc, a DNA zadržana u talogu. Druga serija centrifugiranja provedena je sa 150 µL 70%-tnog etanola 5 min na 2000 rpm nakon čega je ponovno centrifugiranjem uklonjen etanol. Pročišćeni uzorci ostavljeni su nekoliko minuta u mraku kako bi ispario ostatak etanola bez gubitka fluorescencije. Uzorci su otopljeni u 10 µL HiDi formamida te su njihove sekvencije očitane na uređaju Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Dobiveni elektroferogrami za obje sekvencije, jednu dobivenu uzvodnom, a drugu nizvodnom početnicom, analizirani su u programu SnapGene 6.2.1. prilikom čega su odrezani nečitljivi odnosno preklapajući dijelovi elektroferograma. Korištenjem funkcije *assemble* programa SnapGene 6.2.1., preklopljene su sekvencije dobivene uzvodnom i nizvodnom početnicom te je dobivena konsenzus sekvencija korištena kao konačna. Konsenzus sekvencija gena *BLLF1* sekvenciranog s pet pari početnica, dobivena je preklapanjem svih pet sekvencija dobivenih funkcijom *assemble* u SnapGene 6.2.1. Sekvencija gena *BLLF1* preklopljene su korištenjem javno dostupnog bioinformatičkog alata EMBOSS merger na način da je sekvencija umnožena prvim parom početnica preklopljena sekvencijom umnoženom drugim parom početnica te dobivena sekvencija preklopljena s produktom trećeg para početnica. Ovim načinom preklopljeno je svih pet sekvencija gena *BLLF1* te je konsenzus sekvencije veličine približno 3000 pb korištena kao konačna. Dobivene konačne sekvencije gena *LMP-1*, *EBNA-1*, *EBNA-2*, *BLLF1* i promotora Zp preklopljene su s referentnom sekvencijom odnosno s odgovarajućom regijom gena i promotora preuzete iz soja B95-8. Za preklapanje dobivenih sekvencija s referentnom, korišten je program Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) i funkcija *Maximum likelihood*.

3.5 Određivanje virusnih varijanti

EBV tip I odnosno tip II na osnovi raznolikosti gena *EBNA-2* određen je prilikom gel elektroforeze na temelju dobivenog fragmenta na gelu. Naime, kako bismo potvrdili specifičnost dobivene sekvence odnosno uvid u gensku varijabilnost, sekvence *EBNA-2* preklapljene su s genom *EBNA-2* iz referentne sekvencije soja B95-8 za tip I te soja AG876 (GenBank pristupni broj: DQ279927) za tip II. Ukoliko se analizom u programu MEGA dobivena sekvencija poravnala s korištenom referentnom sekvencijom, uzorak je određen kao EBV tip I odnosno tip II. U odsustvu preklapanja, ponovljen je ugnježđen PCR. Determinacija varijanti gena *LMP-1*, *BLLF-1*, promotora Zp te varijanti i podvarijanti gena *EBNA-1* određena je preklapanjem dobivenih konsenzus sekvencija s pripadajućim genom soja B95-8 te analizom mjesta mutacija definiranih u radovima koje određuju varijante. Varijante gena *LMP-1* određene su prema definiranim mjestima mutacija opisanima u radu Edwards i sur. (1999). Pozicije aminokiselina od interesa na dobivenim *LMP-1* sekvencijama uspoređene su sa referentnom sekvencijom odnosno genom *LMP-1* preuzetim iz referentnog soja B95-8. Zabilježene su promjene aminokiselina kao i tihe mutacije te je varijanta određena usporedbom dobivenog uzorka mutacija i uzorka mutacija koji je u radu definiran za svaku pojedinu varijantu (Tablica 5.) (Edwards i sur., 1999). Ovaj princip određivanja varijanti primijenjen je i za gene *BLLF-1*, *EBNA-1* te promotor Zp. Varijante gena *BLLF-1* definirane su prema dvjema glavnim skupinama odvojenima prema mutaciji na aminokiselini 201 i 252 (Luo i sur., 2012). Varijante i podvarijante gena *EBNA-1* određene su prema mjestima mutacija opisanima u radovima Lorenzetti i sur., (2010), Thuan i sur., 2019 i Fassone i sur., (2000) (Tablica 6.). Varijante promotora Zp određene su prema točkastim mutacijama na uzvodnim mjestima promotora: -196, -141, -106 i -100 čime promotor Zp osim prototipa Zp-P prisutnog u soju B95-8 može biti svrstan i u varijante Zp-V3 i Zp-V4 definirane u radu Jin i sur., (2010). Sekvencije s određenim varijantama učitane su u bazu GenBank gdje im je dodijeljen odgovarajući pristupni broj.

Tablica 5. Prikaz promjene aminokiselina u usporedbi s divljim sojem B95-8 za svaku *LMP-1* varijantu: China1, China2, North Carolina, Alaskan te Mediterranean sa i bez delecije.

		Pogrešne (<i>missense</i>) mutacije koje definiraju varijante				
Aminokiselina	divlji tip (B95-8)	China1	China2	North Carolina	Alaskan	Mediterranean (sa i bez delecije)
212	Gly	Ser	Ser		Ser	
229	Ser					Thr
232	Gly				Ala	
245	Pro		His			
252	Gly		Asp			
306	Leu			Gln		
309	Ser	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn
312	Asp				Asn	
313	Ser			Pro	Ala	
322	Gln	Asn		Thr	Lys	Glu
331	Gly		Gln	Gln	Ala	
334	Gln	Arg				Arg
338	Leu	Ser	Pro	Pro	Pro	Ser
344	Gly		Asp			
345	Gly				Ser	
352	His			Asn		Arg/delecija
354	Gly				Asp	
355	Gly		Ala/Thr		Val	
358	His				Pro	
366	Ser	Thr	Thr			Asn/Thr/Ala

Tablica 6. Prikaz promjene aminokiselina u usporedbi s divljim sojem B95-8 (prototip P-ala) za prototipove, varijante i podvarijante gena *EBNA-1* opisane prema Lorenzetti i sur (2011), Thuan i sur. (2019) te Fassone i sur. (2000).

		Pogrešne (<i>missense</i>) i tihe (<i>silent</i>) mutacije u varijantama/podvarijantama gena <i>EBNA-1</i>							
Aminokiselina	B95-8	P-thr	P-thr'	P-thr''	V-ala-i	V-leu	V-leu Ag	V-val	V-pro
468	His					Arg			
471	Gln			His	Glu	Glu	Glu		
475	Thr						Ser		
476	Pro		Gln	Gln	Thr	Gln	Gln		
483	Glu								
484	Gly								
486	Arg				Lys				
487	Ala	Thr	Thr	Thr		Leu	Leu	Val	Pro
492	Ser		Cys	Cys		Cys	Cys		
499	Asp		Asp	Asp	Glu	Glu	Glu		
500	Glu					Asp	Asp		
502	Thr				Asp	Asn	Asn		
508	Phe								
511	Gly				Gly				
514	Lys								
517	Leu								
520	Leu		Leu	Leu	Leu	Leu	Leu		
524	Thr		Ile	Ile	Ile	Ile	Ile		
525	Ala					Gly	Gly		
528	Ile				Val				
529	Pro								
532	Arg								
533	Leu				Ile				

3.6 Sekvenciranje nove generacije

Produkti ugnjeđenog PCR-a analizirani su u odabranim uzorcima u kojima se analizom sekvenci Sangerova sekvenciranja pokazalo da gen *LMP-1* sadrži mutacije koje odgovaraju dvjema varijantama ili većem broju varijanti opisanima u Edwards i sur. (1999.). Za pripremu knjižnice i reakciju sekvenciranja korišten je kit TrueSeq Nano DNA Library Prep Kit (Illumina, CA, SAD) te je sekvenciranje provedeno na uređaju Illumina MiniSeq (tvrtka

Macrogen, Koreja). Za sekvenciranje je korišten program MiSeq te je broj očitavanja postavljen na 50 000 po uzorku. Kvaliteta očitavanja izražena je pomoću Phred kvalitete bodovanja.

3.7 Filogenetska analiza

Ukupno 100 sekvencija poravnato je s pripadajućom referentnom sekvencijom (B95-8) za svaki pojedini gen. Za gen *LMP-1* su, osim divljeg tipa B95-8, korištene i referentne sekvencije za svaku pojedinu varijantu: China1 (AY337723.1), China2 (AY337724.1), Mediterranean sa delecijom (AY337722.2), Mediterranean bez delecije (AY337721.2), Alaskan (AY337725.1) i North Carolina (AY337726.2). Također, za filogenetsku analizu gena *EBNA-2* je, uz referentnu sekvenciju preuzetu iz soja B95-8 za tip I, korištena sekvencija soja AG876 (GenBank pristupni broj: DQ279927) referentna za tip II. Poravnate sekvencije analizirane su u programu MEGA-X korištenjem testa *Maximum likelihood* s modelom *General Time Reversible Mode* te su bootstrap vrijednosti postavljene na vrijednost od 1000. Dobiveni rezultati ukorjenjeni su pomoću referentnog gena odnosno promotora soja B95-8 i izračunata korištenjem granične vrijednosti od 50%. Rezultati su dodatno obrađeni pomoću programa Interactive Tree of Life (IToL) gdje su prikazani u obliku kružnih filogenetskih stabala na kojima su istaknuti uzorci koji se skupa grupiraju u određene varijante.

3.8 Statistička analiza

Statistička analiza dobivenih varijanti je, ovisno o dobivenim rezultatima, provedena Fisherovim testom ili Mann-Whitney testom s postavljenom p vrijednošću $p < 0,05$ (R 4.1.0). Za svaki gen analizirana je međusobna ovisnost pojavljivanja varijanti s varijantama drugih gena i promotora Zp. Učestalost pojavljivanja varijanti gena *LMP-1* analizirana je s učestalošću pojavljivanja varijanti gena *BLLF-1* i *EBNA-1*, tipova *EBNA-2* te varijanti promotora Zp. Ovaj postupak primijenjen je i za ostatak analiziranih gena kao i za promotor Zp te su zabilježene one kombinacije varijanti koje su provedenim testovima dale značajnu vrijednost rezultata ($p < 0,05$).

4. Rezultati

4.1. Određivanje varijanti

4.1.1 Gen *LMP-1*

Sekvencije gena *LMP-1* uspješno su umnožene Sangerovim sekvenciranjem. Preklapanjem sekvencija dobivenih uzvodnom i nizvodnom početnicom u programu SnapGene 6.2.1. dobivena je sekvencija u konačnom obliku. Konačan oblik sekvencije preklapljen je s referentnom sekvencijom (B95-8) s ciljem analize mjesta aminokiselina na čijim je položajima definiran polimorfizam za svaku pojedinu *LMP-1* varijantu. Zbog prisutnosti ponavljajućih slijedova i delecija koje se nalaze unutar gena, dobivene sekvencije gena *LMP-1* razlikuju se po veličini te obuhvaćaju raspon 350-450 pb. Svih 100 sekvencija gena *LMP-1* unesene su u bazu podataka GenBank gdje su prihvaćene kao dio genoma EBV-a te je njihova autentičnost za gen *LMP-1* provjerena s referentnom sekvencijom. Varijante *LMP-1* određene su prema algoritmu opisanom u Tablici 5.

Rezultati sekvenciranja gena *LMP-1* pokazali su veliku raznolikost u distribuciji varijanti obuhvaćajući sve prisutne varijante opisane u Edwards i sur. (1999.) osim Mediterranean s delecijom. Najveći broj uzoraka (31,0%) određen je kao divlji tip te ove sekvencije nisu pokazivale aminokiselinske promjene na 20 analiziranih aminokiselinskih mjesta. Nadalje, 17% uzoraka odgovaralo je varijanti China1, 15,0% uzoraka odgovaralo je varijanti North Carolina, 9% uzoraka varijanti Med-, dok je 28,0% uzoraka određeno kao rekombinante. Prilikom identifikacije rekombinanta, varijanta kojoj pripada većina definiranih mutacija napisana je kao prva. Također, kod imenovanja sekvencija koje su od određene varijante odstupale prema samo jednoj aminokiselinskoj promjeni upotrebljen je naziv definirane varijante uz naznaku aminokiselinskog mjesta gdje se varijanta ne poklapa. Primjerice, Med-sa 212, rekombinant dokazan u 5,0% uzoraka, prema polimorfizmima odgovara varijanti Med-, ali ujedno posjeduje i mutaciju na aminokiselini 212 koja nije dio identifikacije varijante Med- već odgovara tri različite varijante, China1, China2 i Alaskan. Najčešći rekombinanti bili su rekombinanti China1/B95-8 (21,7%) i Med- sa 212 (21,7%) odnosno sekvencija koja aminokiselinskim promjenama odgovara Med-, s dodatnom promjenom na aminokiselini 212 (Glu->Ser). Analizom sekvencija pronađeno je još 6 vrsti rekombinanata, B95-8/China1 (17,4%), B95-8/North Carolina (8,7%), Med-/B95-8 (8,7%), North Carolina sa 212 (8,7%), China1/Alaskan (8,7%) i China1/Med- (4,4%). Rezultati analize varijanti za 100 sekvencija

prikazani su u 3 dijela zbog velike količine uzoraka, aminokiselina od interesa te s ciljem bolje preglednosti. Rezultati određivanja varijanti *LMP-I* za prvih 25 uzoraka Tablici 7. i Tablici 7.- nastavak. Tablica 8. i Tablica 8.- nastavak obuhvaćaju idućih 25 uzoraka, Tablica 9. i Tablica 9.- nastavak predzadnjih 25 uzoraka te Tablica 10. i Tablica 10.- nastavak zadnjih 25 uzoraka. Također, šifra uzorka sukladna je nazivu uzorka pod kojim su sekvencije unesene u bazu GenBank te su brojevi dodijeljeni prilikom unošenja u bazu nasumični.

Tablica 7. Polimorfizmi dokazani u prvih 25 sekvencija unutar 20 aminokiselinskih mjesta koja su dio klasifikacije varijanti *LMP-1*. Za svaku sekvenciju prikazane su aminokiseline koje se razlikuju od divljeg tipa B95-8, varijanta gena *LMP-1* te pristupni broj.

	Pozicije aminokiselina na kojima je dokazana promjena aminokiseline u odnosu na divlji tip (B95-8)										
B95-8	Gly/212	Ser/229	Gly/232	Pro/245	Gly/252	Leu/306	Ser/309	Asp/312	Ser/312	Gln/322	Gly/331
EBVCROLMP-1_15											
EBVCROLMP-1_16											
EBVCROLMP-1_14											
EBVCROLMP-1_17		Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_18						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_19						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_20											
EBVCROLMP-1_21						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_22											
EBVCROLMP-1_23											
EBVCROLMP-1_34		Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_73	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_24											
EBVCROLMP-1_42											
EBVCROLMP-1_25							Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_26											
EBVCROLMP-1_35											
EBVCROLMP-1_27		Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_28											
EBVCROLMP-1_29											
EBVCROLMP-1_30						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_31		Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_32											
EBVCROLMP-1_33	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_1	Ser						Asn			Asn	

Tablica 7. – nastavak.

	Pozicije aminokiselina na kojima je dokazana promjena aminokiseline u odnosu na divlji tip (B95-8)										
B95-8	Gln/33 4	Leu/33 8	Gly/34 4	Gly/34 5	His/352	Gly/35 4	Gly/35 5	His/358	Ser/366	Varijanta	Pristupni broj
EBVCROLMP-1_15					Asn					B95-8/NC	OR115532
EBVCROLMP-1_16										B95-8	OR115533
EBVCROLMP-1_14										B95-8	OR115531
EBVCROLMP-1_17	Arg	Ser			Arg					Med-	OR397277
EBVCROLMP-1_18		Pro			Asn			Pro		NC	OR397278
EBVCROLMP-1_19		Pro			Asn			Pro		NC	OR397279
EBVCROLMP-1_20										B95-8	OR397280
EBVCROLMP-1_21		Pro			Asn			Pro		NC	OR397281
EBVCROLMP-1_22										B95-8	OR397282
EBVCROLMP-1_23										B95-8	OR397294
EBVCROLMP-1_34	Arg	Ser			Arg					Med-	OR393111
EBVCROLMP-1_73	Arg	Ser							Thr	China1	OR397306
EBVCROLMP-1_24										B95-8	OR397295
EBVCROLMP-1_42										B95-8	OR393108
EBVCROLMP-1_25	Arg									B95-8/Ch1	OR397287
EBVCROLMP-1_26					Asn					B95-8/NC	OR115543
EBVCROLMP-1_35										B95-8	OR393106
EBVCROLMP-1_27	Arg	Ser			Arg					Med-	OR397289
EBVCROLMP-1_28										B95-8	OR397292
EBVCROLMP-1_29										B95-8	OR397293
EBVCROLMP-1_30		Pro			Asn			Pro		NC	OR115547
EBVCROLMP-1_31	Arg	Ser			Arg					Med-	OR397296
EBVCROLMP-1_32										B95-8	OR397291
EBVCROLMP-1_33	Arg	Ser							Thr	China1	OR397283
EBVCROLMP-1_1	Arg	Ser								B95-8/Ch1	OR397322

Tablica 8. Polimorfizmi dokazani u idućih 25 sekvencija unutar početnih 20 aminokiselinskih mjesta koja su dio klasifikacije varijanti *LMP-1*, za svaku sekvenciju prikazane su aminokiseline koje se razlikuju od divljeg tipa B95-8.

	Pozicije aminokiselina na kojima je dokazana promjena aminokiseline u odnosu na divlji tip (B95-8)										
B95-8	Gly/212	Ser/229	Gly/232	Pro/245	Gly/252	Leu/306	Ser/309	Asp/312	Ser/312	Gln/322	Gly/331
EBVCROLMP-1_2						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_56	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_36							Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_4	Ser					Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_5											
EBVCROLMP-1_58	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_39											
EBVCROLMP-1_38											
EBVCROLMP-1_41											
EBVCROLMP-1_81	Ser		Ala				Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_80	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_83						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_6											
EBVCROLMP-1_7	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_8											
EBVCROLMP-1_44											
EBVCROLMP-1_47	Ser						Asn	Asn		Asn	
EBVCROLMP-1_9						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_10	Ser					Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_50	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_11	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_12											
EBVCROLMP-1_48											
EBVCROLMP-1_52											
EBVCROLMP-1_64											

Tablica 8. – nastavak

	Pozicije aminokiselina na kojima je dokazana promjena aminokiseline u odnosu na divlji tip (B95-8)										
B95-8	Gln/334	Leu/338	Gly/344	Gly/345	His/352	Gly/354	Gly/355	His/358	Ser/366	varijanta LMP-1	Pristupni broj
EBVCROLMP-1_2		Pro			Asn			Pro		NC	OR397288
EBVCROLMP-1_56	Arg	Ser							Thr	China1	OR397312
EBVCROLMP-1_36	Arg	Ser								B95-8/Ch1	OR397299
EBVCROLMP-1_4		Pro			Asn			Pro		NC sa 212	OR397343
EBVCROLMP-1_5										B95-8	OR397298
EBVCROLMP-1_58	Arg	Ser							Thr	China1	OR397303
EBVCROLMP-1_39										B95-8	OR397297
EBVCROLMP-1_38										B95-8	OR397327
EBVCROLMP-1_41										B95-8	OR393162
EBVCROLMP-1_81	Arg	Ser								China1/Alaskan	OR397352
EBVCROLMP-1_80	Arg	Ser							Thr	China1	OR397300
EBVCROLMP-1_83		Pro			Asn			Pro		NC	OR393159
EBVCROLMP-1_6										B95-8	OR397302
EBVCROLMP-1_7	Arg	Ser								China1/B95-8	OR115526
EBVCROLMP-1_8										B95-8	OR397271
EBVCROLMP-1_44										B95-8	OR393146
EBVCROLMP-1_47	Arg	Ser							Thr	China1/Alaskan	OR393107
EBVCROLMP-1_9		Pro			Asn			Pro		NC	OR124062
EBVCROLMP-1_10		Pro			Asn			Pro		NC sa 212	OR115528
EBVCROLMP-1_50	Arg	Ser							Thr	China1	OR393166
EBVCROLMP-1_11		Ser							Thr	B95-8/ch1	OR115529
EBVCROLMP-1_12										B95-8	OR124063
EBVCROLMP-1_48										B95-8 sa 212	OR397314
EBVCROLMP-1_52										B95-8	OR397321
EBVCROLMP-1_64								Pro		B95-8 sa 212	OR397319

Tablica 9. Polimorfizmi dokazani u predzadnjih 25 sekvencija unutar početnih 20 aminokiselinskih mjesta koja su dio klasifikacije varijanti *LMP-1*, za svaku sekvenciju prikazane aminokiseline koje se razlikuju od divljeg tipa B95-8.

	Pozicije aminokiselina na kojima je dokazana promjena aminokiseline u odnosu na divlji tip (B95-8)										
B95-8	Gly/212	Ser/229	Gly/232	Pro/245	Gly/252	Leu/306	Ser/309	Asp/312	Ser/312	Gln/322	Gly/331
EBVCROLMP-1_46						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_61	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_13											
EBVCROLMP-1_88											
EBVCROLMP-1_51											
EBVCROLMP-1_40	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_110	Ser	Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_43	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_45		Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_94						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_49	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_85							Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_37	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_75	Ser	Thr					Asn				
EBVCROLMP-1_99							Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_63	Ser										
EBVCROLMP-1_86		Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_3	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_111											
EBVCROLMP-1_106							Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_90	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_66		Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_62							Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_95											
EBVCROLMP-1_68						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln

Tablica 9. – nastavak

	Pozicije aminokiselina na kojima je dokazan promjena aminokiseline u odnosu na divlji tip (B95-8)										
B95-8	Gln/334	Leu/338	Gly/344	Gly/345	His/352	Gly/354	Gly/355	His/358	Ser/366	varijanta LMP-1	Pristupni broj
EBVCROLMP-1_46		Pro			Asn			Pro		NC	OR393114
EBVCROLMP-1_61	Arg	Ser							Thr	China1	OR393142
EBVCROLMP-1_13										B95-8	OR115530
EBVCROLMP-1_88										B95-8	OR393147
EBVCROLMP-1_51										B95-8	OR393155
EBVCROLMP-1_40	Arg	Ser							Thr	China1	OR393112
EBVCROLMP-1_110	Arg	Ser			Arg					Med- sa 212	PP854396
EBVCROLMP-1_43	Arg	Ser							Thr	China1	OR393134
EBVCROLMP-1_45	Arg	Ser			Arg					Med-	OR900959
EBVCROLMP-1_94		Pro			Asn			Pro		NC	PP215917
EBVCROLMP-1_49	Arg	Ser							Thr	China1	OR393154
EBVCROLMP-1_85	Arg	Ser							Thr	China1/B95-8	OR393127
EBVCROLMP-1_37	Arg	Ser							Thr	China1	OR393165
EBVCROLMP-1_75	Arg	Ser								China1/B95-8	OR393121
EBVCROLMP-1_99	Arg	Ser			Leu					China1/B95-8	PP854395
EBVCROLMP-1_63										B95-8	OR393132
EBVCROLMP-1_86	Arg				Arg					Med-/B95-8	OR393143
EBVCROLMP-1_3	Arg									China1	OR115522
EBVCROLMP-1_111	Arg	Ser							Thr	B95-8	PP798369
EBVCROLMP-1_106	Arg	Ser								China1/B95-8	OR393125
EBVCROLMP-1_90	Arg	Ser							Thr	China1	OR900960
EBVCROLMP-1_66	Arg	Ser			Arg					Med-	OR393141
EBVCROLMP-1_62	Arg	Ser			Arg					Med-/B95-8	OR393137
EBVCROLMP-1_95										B95-8	OR393153
EBVCROLMP-1_68		Pro			Asn			Pro		NC	OR393135

Tablica 10. Polimorfizmi dokazani u zadnjih 25 sekvencija unutar početnih 20 aminokiselinskih mjesta koja su dio klasifikacije varijanti *LMP-1*, za svaku sekvenciju prikazane su aminokiseline koje se razlikuju od divljeg tipa B95-8.

	Pozicije aminokiselina na kojima je dokazan promjena aminokiseline u odnosu na divlji tip (B95-8)										
B95-8	Gly/212	Ser/229	Gly/232	Pro/245	Gly/252	Leu/306	Ser/309	Asp/312	Ser/312	Gln/322	Gly/331
EBVCROLMP-1_102	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_100											
EBVCROLMP-1_57	Ser	Thr					Asn				
EBVCROLMP-1_65	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_101		Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_71						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_105	Ser										
EBVCROLMP-1_53											
EBVCROLMP-1_87						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_77											
EBVCROLMP-1_89	Ser										
EBVCROLMP-1_67	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_107		Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_103		Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_74	Ser	Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_70							Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_98	Ser					Gln	Asn		Pro		Gln
EBVCROLMP-1_84											
EBVCROLMP-1_91	Ser										
EBVCROLMP-1_112											
EBVCROLMP-1_69	Ser	Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_79	Ser	Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_76						Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_59	Ser	Thr					Asn			Glu	
EBVCROLMP-1_78						Gln	Asn		Pro		Gln

Tablica 10. – nastavak

	Pozicije aminokiselina na kojima je dokazana promjena aminokiseline u odnosu na divlji tip (B95-8)										
B95-8	Gln/334	Leu/338	Gly/344	Gly/345	His/352	Gly/354	Gly/355	His/358	Ser/366	<i>varijanta LMP-1</i>	Pristupni broj
EBVCROLMP-1_102	Arg	Ser							Thr	China1	OR393138
EBVCROLMP-1_100										B95-8	OR393158
EBVCROLMP-1_57	Arg	Ser							Thr	China1/Med-	OR393115
EBVCROLMP-1_65	Arg	Ser							Thr	China1	OR900961
EBVCROLMP-1_101	Arg	Ser			Arg					Med-	OR393124
EBVCROLMP-1_71		Pro			Asn			Pro		NC	OR393116
EBVCROLMP-1_105										B95-8 sa 212	OR393157
EBVCROLMP-1_53										B95-8	OR393126
EBVCROLMP-1_87		Pro			Asn			Pro		NC	OR393151
EBVCROLMP-1_77										B95-8	OR393149
EBVCROLMP-1_89										B95-8 sa 212	OR393148
EBVCROLMP-1_67	Arg	Ser							Thr	China1	OR393139
EBVCROLMP-1_107	Arg	Ser			Arg					Med-	OR393129
EBVCROLMP-1_103	Arg	Ser								Med-	OR393117
EBVCROLMP-1_74	Arg	Ser								Med-sa 212	OR393120
EBVCROLMP-1_70	Arg	Ser			Leu					China1	OR900963
EBVCROLMP-1_98		Pro								NC	OR393113
EBVCROLMP-1_84										B95-8	OR393150
EBVCROLMP-1_91										B95-8 sa 212	OR393130
EBVCROLMP-1_112										B95-8	OR900964
EBVCROLMP-1_69	Arg	Ser								Med- sa 212	OR393136
EBVCROLMP-1_79	Arg	Ser								Med- sa 212	OR393144
EBVCROLMP-1_76		Pro			Asn			Pro		NC	OR393122
EBVCROLMP-1_59										Med- sa 212	OR393119
EBVCROLMP-1_78		Pro			Asn					NC	PP835465

4.1.2 Gen *EBNA-1*

Sekvencije gena *EBNA-1* uspješno su određene Sangerovim sekvenciranjem u svih 100 uzoraka te je njihova duljina 411 pb. Raznolikost *EBNA-1* sekvencija određena je analizom prototipova i varijanti odnosno varijanti prototipa i podvarijanti prema algoritmu opisanom u Tablici 6. (Materijali i metode). Prototip odnosno varijanta gena *EBNA-1* određena je prema aminokiselini na poziciji 487. U analiziranim sekvencijama nisu otkrivene definirane varijante ovog gena (V-leu, V-val, V-pro), a sve sekvencije pripadale su jednom od 2 definirana prototipa (P-ala i P-thr). Prototip P-thr dokazan je u 70,0% sekvencija, dok je 30,0% sekvencija odgovaralo divljem tipu odnosno prototipu P-ala. Nadalje, sekvencije su svrstane u definirane podvarijante odnosno u varijante prototipa dodatnom analizom 22 aminokiselinska mjesta. Sukladno rezultatima prototipa, 30,0% sekvencija koje su određene kao prototip P-ala pripale su njegovoj varijanti P-ala' s obzirom na prisutnost glutamina na poziciji aminokiseline 499 u usporedbi s B95-8 gdje se na ovom mjestu nalazi asparagin. U 70,0% sekvencija određenih kao prototip P-thr, 97,2% sekvencija svrstano je u varijantu prototipa P-thr' zbog promjene aminokiseline 476 iz prolina u glutamin, 492 iz serina u cistein te zbog prisustva tihe mutacije odnosno promjene GAT u GAC što daje asparagin. S druge strane, 2,8% sekvencija pripalo je varijanti prototipa P-thr" jer, uz polimorfizme prisutne kod P-thr', ove sekvencije posjeduju još i promjenu aminokiseline 471 iz Glu u histidin (His). Rezultati za prvih 25 sekvencija prikazani su Tablici 10. odnosno u Tablici 10.- nastavak koja obuhvaća drugi dio aminokiselinskih promjena, određen prototip i njegovu varijantu, kao i pristupni broj dodijeljen u bazi GenBank. Tablica 11. i Tablica 11.- nastavak obuhvaćaju idućih 25 sekvencija, odnosno Tablica 12. i Tablica 12.- nastavak predzadnjih 25 sekvencija dok Tablice 12. i Tablica 12.-nastavak prikazuju rezultate za posljednjih 25 sekvencija. Također, šifra uzorka sukladna je nazivu uzorka pod kojim su sekvencije unesene u bazu GenBank. Brojevi dodijeljeni prilikom unošenja u bazu su nasumični te ne obuhvaćaju sve brojeve 1-100.

Tablica 11. Polimorfizmi dokazani u prvih 25 sekvencija unutar 22 aminokiselinska mjesta koja su dio klasifikacije prototipa odnosno varijanti *EBNA-1* (aminokiselina 487*) te varijanti prototipa, prikazane su aminokiseline koje se razlikuju od divljeg tipa B95-8.

	Aminokiseline na kojima je dokazane promjena u odnosu na divlji tip (B95-8)												
B95-8	His/468	Gln/471	Thr/475	Pro/476	Glu/483	Gly/484	Arg/486	Ala/487*	Ser/492	Asp/499	Glu/500	Thr/502	Phe/508
EBVCROEBNA-1_15				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_16				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_14				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_17				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_18										Glu			
EBVCROEBNA-1_19		His		Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_20				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_21										Glu			
EBVCROEBNA-1_22				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_23				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_34										Glu			
EBVCROEBNA-1_73				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_24				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_42				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_25				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_26				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_35				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_27				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_28				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_29				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_30				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_31		His		Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_32				Gln	Asp			Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_33				Gln				Thr	Cys	Asp (t)		Ala	
EBVCROEBNA-1_1				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			

Tablica 11. – nastavak.

	Aminokiseline na kojima je dokazana promjena u odnosu na divlji tip (B95-8)												
B95-8	Gly/511	Lys/514	Leu/517	Leu/520	Thr/524	Ala/525	Ile/528	Pro/529	Arg/532	Leu/533	Prototip	Varijanta	Pristupni broj
EBVCROEBNA-1_15				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418292
EBVCROEBNA-1_16				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418293
EBVCROEBNA-1_14				Leu (t)	Ile			Gln			P-Thr	P-ala'	OR838650
EBVCROEBNA-1_17				Leu (t)							P-Ala	P-ala'	OR418290
EBVCROEBNA-1_18					Ile						P-Thr	P-thr'	OR418299
EBVCROEBNA-1_19				Leu (t)							P-Ala	P-ala'	OR418301
EBVCROEBNA-1_20				Leu (t)	Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418286
EBVCROEBNA-1_21					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418295
EBVCROEBNA-1_22				Leu (t)	Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR667532
EBVCROEBNA-1_23				Leu (t)	Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418257
EBVCROEBNA-1_34					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418296
EBVCROEBNA-1_73				Leu (t)	Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418297
EBVCROEBNA-1_24				Leu (t)	Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418298
EBVCROEBNA-1_42				Leu (t)	Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	PP835464
EBVCROEBNA-1_25				Leu (t)	Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418259
EBVCROEBNA-1_26				Leu (t)	Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418260
EBVCROEBNA-1_35				Leu (t)		Ile					P-Ala	P-ala'	OR418261
EBVCROEBNA-1_27				Leu (t)	Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418262
EBVCROEBNA-1_28				Leu (t)		Ile					P-Ala	P-ala'	OR418263
EBVCROEBNA-1_29				Leu (t)	Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418225
EBVCROEBNA-1_30				Leu (t)	Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418300
EBVCROEBNA-1_31				Leu (t)		Ile			Gln		P-Ala	P-ala'	OR418309
EBVCROEBNA-1_32				Leu (t)							P-Ala	P-ala'	OR418264
EBVCROEBNA-1_33				Leu (t)	Leu (t)	Ile					P-Ala	P-thr'	PP798370
EBVCROEBNA-1_1				Leu (t)							P-Ala	P-ala'	OR418265

Tablica 12. Polimorfizmi dokazani u idućih 25 sekvencija unutar 22 aminokiselinskih mjesta koja su dio klasifikacije prototipa odnosno varijanti *EBNA-1* te varijanti prototipa i podvarijanti, za svaku sekvenciju prikazane su aminokiseline koje se razlikuju od B95-8.

	Aminokiseline na kojima je dokazana promjena u odnosu na divlji tip (B95-8)												
B95-8	His/468	Gln/471	Thr/475	Pro/476	Glu/483	Gly/484	Arg/486	Ala/487*	Ser/492	Asp/499	Glu/500	Thr/502	Phe/508
EBVCROEBNA-1_2										Glu			
EBVCROEBNA-1_56				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_36				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_4										Glu			
EBVCROEBNA-1_5				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_58				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_39				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_38				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_41				Gln						Glu			
EBVCROEBNA-1_81				His				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_80				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_83										Glu			
EBVCROEBNA-1_6								x		Glu			
EBVCROEBNA-1_7								Thr		Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_8				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_44								Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_47				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_9										Glu			
EBVCROEBNA-1_10										Glu			
EBVCROEBNA-1_50								Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_11										Glu			
EBVCROEBNA-1_12										Glu			
EBVCROEBNA-1_48										Glu			
EBVCROEBNA-1_52				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_64				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			

Tablica 12. – nastavak.

	Aminokiseline na kojima je dokazana promjena u odnosu na divlji tip (B95-8)												
B95-8	Gly/511	Lys/514	Leu/517	Leu/520	Thr/524	Ala/525	Ile/528	Pro/529	Arg/532	Leu/533	Prototip	Varijanta	Pristupni broj
EBVCROEBNA-1_2					Val						P-Ala	P-ala'	OR418238
EBVCROEBNA-1_56				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418239
EBVCROEBNA-1_36				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418244
EBVCROEBNA-1_4					Val						P-Ala	P-ala'	OR418269
EBVCROEBNA-1_5				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418227
EBVCROEBNA-1_58				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418228
EBVCROEBNA-1_39				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418242
EBVCROEBNA-1_38				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418306
EBVCROEBNA-1_41					Val						P-Thr	P-ala'	OR838653
EBVCROEBNA-1_81				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418268
EBVCROEBNA-1_80				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418234
EBVCROEBNA-1_83					Val						P-Ala	P-ala'	OR418266
EBVCROEBNA-1_6					Val						P-Ala	P-ala'	OR418236
EBVCROEBNA-1_7				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR838652
EBVCROEBNA-1_8				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418270
EBVCROEBNA-1_44				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR667529
EBVCROEBNA-1_47				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418271
EBVCROEBNA-1_9					Val						P-Ala	P-ala'	OR418272
EBVCROEBNA-1_10					Val						P-Ala	P-ala'	OR418255
EBVCROEBNA-1_50				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418310
EBVCROEBNA-1_11					Val						P-Ala	P-ala'	OR418256
EBVCROEBNA-1_12					Ile						P-Ala	P-ala'	OR418287
EBVCROEBNA-1_48					Val						P-Ala	P-ala'	OR838655
EBVCROEBNA-1_52				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR838656
EBVCROEBNA-1_64				Leu ()	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418273

Tablica 13. Polimorfizmi dokazani u predzadnjih 25 sekvencija unutar 22 aminokiselinska mjesta koja su dio klasifikacije prototipa odnosno varijanti *EBNA-1* te varijanti prototipa i podvarijanti, prikazane su aminokiseline koje se razlikuju od divljeg tipa B95-8.

	Pozicije aminokiselina na kojima je dokazana promjena aminokiseline u odnosu na divlji tip (B95-8)											
B95-8	His/468	Gln/471	Thr/475	Pro/476	Glu/483	Gly/484	Arg/486	Ala/487*	Ser/492	Asp/499	Glu/500	Thr/502
EBVCROEBNA-1_46										Glu		
EBVCROEBNA-1_61				Gln				Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_13										Glu		
EBVCROEBNA-1_88				Gln				Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_51								Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_40								Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_110				His				Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_43				Gln				Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_45								Thr		Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_94										Glu		
EBVCROEBNA-1_49				Gln				Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_85				Gln				Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_37				Gln				Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_75										Glu		
EBVCROEBNA-1_99				Gln				Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_63										Glu		
EBVCROEBNA-1_86										Glu		
EBVCROEBNA-1_3				His				Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_111				Gln				Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_106					Asp					Glu		Asn
EBVCROEBNA-1_90										Glu		
EBVCROEBNA-1_66				Gln				Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_62				Gln				Thr	Cys	Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_95								Thr		Asp (t)		
EBVCROEBNA-1_68										Glu		

Tablica 13. – nastavak

	Aminokiseline na kojima je dokazana promjena u odnosu na divlji tip (B95-8)												
B95-8	Gly/511	Lys/514	Leu/517	Leu/520	Thr/524	Ala/525	Ile/528	Pro/529	Arg/532	Leu/533	Prototip	Varijanta	Pristupni broj
EBVCROEBNA-1_46											P-Ala	P-ala'	OR418311
EBVCROEBNA-1_61				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418274
EBVCROEBNA-1_13											P-Ala	P-ala'	OR838647
EBVCROEBNA-1_88				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418279
EBVCROEBNA-1_51				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418312
EBVCROEBNA-1_40				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR667530
EBVCROEBNA-1_110				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418294
EBVCROEBNA-1_43				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418275
EBVCROEBNA-1_45				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR838648
EBVCROEBNA-1_94											P-Ala	P-ala'	OR418281
EBVCROEBNA-1_49				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418288
EBVCROEBNA-1_85				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418278
EBVCROEBNA-1_37				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418246
EBVCROEBNA-1_75											P-Ala	P-ala'	OR667531
EBVCROEBNA-1_99				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418291
EBVCROEBNA-1_63											P-Ala	P-ala'	PP215919
EBVCROEBNA-1_86											P-Ala	P-ala'	OR838657
EBVCROEBNA-1_3				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR838654
EBVCROEBNA-1_111				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	PQ659514
EBVCROEBNA-1_106					Ile			Gln			P-Ala	P-ala'	OR838646
EBVCROEBNA-1_90											P-Ala	P-ala'	OR418280
EBVCROEBNA-1_66				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418289
EBVCROEBNA-1_62				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418276
EBVCROEBNA-1_95				Leu (t)							P-Thr	P-thr'	OR838651
EBVCROEBNA-1_68											P-Ala	P-ala'	OR418277

Tablica 14. Polimorfizmi dokazani u zadnjih 25 sekvencija unutar 22 aminokiselinska mjesta koja su dio klasifikacije prototipa odnosno varijanti *EBNA-1* te varijanti prototipa i podvarijanti, prikazane su aminokiseline koje se razlikuju od divljeg tipa B95-8.

	Aminokiseline na kojima je dokazane promjena u odnosu na divlji tip (B95-8)												
B95-8	His/468	Gln/471	Thr/475	Pro/476	Glu/483	Gly/484	Arg/486	Ala/487*	Ser/492	Asp/499	Glu/500	Thr/502	His/468
EBVCROEBNA-1_102				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_100				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_57										Glu		Asn	
EBVCROEBNA-1_65										Glu			
EBVCROEBNA-1_101				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_71										Glu			
EBVCROEBNA-1_105				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_53				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_87								Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_77				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_89				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_67				Gln	Asp			Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_107				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_103								Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_74				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_70				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_98										Glu			
EBVCROEBNA-1_84				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_91										Glu			
EBVCROEBNA-1_112				His				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_69				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_79										Glu		Asn	
EBVCROEBNA-1_76										Glu			
EBVCROEBNA-1_59				Gln				Thr	Cys	Asp (t)			
EBVCROEBNA-1_78										Glu			

Tablica 14. – nastavak

	Aminokiseline na kojima je dokazana promjena u odnosu na divlji tip (B95-8)												
B95-8	Gly/511	Lys/514	Leu/517	Leu/520	Thr/524	Ala/525	Ile/528	Pro/529	Arg/532	Leu/533	Prototip	Varijanta	Pristupni broj
EBVCROEBNA-1_102				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418292
EBVCROEBNA-1_100				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418293
EBVCROEBNA-1_57					Ile			Gln			P-Thr	P-ala'	OR838650
EBVCROEBNA-1_65											P-Ala	P-ala'	OR418290
EBVCROEBNA-1_101				Leu (t)	Ile						P-Thr	P-thr'	OR418299
EBVCROEBNA-1_71											P-Ala	P-ala'	OR418301
EBVCROEBNA-1_105					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418286
EBVCROEBNA-1_53					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418295
EBVCROEBNA-1_87					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR667532
EBVCROEBNA-1_77					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418257
EBVCROEBNA-1_89					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418296
EBVCROEBNA-1_67					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418297
EBVCROEBNA-1_107					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418298
EBVCROEBNA-1_103					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	PP835464
EBVCROEBNA-1_74					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418259
EBVCROEBNA-1_70					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418260
EBVCROEBNA-1_98						Ile					P-Ala	P-ala'	OR418261
EBVCROEBNA-1_84					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418262
EBVCROEBNA-1_91						Ile					P-Ala	P-ala'	OR418263
EBVCROEBNA-1_112					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418225
EBVCROEBNA-1_69					Leu (t)	Ile					P-Thr	P-thr'	OR418300
EBVCROEBNA-1_79						Ile			Gln		P-Ala	P-ala'	OR418309
EBVCROEBNA-1_76											P-Ala	P-ala'	OR418264
EBVCROEBNA-1_59					Leu (t)	Ile					P-Ala	P-thr'	PP798370
EBVCROEBNA-1_78											P-Ala	P-ala'	OR418265

4.1.3. Gen *EBNA-2*

EBV tip 1 i tip 2 uspješno su određeni u 100 uzoraka umnažanjem središnjeg dijela gena *EBNA-2* odnosno uporabom dva različita para početnica. Jedan korišten par početnica umnaža fragment *EBNA-2* specifičan za tip 1 (divlji tip B95-8) veličine 497 pb, doko drugi par početnica umnaža fragment specifičan za tip 2 (soj AG876, 150 pb). Za sekvenciranje je odabran onaj par početnica čiji je PCR produkt bio vidljiv na gelu odnosno čija je koncentracija nakon PCR-a upućivala na prisutnost umnoženog fragmenta. Istovremeno umnažanje oba fragmenta unutar istog uzorka nije primijećeno. Vidljivost fragmenta nije bio konačan rezultat genotipizacije, već početni korak kojim smo odabrali početnice za daljnje sekvenciranje. Početnicama specifičnima za tip 1 uspješno je dobivena sekvencija unutar 95,0% uzoraka, dok je ostalih 5,0% uspješno umnoženo početnicama za tip 2. Rezultati elektroferograma uspješno su dobiveni kod svih uzoraka te su sekvencije dobivene sekvenciranjem fragmenta umnoženog početnicama specifičnima za tip 1 uspješno preklopljene s referentnom sekvencijom za EBV tip 1 (gen *EBNA-2*, soj B95-8) odnosno sekvencije dobivene sekvenciranjem fragmenta početnicama specifičnima za tip 2 uspješno preklopljene s referentnom sekvencijom za EBV tip 2 (gen *EBNA-2*, soj AG876). Sve sekvencije primljene su u bazu GenBank te im je dodijeljen pristupni broj. Naime, tijekom poravnanja *EBNA-2* sekvencija, primijećeno je da među 95 sekvencija određenih kao EBV tip 1 njih 69,5% ima adiciju leucina (Leu) na mjestu aminokiseline 212 te je ta promjena zabilježena prilikom prikaza rezultata. Rezultati genotipizacije za prvih 40 sekvencija prikazani su u Tablici 13., za sljedećih 40 sekvencija u Tablici 14., dok je EBV tip za posljednjih 20 sekvencija prikazan u Tablici 15.

Tablica 13. Rezultati genotipizacije za prvih 40 sekvencija dobivenih umnažanjem gena *EBNA-2*. Tip 1 uspješno je umnožen specifičnim početnicama za EBV tip 1 odnosno tip 2 uspješno je umnožen specifičnim početnicama za EBV tip 2. Pojedine sekvencije imaju dodatan Leu na mjestu 212 koji nije prisutan kod referentne sekvencije B95-8 te je ova adicija naznačena u tablici. Sekvencije su uspješno unesene u bazu GenBank te su im dodijeljeni pristupni brojevi.

Šifra uzorka	EBV tip (prema umnoženom fragmentu <i>EBNA-2</i>)	Pristupni broj
EBVCROEBNA-2_15	Tip 1 sa Leu	OR397275
EBVCROEBNA-2_16	Tip 1 sa Leu	OR397276
EBVCROEBNA-2_14	Tip 1 sa Leu	PQ611734
EBVCROEBNA-2_17	Tip 1 sa Leu	OR397277
EBVCROEBNA-2_18	Tip 1	OR397278
EBVCROEBNA-2_19	Tip 1 sa Leu	OR397279
EBVCROEBNA-2_20	Tip 1 sa Leu	OR397280
EBVCROEBNA-2_21	Tip 1	OR397281
EBVCROEBNA-2_22	Tip 1 sa Leu	OR397282
EBVCROEBNA-2_23	Tip 1 sa Leu	OR397294
EBVCROEBNA-2_34	Tip 1	OR397304
EBVCROEBNA-2_73	Tip 1	OR397306
EBVCROEBNA-2_24	Tip 1 sa Leu	OR397295
EBVCROEBNA-2_42	Tip 1 sa Leu	OR397344
EBVCROEBNA-2_25	Tip 1	OR397287
EBVCROEBNA-2_26	Tip 1	OR397285
EBVCROEBNA-2_35	Tip 1 sa Leu	OR397284
EBVCROEBNA-2_27	Tip 1 sa Leu	OR397289
EBVCROEBNA-2_28	Tip 1	OR397292
EBVCROEBNA-2_29	Tip 1 sa Leu	OR397293
EBVCROEBNA-2_30	Tip 1 sa Leu	OR397290
EBVCROEBNA-2_31	Tip 1 sa Leu	OR397296
EBVCROEBNA-2_32	Tip 1 sa Leu	OR397291
EBVCROEBNA-2_33	Tip 1 sa Leu	OR397283
EBVCROEBNA-2_1	Tip 1 sa Leu	OR397322
EBVCROEBNA-2_2	Tip 1	OR397288
EBVCROEBNA-2_56	Tip 1 sa Leu	OR397312
EBVCROEBNA-2_36	Tip 1 sa Leu	OR397299
EBVCROEBNA-2_4	Tip 1	OR397343
EBVCROEBNA-2_5	Tip 1 sa Leu	OR397298
EBVCROEBNA-2_58	Tip 1 sa Leu	OR397303
EBVCROEBNA-2_39	Tip 1 sa Leu	OR397297
EBVCROEBNA-2_38	Tip 1 sa Leu	OR397327
EBVCROEBNA-2_41	Tip 1	OR397331
EBVCROEBNA-2_81	Tip 1 sa Leu	OR397352
EBVCROEBNA-2_80	Tip 1 sa Leu	OR397300
EBVCROEBNA-2_83	Tip 1	OR397338
EBVCROEBNA-2_6	Tip 1 sa Leu	OR397302
EBVCROEBNA-2_7	Tip 1 sa Leu	OR397333
EBVCROEBNA-2_8	Tip 1 sa Leu	OR397271

Tablica 14. Rezultati genotipizacije za idućih 40 uzoraka dobivenih umnažanjem gena *EBNA-2*. Tip 1 uspješno je umnožen početnicama za EBV tip 1 odnosno tip 2 uspješno je umnožen početnicama za EBV tip 2. Pojedine sekvencije imaju dodatan Leu na mjestu 212 koji nije prisutan kod referentne sekvencije B95-8 te je ova adicija naznačena u tablici. Sekvencije su uspješno unesene u bazu GenBank te su im dodijeljeni pristupni brojevi.

Šifra uzorka	EBV tip (prema umnoženom fragmentu <i>EBNA-2</i>)	Pristupni broj
EBVCROEBNA-2_44	Tip 1 sa Leu	OR397272
EBVCROEBNA-2_47	Tip 1 sa Leu	OR397273
EBVCROEBNA-2_9	Tip 1	OR397274
EBVCROEBNA-2_10	Tip 1	OR397305
EBVCROEBNA-2_50	Tip 1 sa Leu	OR397318
EBVCROEBNA-2_11	Tip 1 sa Leu	OR397340
EBVCROEBNA-2_12	Tip 1 sa Leu	OR397329
EBVCROEBNA-2_48	Tip 1	OR397314
EBVCROEBNA-2_52	Tip 1 sa Leu	OR397321
EBVCROEBNA-2_64	Tip 1 sa Leu	OR397319
EBVCROEBNA-2_46	Tip 1	OR397309
EBVCROEBNA-2_61	Tip 1 sa Leu	OR397316
EBVCROEBNA-2_13	Tip 1	OR397307
EBVCROEBNA-2_88	Tip 1 sa Leu	OR397354
EBVCROEBNA-2_51	Tip 1 sa Leu	OR397320
EBVCROEBNA-2_40	Tip 1 sa Leu	OR397308
EBVCROEBNA-2_110	Tip 1 sa Leu	OR397365
EBVCROEBNA-2_43	Tip 1 sa Leu	OR397369
EBVCROEBNA-2_45	Tip 1 sa Leu	OR397332
EBVCROEBNA-2_94	Tip 1	OR397355
EBVCROEBNA-2_49	Tip 1 sa Leu	OR397317
EBVCROEBNA-2_85	Tip 1 sa Leu	OR397366
EBVCROEBNA-2_37	Tip 1	OR397286
EBVCROEBNA-2_75	Tip 1	OR397367
EBVCROEBNA-2_99	Tip 2	PQ659513
EBVCROEBNA-2_63	Tip 2	PP215920
EBVCROEBNA-2_86	Tip 1 sa Leu	OR397361
EBVCROEBNA-2_3	Tip 2	PQ611740
EBVCROEBNA-2_111	Tip 1	OR397324
EBVCROEBNA-2_106	Tip 1	OR397362
EBVCROEBNA-2_90	Tip 1 sa Leu	OR397363
EBVCROEBNA-2_66	Tip 1 sa Leu	PP215918
EBVCROEBNA-2_62	Tip 1 sa Leu	OR397323
EBVCROEBNA-2_95	Tip 1 sa Leu	OR397356
EBVCROEBNA-2_68	Tip 1	OR397346
EBVCROEBNA-2_102	Tip 1 sa Leu	OR397359
EBVCROEBNA-2_100	Tip 1 sa Leu	OR397357
EBVCROEBNA-2_57	Tip 1 sa Leu	PQ611735
EBVCROEBNA-2_65	Tip 1	OR397326
EBVCROEBNA-2_101	Tip 1 sa Leu	OR397358

Tablica 15. Rezultati genotipizacije za posljednjih 20 uzoraka dobivenih umnažanjem gena *EBNA-2*. Tip 1 uspješno je umnožen početnicama za EBV tip 1, odnosno tip 2 uspješno je umnožen početnicama za EBV tip 2. Pojedine sekvencije imaju dodatan Leu na mjestu 212 koji nije prisutan kod referentne sekvencije B95-8 te je ova adicija naznačena u tablici. Sekvencije su uspješno unesene u bazu GenBank te su im dodijeljeni pristupni brojevi.

Šifra uzorka	EBV tip (prema umnoženom fragmentu <i>EBNA-2</i>)	Pristupni broj
EBVCROEBNA-2_71	Tip 1	OR397368
EBVCROEBNA-2_105	Tip 1 sa Leu	OR397315
EBVCROEBNA-2_53	Tip 1 sa Leu	OR397310
EBVCROEBNA-2_87	Tip 1 sa Leu	OR397330
EBVCROEBNA-2_77	Tip 1 sa Leu	OR397351
EBVCROEBNA-2_89	Tip 1 sa Leu	OR397334
EBVCROEBNA-2_67	Tip 1	OR397345
EBVCROEBNA-2_107	Tip 1	OR397313
EBVCROEBNA-2_103	Tip 1 sa Leu	PQ611736
EBVCROEBNA-2_74	Tip 1 sa Leu	OR397349
EBVCROEBNA-2_70	Tip 1 sa Leu	OR397348
EBVCROEBNA-2_98	Tip 2	PQ611739
EBVCROEBNA-2_84	Tip 1 sa Leu	OR397328
EBVCROEBNA-2_91	Tip 1 sa Leu	OR397335
EBVCROEBNA-2_112	Tip 1 sa Leu	PQ611737
EBVCROEBNA-2_69	Tip 1 sa Leu	OR397347
EBVCROEBNA-2_79	Tip 2	PQ611733
EBVCROEBNA-2_76	Tip 1	OR397350
EBVCROEBNA-2_59	Tip 1	OR397325
EBVCROEBNA-2_78	Tip 1	OR397341

4.1.4 Gen *BLLF1*

Rezultati PCR-a za gen *BLLF1* uspješno su dobiveni sekvenciranjem 5 različitih PCR produkta dobivenih od 5 različitih para početnica prilikom čega svaka umnaža jedan dio gena *BLLF1* veličine 500-600 pb. Umnoženi fragmenti svakog para početnica međusobno su preklapljeni uporabom sučelja *EMBOSS Merger* te je dobivena konačna sekvencija veličine 2721 pb. Preklapanje dobivenih fragmenata uspješno je izvedeno na svih 100 sekvencija te je na sekvencijama analiziran N-terminalni i C-terminalni kraj. N-terminalni kraj određen je kao podtip BLLF1-a kod 95,0% sekvencija zbog odsutstva polimorfizma na aminokiselini 21, dok je kod 5% sekvencija ovaj polimorfizam odgovarao promjeni glutamina u asparagin i određen je kao podtip BLLF1-b. Također, na N-terminalnom kraju sekvencija određenih kao BLLF1-a napravljena je dodatna podjela s obzirom na prisutnost polimorfizama na aminokiselini 201 i 252. Na poziciji aminokiseline 201 kod divljeg tipa B95-8 prisutna je glutaminska kiselina (Glu) te je ona na ovoj poziciji pronađena kod 15,0% naših sekvencija, 84,0% sekvencija imalo je promjenu aminokiseline u glutamin na poziciji 201, dok je jedna sekvencija ovdje imala prisutan lizin (Lys) koji prethodno nije zabilježen u literaturi odnosno kao dio algoritma određivanja podtipa *BLLF1*. Također, sve sekvencije bile su jednake divljem tipu odnosno imale aminokiselinu alanin (Ala) na poziciji 252, time je svim BLLF1-a sekvencijama s prisutnošću glutamina na aminokiselini 201 određena dodatna podjela na Q201 odnosno među dobivenim sekvencijama nije pronađen valin na mjestu aminokiseline 252. C-terminalni kraj dijeli se na 9P i 9D prilikom čega 9P označava prisutnost aminokiselina 676 -684 dok 9D označava njihovu deleciju. Rezultati C-terminalnog kraja identični su među svim dobivenim sekvencijama odnosno niti jedna sekvencija nije posjedovala deleciju na mjestu 676-684 te su stoga svi uzorci određeni kao 9P. Rezultati varijabilnosti N-terminalnog i C-terminalnog kraja gena *BLLF-1* za prvih 40 sekvencija prikazani su u Tablici 16., za sljedećih 40 sekvencija u Tablici 17., dok je varijabilnost gena *BLLF1* za posljednjih 20 sekvencija prikazana u Tablici 18.

Tablica 16. Rezultat varijabilnosti N-terminalnog i C-terminalnog kraja gena *BLLF1* za prvih 25 sekvencija. Prikazani su polimorfizmi na terminalnim krajevima te na aminokiselinama 201 i 252. Sekvencijama su dodijeljeni pristupni brojevi.

Šifra uzorka	N-terminalni kraj	Aminokiselina 201	Aminokiselina 252	<i>BLLF1</i> -a	C-terminalni kraj	Pristupni broj
EBVCROBLLF1_15	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR427832
EBVCROBLLF1_16	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418317
EBVCROBLLF1_14	<i>BLLF1</i> -a	Lys	Ala	L201	9P	OR558363
EBVCROBLLF1_17	<i>BLLF1</i> -a	Glu	Ala	Q201	9P	OR418328
EBVCROBLLF1_18	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP798362
EBVCROBLLF1_19	<i>BLLF1</i> -a	Glu	Ala	Q201	9P	OR427836
EBVCROBLLF1_20	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418326
EBVCROBLLF1_21	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418313
EBVCROBLLF1_22	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418327
EBVCROBLLF1_23	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418318
EBVCROBLLF1_34	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418316
EBVCROBLLF1_73	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418329
EBVCROBLLF1_24	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR427831
EBVCROBLLF1_42	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418324
EBVCROBLLF1_25	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677890
EBVCROBLLF1_26	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418325
EBVCROBLLF1_35	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418330
EBVCROBLLF1_27	<i>BLLF1</i> -a	Glu	Ala	Q201	9P	PP798366
EBVCROBLLF1_28	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418338
EBVCROBLLF1_29	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418331
EBVCROBLLF1_30	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9D	OR418332
EBVCROBLLF1_31	<i>BLLF1</i> -a	Glu	Ala	Q201	9P	OR427827
EBVCROBLLF1_32	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR558359
EBVCROBLLF1_33	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR558360
EBVCROBLLF1_1	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR427829

Tablica 17. Rezultat varijabilnosti N-terminalnog i C-terminalnog kraja gena *BLLF1* za idućih 25 sekvencija. Prikazani su polimorfizmi na terminalnim krajevima te na aminokiselinama 201 i 252. Sekvencijama su dodijeljeni pristupni brojevi.

Šifra uzorka	N-terminalni kraj	Aminokiselina 201	Aminokiselina 252	<i>BLLF1</i> -a	C-terminalni kraj	Pristupni broj
EBVCROBLLF1_2	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP798365
EBVCROBLLF1_56	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418333
EBVCROBLLF1_36	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR427830
EBVCROBLLF1_4	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP816063
EBVCROBLLF1_5	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418334
EBVCROBLLF1_58	<i>BLLF1</i> -a	Glu	Ala	Q201	9P	OR558362
EBVCROBLLF1_39	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR633382
EBVCROBLLF1_38	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418320
EBVCROBLLF1_41	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418321
EBVCROBLLF1_81	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418335
EBVCROBLLF1_80	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR427828
EBVCROBLLF1_83	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418315
EBVCROBLLF1_6	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR633383
EBVCROBLLF1_7	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR558361
EBVCROBLLF1_8	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418314
EBVCROBLLF1_44	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR427825
EBVCROBLLF1_47	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418336
EBVCROBLLF1_9	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418337
EBVCROBLLF1_10	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418323
EBVCROBLLF1_50	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP816064
EBVCROBLLF1_11	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR427837
EBVCROBLLF1_12	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418322
EBVCROBLLF1_48	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677891
EBVCROBLLF1_52	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677892
EBVCROBLLF1_64	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP798363

Tablica 18. Rezultat varijabilnosti N-terminalnog i C-terminalnog kraja gena *BLLF1* za prethodnih 25 sekvencija. Prikazani su polimorfizmi na terminalnim krajevima te na aminokiselinama 201 i 252. Sekvencijama su dodijeljeni pristupni brojevi.

Šifra uzorka	N-terminalni kraj	Aminokiselina 201	Aminokiselina 252	<i>BLLF1</i> -a	C-terminalni kraj	Pristupni broj
EBVCROBLLF1_46	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ611741
EBVCROBLLF1_61	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP798367
EBVCROBLLF1_13	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP798360
EBVCROBLLF1_88	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP816056
EBVCROBLLF1_51	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP835467
EBVCROBLLF1_40	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP835461
EBVCROBLLF1_110	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ611745
EBVCROBLLF1_43	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP835462
EBVCROBLLF1_45	<i>BLLF1</i> -a	Glu	Ala	Q201	9P	PP835463
EBVCROBLLF1_94	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP798361
EBVCROBLLF1_49	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR633385
EBVCROBLLF1_85	<i>BLLF1</i> -a	Glu	Ala	Q201	9P	OR427824
EBVCROBLLF1_37	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR418319
EBVCROBLLF1_75	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR633386
EBVCROBLLF1_99	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677894
EBVCROBLLF1_63	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677895
EBVCROBLLF1_86	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677896
EBVCROBLLF1_3	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677897
EBVCROBLLF1_111	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP835466
EBVCROBLLF1_106	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677898
EBVCROBLLF1_90	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677899
EBVCROBLLF1_66	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677900
EBVCROBLLF1_62	<i>BLLF1</i> -a	Glu	Ala	Q201	9P	PP798367
EBVCROBLLF1_95	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677901
EBVCROBLLF1_68	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP835460

Tablica 19. Rezultat varijabilnosti N-terminalnog i C-terminalnog kraja gena *BLLF1* za posljednjih 25 sekvencija. Prikazani su polimorfizmi na terminalnim krajevima te na aminokiselinama 201 i 252. Sekvencijama su dodijeljeni pristupni brojevi.

Šifra uzorka	N-terminalni kraj	Aminokiselina 201	Aminokiselina 252	<i>BLLF1</i> -a	C-terminalni kraj	Pristupni broj
EBVCROBLLF1_102	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP835459
EBVCROBLLF1_100	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ611744
EBVCROBLLF1_57	<i>BLLF1</i> -b	Glu	Ala	/	9P	PQ677902
EBVCROBLLF1_65	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP816065
EBVCROBLLF1_101	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP835458
EBVCROBLLF1_71	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR427833
EBVCROBLLF1_105	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677903
EBVCROBLLF1_53	<i>BLLF1</i> -a	Glu	Ala	Q201	9P	OR427835
EBVCROBLLF1_87	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR558358
EBVCROBLLF1_77	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677904
EBVCROBLLF1_89	<i>BLLF1</i> -a	Glu	Ala	Q201	9P	OR427820
EBVCROBLLF1_67	<i>BLLF1</i> -b	Glu	Ala	/	9P	OR558357
EBVCROBLLF1_107	<i>BLLF1</i> -a	Glu	Ala	Q201	9P	PP816057
EBVCROBLLF1_103	<i>BLLF1</i> -b	Glu	Ala	/	9P	PP816058
EBVCROBLLF1_74	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR427826
EBVCROBLLF1_70	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PQ677905
EBVCROBLLF1_98	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR633388
EBVCROBLLF1_84	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	OR427822
EBVCROBLLF1_91	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP816059
EBVCROBLLF1_112	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP816060
EBVCROBLLF1_69	<i>BLLF1</i> -b	Glu	Ala	/	9P	OR427823
EBVCROBLLF1_79	<i>BLLF1</i> -b	Gln	Ala	/	9P	OR633384
EBVCROBLLF1_76	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP816062
EBVCROBLLF1_59	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP816061
EBVCROBLLF1_78	<i>BLLF1</i> -a	Gln	Ala	Q201	9P	PP816066

4.1.5 Promotor Zp

Sekvencije promotora Zp uspješno su dobivene Sangerovim sekvenciranjem te je njihova veličina 150 pb. Na dobivenim elektroferogramima analizirana su četiri promotorska mjesta: -196, -141, -106 i -100. Analizom sekvencija pokazane je niska razina raznolikosti sekvencije ovog promotora. Najveći broj sekvencija (84%) određen je kao prototip Zp-P odnosno bio je identičan referentnoj sekvenciji na sva 4 analizirana mjesta. S druge strane, preostalih 16% sekvencija određeno je kao varijanta Zp-V3. Na ovim sekvencijama primijećena su 3 polimorfizma, promjena A u G na mjestu -141, promjena A u G na poziciji -106 te promjena T u G na poziciji -100. Varijanta Zp-V4 nije bila prisutna među sekvencijama analiziranim u ovom istraživanju. Sekvencije su unesene u bazu GenBank gdje im je dodijeljen pristupni broj. Rezultati određivanja varijanti promotora Zp prikazani su u Tablici 19. za prvih 40 sekvencija, u Tablici 20. za sljedećih 40 sekvencija te u Tablici 21. za posljednjih 20 sekvencija.

Tablica 20. Rezultati određivanja varijanti promotora Zp za prvih 40 sekvencija. Za svaku sekvenciju prikazan je nukleotid prisutan na 4 analizirana mjesta, određen prototip ili varijanta te dodijeljen pristupni broj u bazi GenBank. Promjena nukleotida u odnosu na divlji tip (B95-8) označena je crvenom bojom kao i varijanta Zp-V3 koja se razlikuje od divljeg tipa B95-8.

Šifra uzorka	T ⁻¹⁹⁶ ->C	A ⁻¹⁴¹ ->G	A ⁻¹⁰⁶ ->G	T ⁻¹⁰⁰ ->G	Prototip/varijanta	Pristupni broj
EBVCROZP_15	T	A	A	T	Zp-P	OR397371
EBVCROZP_16	T	A	A	T	Zp-P	OR397372
EBVCROZP_14	T	A	A	T	Zp-P	PQ660892
EBVCROZP_17	T	A	A	T	Zp-P	OR397373
EBVCROZP_18	T	A	A	T	Zp-P	OR397374
EBVCROZP_19	T	A	A	T	Zp-P	OR397375
EBVCROZP_20	T	A	A	T	Zp-P	OR397376
EBVCROZP_21	T	G	G	G	Zp-V3	OR397377
EBVCROZP_22	T	A	A	T	Zp-P	OR397378
EBVCROZP_23	T	A	A	T	Zp-P	OR397379
EBVCROZP_34	T	A	A	T	Zp-P	OR397380
EBVCROZP_73	T	A	A	T	Zp-P	OR397438
EBVCROZP_24	T	A	A	T	Zp-P	OR397411
EBVCROZP_42	T	A	A	T	Zp-P	OR397401
EBVCROZP_25	T	A	A	T	Zp-P	OR397386
EBVCROZP_26	T	A	A	T	Zp-P	OR397384
EBVCROZP_35	T	A	A	T	Zp-P	OR397382
EBVCROZP_27	T	A	A	T	Zp-P	OR397389
EBVCROZP_28	T	A	A	T	Zp-P	OR397390
EBVCROZP_29	T	A	A	T	Zp-P	OR397391
EBVCROZP_30	T	A	A	T	Zp-P	OR397393
EBVCROZP_31	T	A	A	T	Zp-P	OR397392
EBVCROZP_32	T	A	A	T	Zp-P	OR397394
EBVCROZP_33	T	A	A	T	Zp-P	OR397381
EBVCROZP_1	T	A	A	T	Zp-P	OR397387
EBVCROZP_2	T	G	G	G	Zp-V3	OR397388
EBVCROZP_56	T	G	G	G	Zp-V3	OR397420
EBVCROZP_36	T	A	A	T	Zp-P	OR397383
EBVCROZP_4	T	A	A	T	Zp-P	OR397402
EBVCROZP_5	T	A	A	T	Zp-P	OR397403
EBVCROZP_58	T	A	A	T	Zp-P	OR397422
EBVCROZP_39	T	A	A	T	Zp-P	OR397396
EBVCROZP_38	T	A	A	T	Zp-P	OR397395
EBVCROZP_41	T	G	G	G	Zp-V3	OR397400
EBVCROZP_81	T	A	A	T	Zp-P	OR397447
EBVCROZP_80	T	A	A	T	Zp-P	OR397446
EBVCROZP_83	T	G	G	G	Zp-V3	OR397449
EBVCROZP_6	T	G	G	G	Zp-V3	OR397451
EBVCROZP_7	T	A	A	T	Zp-P	OR397450
EBVCROZP_8	T	A	A	T	Zp-P	OR397456

Tablica 21. Rezultati određivanja varijanti promotora Zp za sljedećih 40 sekvencija. Za svaku sekvenciju prikazan je nukleotid prisutan na 4 analizirana mjesta, određen prototip ili varijanta te dodijeljen pristupni broj u bazi GenBank. Promjena nukleotida u odnosu na divlji tip (B95-8) označena je crvenom bojom kao i varijanta Zp-V3 koja se razlikuje od divljeg tipa B95-8.

Šifra uzorka	T ⁻¹⁹⁶ ->C	A ⁻¹⁴¹ ->G	A ⁻¹⁰⁶ ->G	T ⁻¹⁰⁰ ->G	Prototip/varijanta	Pristupni broj
EBVCROZP_44	T	A	A	T	Zp-P	OR397405
EBVCROZP_47	T	A	A	T	Zp-P	OR397408
EBVCROZP_9	T	A	A	T	Zp-P	OR397415
EBVCROZP_10	T	G	G	G	Zp-V3	OR397414
EBVCROZP_50	T	A	A	T	Zp-P	OR397412
EBVCROZP_11	T	A	A	T	Zp-P	OR397443
EBVCROZP_12	T	A	A	T	Zp-P	OR397423
EBVCROZP_48	T	G	G	G	Zp-V3	OR397409
EBVCROZP_52	T	A	A	T	Zp-P	OR397416
EBVCROZP_64	T	A	A	T	Zp-P	OR397429
EBVCROZP_46	T	G	G	G	Zp-V3	OR397407
EBVCROZP_61	T	A	A	T	Zp-P	OR397426
EBVCROZP_13	T	G	G	G	Zp-V3	OR397398
EBVCROZP_88	T	A	A	T	Zp-P	OR397457
EBVCROZP_51	T	A	A	T	Zp-P	OR397413
EBVCROZP_40	T	A	A	T	Zp-P	OR397399
EBVCROZP_110	T	A	A	T	Zp-P	PQ660894
EBVCROZP_43	T	A	A	T	Zp-P	OR397404
EBVCROZP_45	T	A	A	T	Zp-P	OR397406
EBVCROZP_94	T	A	A	T	Zp-P	OR397463
EBVCROZP_49	T	A	A	T	Zp-P	OR397410
EBVCROZP_85	T	A	A	T	Zp-P	OR397453
EBVCROZP_37	T	A	A	T	Zp-P	OR397385
EBVCROZP_75	T	A	A	T	Zp-P	OR397440
EBVCROZP_99	T	A	A	T	Zp-P	PQ660895
EBVCROZP_63	T	G	G	G	Zp-V3	OR397428
EBVCROZP_86	T	A	A	T	Zp-P	OR397454
EBVCROZP_3	T	A	A	T	Zp-P	OR397397
EBVCROZP_111	T	A	A	T	Zp-P	PQ660896
EBVCROZP_106	T	A	A	T	Zp-P	PQ660897
EBVCROZP_90	T	A	A	T	Zp-P	OR397459
EBVCROZP_66	T	A	A	T	Zp-P	OR397431
EBVCROZP_62	T	A	A	T	Zp-P	OR397427
EBVCROZP_95	T	A	A	T	Zp-P	OR397464
EBVCROZP_68	T	A	A	T	Zp-P	OR397433
EBVCROZP_102	T	A	A	T	Zp-P	PQ660891
EBVCROZP_100	T	A	A	T	Zp-P	PQ660893
EBVCROZP_57	T	A	A	T	Zp-P	OR397421
EBVCROZP_65	T	A	A	T	Zp-P	OR397430
EBVCROZP_101	T	A	A	T	Zp-P	OR667534

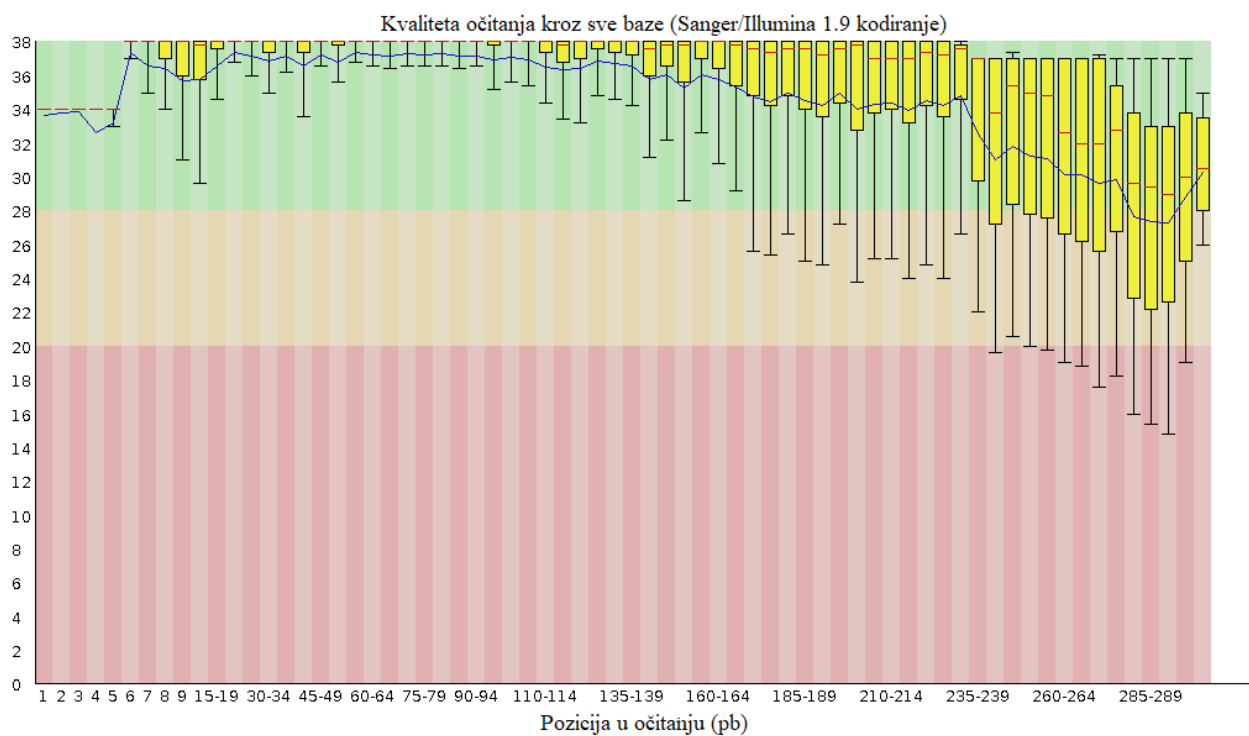
Tablica 22. Rezultati određivanja varijanti promotora Zp za posljednjih 20 sekvencija. Za svaku sekvenciju prikazan je nukleotid prisutan na 4 analizirana mjesta, određen prototip ili varijanta te dodijeljen pristupni broj u bazi GenBank. Promjena nukleotida u odnosu na divlji tip (B95-8) označena je crvenom bojom kao i varijanta Zp-V3 koja se razlikuje od divljeg tipa B95-8.

Šifra uzorka	T ⁻¹⁹⁶ ->C	A ⁻¹⁴¹ ->G	A ⁻¹⁰⁶ ->G	T ⁻¹⁰⁰ ->G	Prototip/varijanta	Pristupni broj
EBVCROZP_71	T	G	G	G	Zp-V3	OR397436
EBVCROZP_105	T	A	A	T	Zp-P	OR667533
EBVCROZP_53	T	A	A	T	Zp-P	OR397417
EBVCROZP_87	T	G	G	G	Zp-V3	OR397455
EBVCROZP_77	T	A	A	T	Zp-P	OR397442
EBVCROZP_89	T	A	A	T	Zp-P	OR397458
EBVCROZP_67	T	A	A	T	Zp-P	OR397432
EBVCROZP_107	T	A	A	T	Zp-P	OR667536
EBVCROZP_103	T	A	A	T	Zp-P	OR667535
EBVCROZP_74	T	A	A	T	Zp-P	OR397439
EBVCROZP_70	T	A	A	T	Zp-P	OR397435
EBVCROZP_98	T	G	G	G	Zp-V3	OR397467
EBVCROZP_84	T	A	A	T	Zp-P	OR397452
EBVCROZP_91	T	A	A	T	Zp-P	OR397460
EBVCROZP_112	T	A	A	T	Zp-P	OR667537
EBVCROZP_69	T	A	A	T	Zp-P	OR397434
EBVCROZP_79	T	G	G	G	Zp-V3	OR397445
EBVCROZP_76	T	A	A	T	Zp-P	OR397441
EBVCROZP_59	T	G	G	G	Zp-V3	OR397424
EBVCROZP_78	T	A	A	T	Zp-P	OR397444

4.2 Sekvenciranje nove generacije

Uzorci koji su prilikom determinacije varijanti određeni kao rekombinanti analizirani su metodom sekvenciranja nove generacije. Odabrano je 8 rekombinanata čija je koncentracija PCR produkata imala dovoljno visoku koncentraciju za sekvenciranje nove generacije (>20 ng/ μ l).

Sekvencije su umnožene korištenjem kompleta reagensa Truseq LMW adapter ligation kit, za vrstu očitavanja korišteno je očitavanje uparenog kraja (*Paired-end*) te je dužina očitavanja postavljena na 300 pb s pokrivenošću od 50K po uzorku. Broj očitavanja po uzorku bio je raspona 137578-149274, s prosječnom kvalitetom slijeda raspona 30-36. Kvaliteta očitavanja provjerena je programom *FastQC*, dok su programom *TrimGalore* odrezani krajevi očitavanja kvalitete vrijednosti 5 ili manje, kao i adapteri. Distribucija kvalitete očitavanja po poziciji nakon filtriranja prikazana je na Slici 4., pri čemu se opaža karakterističan pad kvalitete prema 3' kraju očitavanja (Slika 4.). Novonastala uređena očitavanja mapirana su na C-terminalni kraj referentne sekvencije gena *LMP-1* programom *BoB95-8ie2*. Iz dobivenih rezultata generiran je *Variant Call Format* (vcf) dokument koji sadrži informacije o dobivenim SNP-ovima i indelima u odnosu na referentnu sekvenciju (B95-8). Iz dobivenog vcf dokumenta izbačene su varijante s kvalitetom mapiranja manjom od 20. Prikazane varijante odnose se na najčešću promjenu u pojedinom uzorku, pri čemu su sve promjene od interesa u 8 uzoraka bile prisutne u svim analiziranim očitanjima (Slika 5.). Dobiveni rezultati pokazali su identične polimorfizme kao i rezultati Sangerovog sekvenciranja za svih 8 uzoraka (Tablica 21.). Polimorfizmi detektirani Sangerovim sekvenciranjem bili su prisutni u svim sekvencijama dobivenima sekvenciranjem nove generacije. Zaključujemo da je sekvenciranjem nove generacije potvrđena prisutnost rekombinanata odnosno odsutnost zasebnih varijanti čije su karakteristične promjene aminokiselina zabilježene na našim sekvencijama.



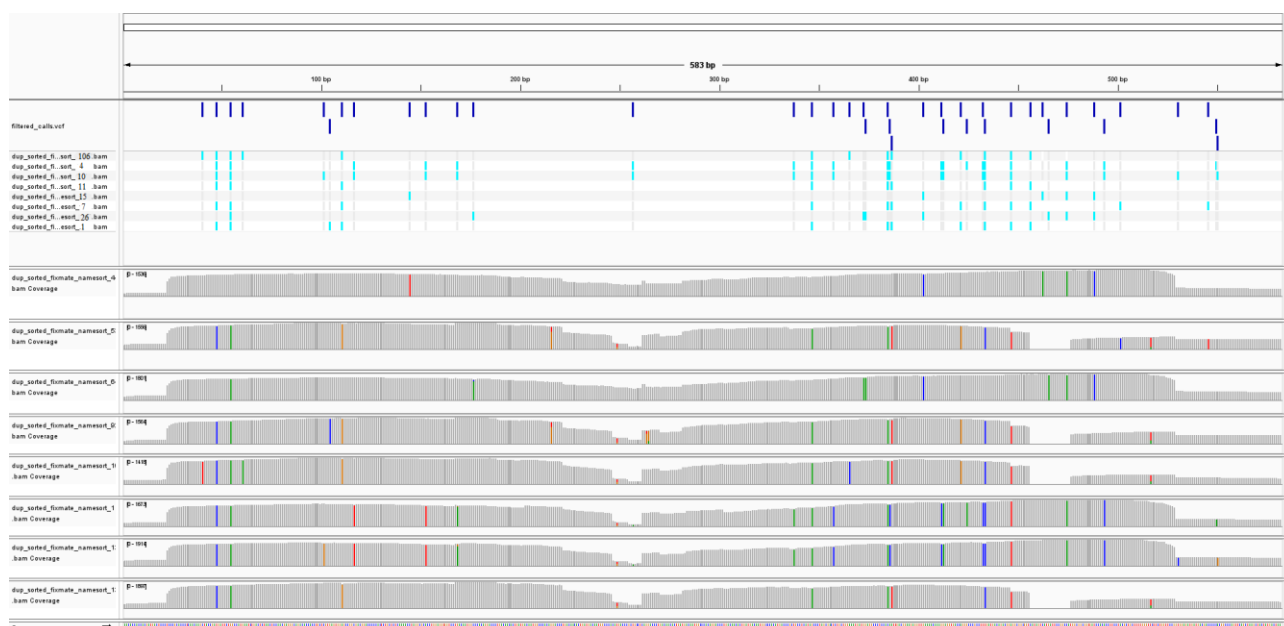
Slika 7. Distribucija kvalitete očitavanja po poziciji očitavanja (pb) za 8 rekombinanata dobivenih Sangerovim sekvenciranjem i sekvenciranjem nove generacije na instrumentu *Illumina MiSeq*. Kvaliteta očitavanja sekvencija pada prema 3'-kraju.

Tablica 23. Prikaz rezultata sekvenciranja 8 rekombinanata dobivenih Sangerovim sekvenciranjem i sekvenciranjem nove generacije pomoću Illumina MiSeq. Rezultati dobiveni metodom sekvenciranja nove generacije identični su rezultatima dobivenima Sangerovim sekvenciranjem. Pozicije u tablici koje se odnose na Sangerovo sekvenciranje predstavljaju broj aminokiseline proteina LMP-1, dok su pozicije prikazane za rezultate sekvenciranja nove generacije analizirane po mjestima nukleotida.

	Pozicije gdje je prisutna promjena u odnosu na divlji tip										
Pozicija (Illumina)	55	/	/	/	/	339	347	/	360	387	412
Pozicija (Sanger)	212	229	232	245	252	306	309	312	313	322	331
B95-8	Gly	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Ser	Asp	Ser	Gln	Gly
EBVCROLMP-1_106	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_4	Ser					Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_10	Ser					Gln	Asn		Pro	Thr	Gln
EBVCROLMP-1_11	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_15											
EBVCROLMP-1_7	Ser						Asn			Asn	
EBVCROLMP-1_26	Ser										
EBVCROLMP-1_1	Ser						Asn			Asn	

Tablica 23. - nastavak

	Pozicije gdje je prisutna promjena u odnosu na divlji tip										
Pozicija (Illumina)	412	422	433/434	/	/	475	/	/	494	/	
Pozicija (Sanger)	331	334	338	344	345	352	354	355	358	366	
B95-8	Gly	Gln	Leu	Gly	Gly	His	Gly	Gly	His	Ser	Rekombinant
EBVCROLMP-1_106		Arg	Ser (433)								China1/B95-8
EBVCROLMP-1_4	Gln		Pro (434)			Asn			Pro		NC sa 212
EBVCROLMP-1_10	Gln		Pro (434)			Asn			Pro		NC sa 212
EBVCROLMP-1_11			Ser(433)								China1/B95-8
EBVCROLMP-1_15						Asn					B95-8/NC
EBVCROLMP-1_7		Arg	Ser (433)								Ch1/B95-8
EBVCROLMP-1_26						Asn					B95-8/NC sa 212
EBVCROLMP-1_1		Arg	Ser (433)								Ch1/B95-8



Slika 8. Vizualizacija pokrivenosti C-terminalnog kraja gena *LMP-1* i prisutnih varijanti definiranih u dokumentu vcf. Varijante su prikazane ispod referentne sekvencije, dok je ispod njega prikaz pokrivenosti referentne sekvencije u svakom od uzoraka. Prisutnost boja na pojedinim pozicijama gena odgovara udjelu pojedinog polimorfizma u svim očitanjima mapiranim na određenoj poziciji.

4.3 Filogenija

Sekvencije koje su prethodno genotipizirane te svrstane u određene tipove, podtipove, varijante i podvarijante, poravnate su sa sukladnim genom odnosno promotorom *Zp* iz referentnog genoma soja B95-8. Svih 100 sekvencija poravnato je s referentnom sekvencijom u programu MEGA11 korištenjem funkcije *ClustalW*. Na poravnatim sekvencijama napravljeno je filogenetsko stablo korištenjem online sučelja IQ-TREE, metodom *Maximum likelihood* i *Jukes-Cantor* supstitucijskim modelom s bootstrap ponavljanjima postavljenima na vrijednost 5000. Sve sekvencije ukorijenjene su s referentnom sekvencijom prikladnog gena soja B95-8. Filogenetska stabla dodatno su uređena korištenjem programa iTOL gdje su prikazane bootstrap vrijednosti u rasponu 50-100, duljine grana odnosno razlike između grupa formiranih na stablu, te su sekvencije obojane sukladno rezultatima genotipizacije koji su prikazani na odgovarajućoj legendi.

4.3.1 Gen *LMP-1*

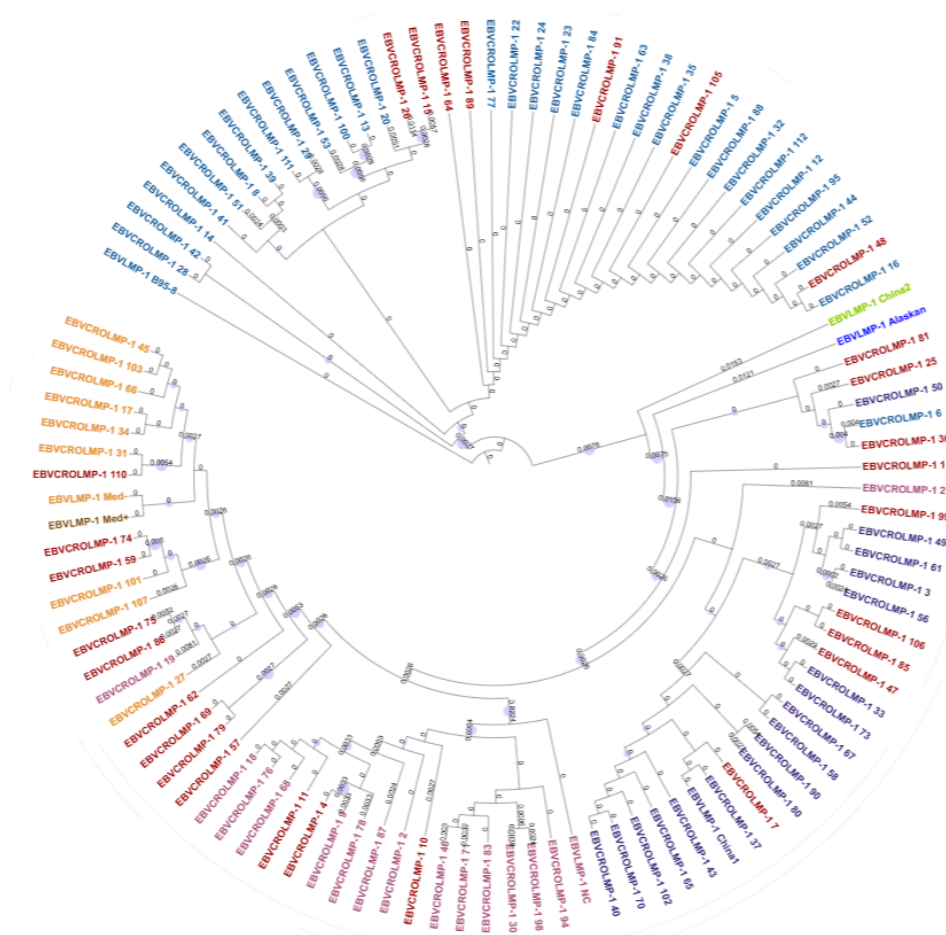
Prilikom poravnanja sekvencija za filogeniju gena *LMP-1* korištena je referentna sekvencija gena *LMP-1* soja B95-8, kao i referentne sekvencije *LMP-1* za svaku pojedinu varijantu: China1 (AY337723.1), China2 (AY337724.1), Mediterranean s delecijom (Med+, AY337722.2), Mediterranean bez delecije (Med-, AY337721.2), Alaskan (AY337725.1) i North Carolina (AY337726.2). Sekvencije koje su određene kao divlji tip odnosno B95-8 (31/100) grupirale su se u grupu s referentnom sekvencijom B95-8, osim sekvencije EBVCROLMP-1_6 koja se nalazi između referentnih sekvencija varijanti China1 i Alaskan. Dva rekombinanta koja se nalaze unutar B95-8 grupe, označeni su crvenom bojom (Slika 6.), rekombinanti su divljeg soja s varijantom North Carolina prilikom čega većina analiziranih mjesta odgovara B95-8. Od sekvencija kojima je određena varijanta China1 (17/100), njih 16 grupiralo se u grupu s referentnom sekvencijom varijante China1, osim sekvencije EBVCROLMP-1_50 koja se, poput sekvencije EBVCROLMP-1_6, nalazi u grupi formiranoj između China1 i grupe referentne sekvencije varijante Alaskan. Svih 5 rekombinanata prisutnih u grupi s China1 su rekombinanti kojima većina polimorfizama na analiziranim aminokiselinskim mjestima odgovara varijanti China1 prilikom čega su 4 sekvencije EBVCROLMP-1_7, EBVCROLMP-1_85, EBVCROLMP-1_106 i EBVCROLMP-1_99 rekombinanti China1/B95-8, dok je sekvencija EBVCROLMP-1_47 rekombinant varijanti China1/Alaskan. Od 15 sekvencija kojima je određena varijanta North Carolina, 14 se grupiralo sa referentnom sekvencijom North Carolina, dok je jedna sekvencija, EBVCROLMP-1_19 grupirana u grupu sa 2 rekombinanta i sekvencijom varijante Med-. Dvije sekvencije određene kao rekombinanti varijante North Carolina s aminokiselinskom promjenom na mjestu 212 grupirane su sa referentnom sekvencijom North Carolina. Međutim, sekvencija EBVCROLMP-1_11, određena kao rekombinant B95-8/China1, također se nalazi u ovoj grupi. Među 9 rekombinanata grupiranih u grupu sa referentnom sekvencijom Med-, 5 sekvencija su varijante Med- sa aminokiselinskom promjenom na mjestu 212, dvije sekvencije su rekombinanti Med-/B95-8, dok su dvije sekvencije rekombinanti China1/B95-8. Rekombinanti EBVCROLMP-1_36 i EBVCROLMP-1_25 određeni su kao B95-8/China1 te se nalaze grupirani između B95-8 i China1, dok je sekvencija EBVCROLMP-1_81 određena kao rekombinant China1/Alaskan te se nalazi uz Alaskan referentnu sekvenciju.

bootstrap

- 50
- 62.5
- 75
- 87.5
- 100

LMP-1 varijanta

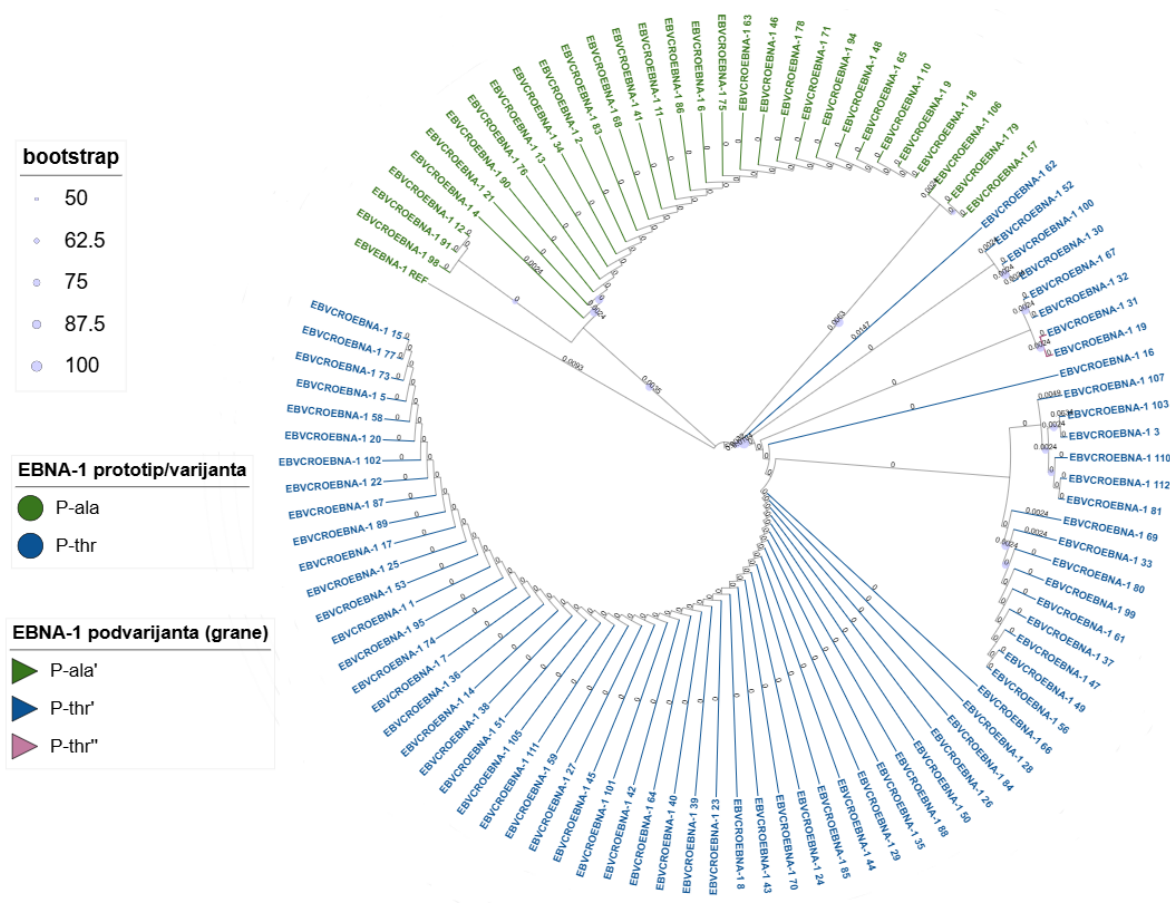
- B95-8
- North Carolina
- China1
- China2
- Med-
- Med+
- Alaskan
- Rekombinanti



Slika 9. Filogenetsko stablo gena *LMP-1* ukorijenjeno s referentnom sekvencijom divljeg soja B95-8. Uz B95-8, na stablu su prikazane i referentne sekvencije za svaku pojedinu *LMP-1* varijantu. Svakoj varijanti dodijeljena je određena boja te je njihov raspored prikazan na legendi. Bootstrap vrijednosti prikazane su u rasponu 50-100, dok su vrijednosti duljine grana zaokružene na 4 decimale. Svaka prikazana razlika na stablu predstavljena kao 0 odgovara vrijednosti manjoj od 0,0001.

4.3.2 Gen *EBNA-1*

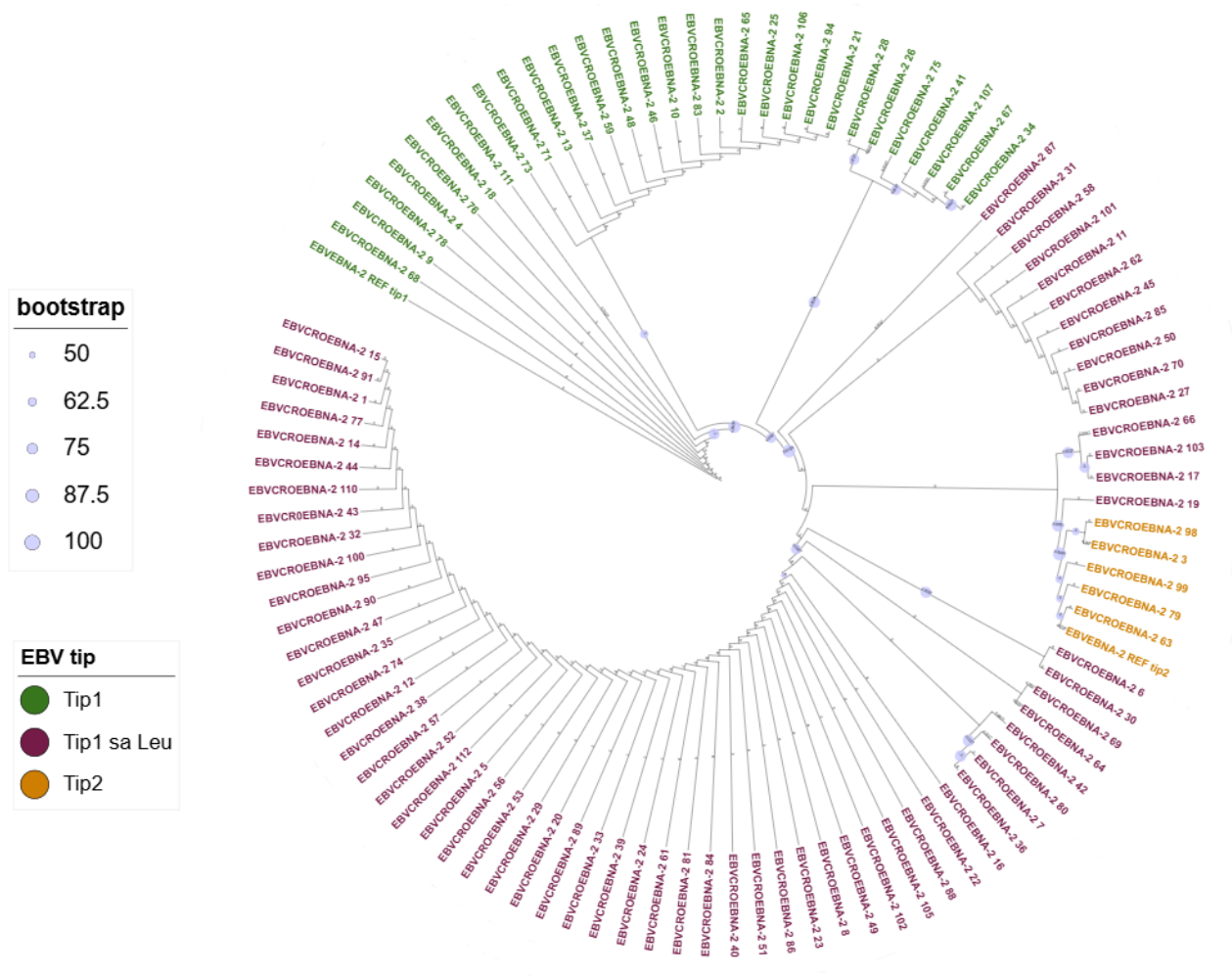
Sekvencije gena *EBNA-1* prikazane su na filogenetskom stablu u usporedbi sa referentnom sekvencijom gena *EBNA-1* soja B95-8 koja pripada prototipu P-ala. Svih 30 sekvencija određenih kao prototip P-ala odnosno varijanta prototipa P-ala' grupirane su u odvojenu grupu uz referentnu sekvenciju B95-8. Preostalih 70 sekvencija kojoj je određen prototip P-thr grupirane su u odvojenu grupu od referentne sekvencije (Slika 8). Među sekvencijama određenima kao prototip P-thr, dvije sekvencije određene kao varijanta prototipa P-thr'', EBVCROEBNA-1_31 I EBVCROEBNA-1_19, zajedno su grupirane.



Slika 10. Filogenetsko stablo gena *EBNA-1* ukorijenjeno s referentnom sekvencijom divljeg soja B95-8. Određeni *EBNA-1* prototipovi prikazani su u dvije različite boje, P-ala (zeleno) i P-thr (plavo) sukladno legendi. Podvarijante razdvojene su prema bojama grana prilikom čega zelena predstavlja podvarijantu P-ala', plava podvarijantu P-thr' te ružičasta P-thr''. Bootstrap vrijednosti prikazane su u rasponu 50-100, dok su vrijednosti duljine grana zaokružene na 4 decimale. Svaka prikazana razlika na stablu predstavljena kao 0 odgovara vrijednosti manjoj od 0,0001.

4.3.3 Gen *EBNA-2*

Sekvencije gena *EBNA-2* poravnate su sa sekvencijom *EBNA-2* referentnog soja za EBV tip 1 (B95-8) te s referentnom sekvencijom *EBNA-2* za EBV tip 2 soja AG876 (DQ279927). Među 95 sekvencija određenih kao EBV tip 1, 66 sekvencija imalo je dodatak leucina na mjestu aminokiseline 212 te su kao takve grupirane u odvojenu grupu od preostalih 29 sekvencija određenih kao EBV tip 1 koje nemaju adiciju leucina. Svih 5 sekvencija određeno kao EBV tip 2 grupiralo se sa referentnom sekvencijom za EBV tip 2 preuzete iz soja AG876. Grupa na filogenetskom stablu unutar koje se nalaze sekvencije određene kao EBV tip 2 nalazi se kao odvojena grupacija unutar grupe EBV tip 1 sa dodatkom leucina prilikom čega je razlika među njima naglašena duljinom grane između u iznosu od 0,6055.



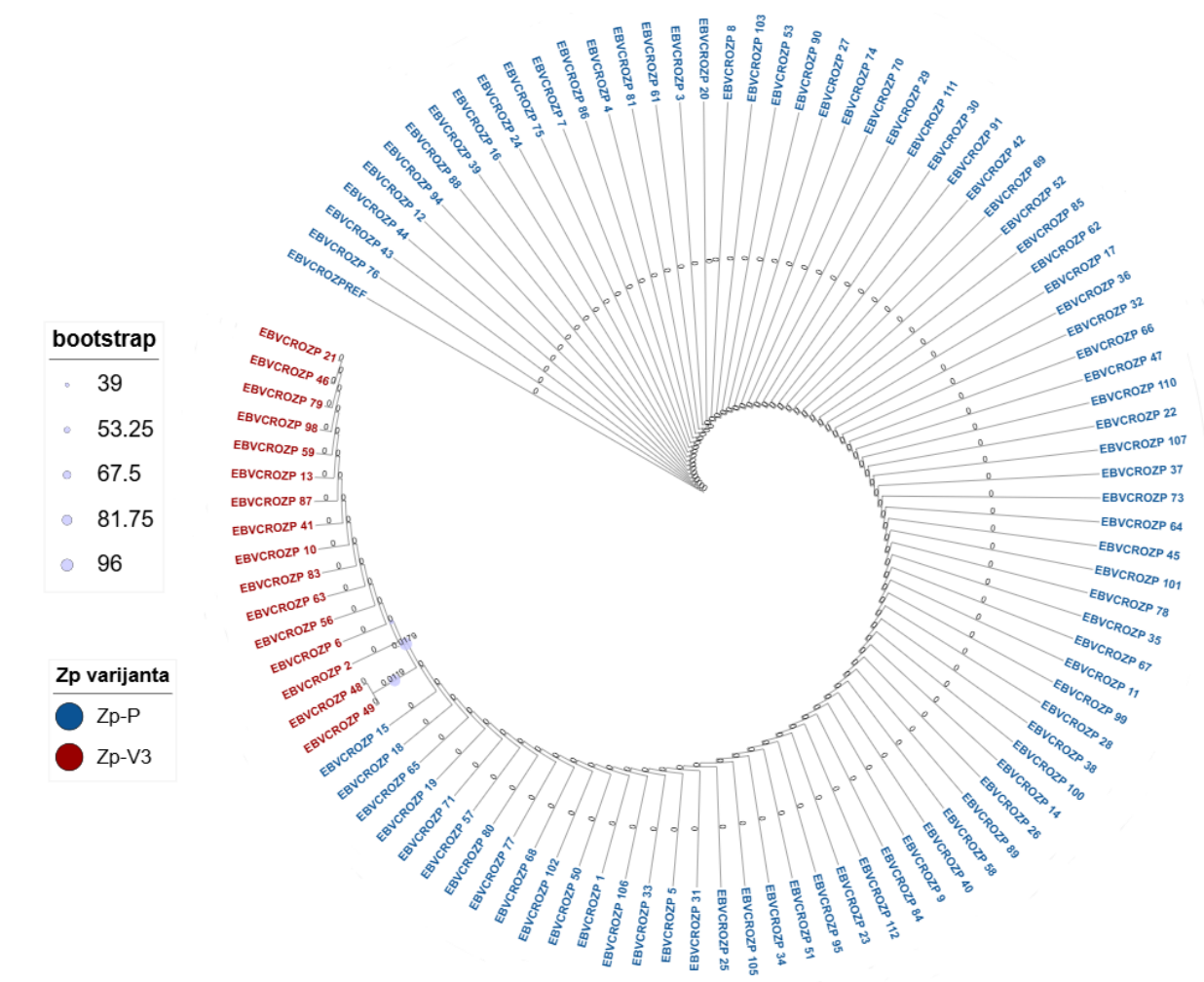
Slika 11. Filogenetsko stablo gena *EBNA-2* ukorijenjeno s referentnom sekvencijom divljeg soja B95-8 (EBV tip 1). Uz B95-8, na stablu je prikazana i referentna sekvencija za EBV tip 2 koja je, uz naše sekvencije određene kao tip 2, označena narančastom bojom. Sekvencije na kojima je utvrđena dodatna adicija leucina na mjestu 212 prikazane su ljubičastom bojom, dok je tip 1 bez adicije leucina prikazan zelenom bojom, kao i divlji soj B95-8. Bootstrap vrijednosti prikazane su u rasponu 50-100, vrijednosti duljine grana zaokružene su na 4 decimale. Svaka prikazana razlika na stablu predstavljena kao 0 odgovara vrijednosti manjoj od 0,0001.

4.3.4 Gen *BLLF1*

Sekvencije gena *BLLF1* prikazane su na filogenetskom stablu s referentnom sekvencijom B95-8 (Slika 9.). Na N-terminalnom kraju, 95 sekvencija odgovaralo je podtipu BLLF1-a odnosno na poziciji aminokiseline 21 bio je prisutan glutamin kao kod soja B95-8 te su ove sekvencije raspoređene po cijelom filogenetskom stablu tvoreći nekoliko manjih podgrupa. Sekvencije određene kao podtip BLLF1-b označene su crvenom bojom te se nalaze unutar grupe raspoređene u nekoliko manjih grupacija među kojima se nalaze i dvije sekvencije, EBVCROBLLF1_86 i EBVCROBLLF1_70 koje pripadaju podtipu BLLF1-a. Sekvencije određene kao BLLF1-a mogu biti dodatno podijeljene na varijantu Q201 i A252. 9 sekvencija nije imalo aminokiselinsku promjenu ni na jednoj od pozicija 201 i 252 te su zbog identičnosti s divljim tipom na filogenetskom stablu prema legendi označene kao B95-8. Grane sekvencija bez promjene na mjestu 21 označene su ljubičastom bojom te su grupirane uz referentnu sekvenciju. C-terminalni kraj gena *BLLF1* nije pokazao raznolikost te je svih 100 sekvencija pripalo podtipu 9P te stoga ovaj podtip nije naznačen na filogenetskom stablu.

4.3.5 Promotor Zp

Sekvencije promotora Zp prikazane su u usporedbi s referentnom sekvencijom koja pripada prototipu Zp-P. Filogenetsko stablo pokazuje malu raznolikost sekvencija, nedostatak grupa i podgrupa (Slika 10.). Ukupno 84 sekvencija pripada prototipu Zp-P koje su identične sekvenciji referentnog soja B95-8 i međusobno su identične bez polimorfizama te njihova međusobna udaljenost stoga iznosi 0. S druge strane, 16 sekvencija koje su određene kao varijanta Zp-V3 grupirale su se na lijevoj strani filogenetskog stabla te su označene crvenom bojom (Slika 10). Razlika između sekvencija varijante Zp-V3 i sekvencija s određenim prototipom Zp-P vidljiva je u vrijednosti duljine grana prilikom čega duljina grane kod čvorišta koje odvaja dvije grupe sekvencija iznosi 0.0179. U grupi sekvencija određenima kao varijanta Zp-V3 formirana je dodatna grupa koja odvaja sekvencije EBVCROZP_48 I EBVCROZP_49 s duljinom grane u vrijednosti od 0.0119. Ove dvije vrijednosti duljina grane jedine su različite od 0 na cijelom filogenetskom stablu promotora Zp gdje sekvencije pokazuju iznimno visoku razinu podudarnosti.



Slika 13. Filogenetsko stablo promotora Zp ukorijenjeno sa sekvencijom promotora Zp preuzete iz divljeg soja B95-8. Sekvencije određene kao prototip Zp-P prikazane su plavom bojom, dok je varijanta Zp-V3 prikazana crvenom bojom. Bootstrap vrijednosti prikazane su u rasponu 50-100, vrijednosti duljine grana zaokružene su na 4 decimale. Svaka prikazana razlika na stablu predstavljena kao 0 odgovara vrijednosti manjoj od 0,0001.

4.4 Analiza pojave različitih kombinacija gena

Dobivenim sekvencijama određeni su tipovi, podtipovi i varijante na temelju raznolikosti gena *LMP-1*, *EBNA-1*, *EBNA-2*, *BLLF1* i promotora *Zp* te je napravljen Fisherov egzaktni test odnosno Hi-kvadrat test kako bi se ispitalo pojavljuju li se dobivene varijanti gena značajno češće u kombinaciji s uz određenim varijantama odnosno tipovima i podtipovima preostalih analiziranih gena. Prilikom provedbe analize je kao statistički značajna p-vrijednost određena $p < 0,05$. P-vrijednost izračunata je prilikom provedbe Hi-kvadrat i Fisherovog egzaktnog testa, dok je uz Fisherov egzaktni test, proveden kod tablica s brojem kombinacija 2x2, dodatno izračunat omjer izgleda (OR, od eng. *Odds ratio*) i interval pouzdanosti (CI, od eng. *Confidence interval*) postavljen na 95,0%.

4.4.1 Gen *LMP-1*

Varijante gena *LMP-1* dobivene analizom 100 sekvencija obuhvaćaju divlji tip B95-8, varijante China1, North Carolina, Med- i sekvencije definirane kao rekombinanti. Analizom varijanti gena *LMP-1*, Fisherovim egzaktnim testom odnosno Hi-kvadrat testom, ispitano je koja od varijanti češće dolazi u kombinaciji s prototipovima gena *EBNA-1*, P-ala i P-thr (Tablica 22., Tablica 22-nastavak.), s podtipom *BLLF1*-a i *BLLF1*-b gena *BLLF1* (Tablica 23., Tablica 23 - nastavak.), sa tipom 1, tipom 1 sa adicijom Leu odnosno tipom 2 određenih na temelju raznolikosti gena *EBNA-2* (Tablica 24., Tablica 24 - nastavak.), te s varijantama *Zp*-P i *Zp*-V3 promotora *Zp* (Tablica 25., Tablica 25 - nastavak.). Provedenom statističkom analizom pomoću Fisherovog egzaktnog testa pokazano je da se divlji tip gena *LMP-1*, B95-8, značajno češće pojavljuje u kombinaciji s prototipom P-thr gena *EBNA-1* ($p=0,0484$, OR:0,3385, CI (95,0%): 0,1154-0,9923), dok se varijanta North Carolina značajno češće pojavljuje u kombinaciji s prototipom P-thr ($p=0,0001$, OR:14,8889, CI (95,0%): 3.7909-58.4760) (Tablica 22.). Nije dokazana statistički značajna povezanost između pojave različitih varijanti gena *LMP-1* i gena *BLLF1* ($p > 0,05$) (Tablica 23., Tablica 23-nastavak.). Analizom provedenom Hi-kvadrat testom pokazano je da se divlji tip gena *LMP-1* ($p < 0,0001$) te varijante China1 ($p=0,0002$), Med- ($p=0,0015$), kao i rekombinanti ($p < 0,0001$), značajno češće pojavljuju u kombinaciji s tipom 1 sa adicijom Leu s obzirom na raznolikost gena *EBNA-2*, dok se varijanta North Carolina značajno češće pojavljuje u kombinaciji s tipom 1 ($p=0,0002$) (Tablica 24., Tablica 24 - nastavak.). S obzirom na raznolikost promotora *Zp*, statističkom analizom provedenom

Fisherovim egzaktnim testom pokazano je da varijanta North Carolina gena *LMP-1* češće dolazi uz prototip Zp-P ($p=0,0100$, OR:0,2000, CI (95,0%): 0,0590-0,6814) (Tablica 25.).

Tablica 24. Statističkom analizom provedenom pomoću Fisherovog egzaktnog testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih varijanti gena *LMP-1* i prototipova gena *EBNA-1*. Provedenom analizom pokazano je da se divlji tip gena *LMP-1*, B95-8, značajno češće pojavljuje u kombinaciji s prototipom P-thr ($p=0,0484$), dok se varijanta North Carolina značajno češće pojavljuje u kombinaciji s prototipom P-thr ($p=0,0001$). Statistički značajne vrijednosti označene su crvenom bojom.

	<i>LMP-1</i> varijanta					
<i>EBNA-1</i>	B95-8 (N=31)	Ostali	China1 (N=17)	Ostali	North Carolina (N=15)	Ostali
P-ala (N=30)	5	25	2	28	12	18
P-thr (N=70)	26	44	15	55	3	67
p-vrijednost	$p=0,0484$		$p=0,0890$		$p=0,0001$	

Tablica 25 – nastavak.

	<i>LMP-1</i> varijanta			
<i>EBNA-1</i>	Med- (N=9)	Ostali	Rekombinanti (N=28)	Ostali
P-ala (N=30)	1	29	10	20
P-thr (N=70)	8	62	18	52
p-vrijednost	$p=0,2240$		$p=0,4380$	

Tablica 26. Statističkom analizom provedenom pomoću Hi-kvadrat testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih varijanti gena *LMP-1* i različitih tipova EBV-a na temelju raznolikosti gena *EBNA-2*. Provedenom analizom pokazano je da se divlji tip *LMP-1* ($p < 0,0001$) i varijanta China1 ($p = 0,0002$) značajno češće pojavljuju u kombinaciji s tipom 1 sa Leu s obzirom na raznolikost gena *EBNA-2*, dok se varijanta North Carolina značajno češće pojavljuje u kombinaciji s tipom 1 ($p = 0,0002$). Statistički značajne vrijednosti označene su crvenom bojom.

	<i>LMP-1</i> varijanta					
EBV tip (<i>EBNA-2</i>)	B95-8 (N=31)	Ostali	China1 (N=17)	Ostali	North Carolina (N=15)	Ostali
Tip 1 (N=29)	4	27	4	13	11	4
Tip 1 sa Leu (N=66)	26	5	12	5	3	12
Tip 2 (N=5)	1	30	1	16	1	14
p-vrijednost	$p < 0,0001$		$p = 0,0002$		$p = 0,0002$	

Tablica 26 – nastavak

	<i>LMP-1</i> varijanta			
EBV tip (<i>EBNA-2</i>)	Med- (N=9)	Ostali	Rekombinanti (N=28)	Ostali
Tip 1 (N=29)	2	7	8	20
Tip 1 sa Leu (N=66)	7	2	18	10
Tip 2 (N=5)	0	9	2	26
p-vrijednost	$p = 0,0015$		$p < 0,0001$	

Tablica 27. Statističkom analizom provedenom pomoću Fisherovog egzaktnog testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih varijanti gena *LMP-1* i podtipova gena *BLLF1*. Provedenom analizom nije dobivena statistički značajna vrijednost ($p > 0,05$).

	<i>LMP-1</i> varijanta					
<i>BLLF1</i> podtip	B95-8 (N=31)	Ostali	China1 (N=17)	Ostali	North Carolina (N=15)	Ostali
<i>BLLF1-a</i> (N=95)	31	64	16	79	15	80
<i>BLLF1-b</i> (N=5)	0	5	1	4	0	5
p-vrijednost	p=0,2601		p=0,8550		p=0,6180	

Tablica 27 – nastavak

	<i>LMP-1</i> varijanta			
<i>BLLF1</i>	Med- (N=9)	Ostali	Rekombinanti (N=28)	Ostali
<i>BLLF1-a</i>	8	87	25	70
<i>BLLF1-b</i>	1	4	3	2
p-vrijednost	p=0,3960		p=0,1280	

Tablica 28. Statističkom analizom provedenom pomoću Fisherovog egzaktnog testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih varijanti gena *LMP-1* i varijanti promotora Zp. Provedenom analizom pokazano je da se varijanta gena *LMP-1* North Carolina češće pojavljuje u kombinaciji s prototipom Zp-P ($p=0,0100$). Statistički značajne vrijednosti označene su crvenom bojom.

	<i>LMP-1</i> varijanta					
Zp varijanta	B95-8 (N=31)	Ostali	China1 (N=17)	Ostali	North Carolina (N=15)	Ostali
Zp-P (N=84)	27	57	15	69	9	75
Zp-V3 (N=16)	4	12	2	14	6	10
p-vrijednost	p=0,5700		p=0,6000		p=0,0100	

Tablica 28 – nastavak

	<i>LMP-1</i> varijanta			
Zp varijanta	Med- (N=9)	Ostali	Rekombinanti (N=28)	Ostali
Zp-P (N=84)	9	75	24	60
Zp-V3 (N=16)	0	16	4	12
p-vrijednost	p=0,3000		p=0,7000	

4.4.2 Gen *EBNA-1*

Analizom varijanti gena *EBNA-1* dobivena su 2 prototipa, P-ala i P-thr. Statističkom analizom, provedenom korištenjem Hi-kvadrat testa, dobiveno je da se prototip P-ala gena *EBNA-1* značajno češće pojavljuje u kombinaciji s varijantom North Carolina gena *LMP-1*, dok se prototip P-thr značajno češće pojavljuje u kombinaciji s divljim tipom gena *LMP-1* u usporedbi s ostalim varijantama ($p<0,0001$) (Tablica 26.). Također, prototip P-ala značajno češće se pojavljuje u kombinaciji s tipom 1 bez adicije Leu, dok se prototip P-thr značajno češće pojavljuje u kombinaciji s tipom 1 sa adicijom Leu na mjestu aminokiseline 212 ($p<0,0001$) (Tablica 28). Prototipovi gena *EBNA-1* nisu pokazali statističku značajnost uz podtipove gena *BLLF1* ($p>0,05$) (Tablica 28.), dok je pomoću Fisherovog egzaktnog testa pokazano da se

prototip P-thr značajno češće pojavljuje u kombinaciji s prototipom Zp-P, dok se prototip P-ala značajno češće pojavljuje u kombinaciji s varijantom promotora Zp-V3 ($p=0,0002$; OR:0,0974, CI (95,0%): 0,0281 – 0,3373) (Tablica 29.).

Tablica 29. Statističkom analizom provedenom pomoću Hi-kvadrat testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih varijanti prototipova gena *EBNA-1* i varijanti gena *LMP-1*. Provedenom analizom pokazano je da se prototip P-thr značajno češće pojavljuje u kombinaciji s divljim tipom gena *LMP-1*, dok P-ala češće dolazi uz ostale varijante ($p<0,0001$).

<i>LMP-1</i> varijanta	<i>EBNA-1</i> prototip	
	P-ala (N=30)	P-thr (N=70)
B95-8 (N=31)	5	26
China1 (N=17)	2	15
North Carolina (N=15)	12	3
Med- (N=9)	1	8
Rekombinanti (N=28)	10	18
p-vrijednost	$p<0,0001$	

Tablica 30. Statističkom analizom provedenom pomoću Hi-kvadrat testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih varijanti prototipova gena *EBNA-1* i različitih tipova EBV-a na temelju raznolikosti gena *EBNA-2*, statistički značajne vrijednosti označene su crvenom bojom. Provedenom analizom pokazano je prototip P-thr značajno češće pojavljuje u kombinaciji s tipom 1 s adicijom Leu na mjestu aminokiseline 212, dok P-ala češće dolazi uz ostale tipove ($p < 0,0001$).

	<i>EBNA-1</i> prototip	
EBV tip (<i>EBNA-2</i>)	P-ala (N=30)	P-thr (N=70)
Tip 1 (N=29)	20	9
Tip 1 sa Leu (N=66)	7	59
Tip 2 (N=5)	3	2
p-vrijednost	p<0,0001	

Tablica 31. Statističkom analizom provedenom pomoću Fisherovog egzaktnog testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih varijanti prototipova gena *EBNA-1* i podtipova gena *BLLF1*. Provedenom analizom nije pokazana statistički značajna vrijednost ($p > 0,05$).

	<i>EBNA-1</i> prototip	
<i>BLLF1</i> podtip	P-ala (N=30)	P-thr (N=70)
<i>BLLF1-a</i> (N=95)	28	67
<i>BLLF1-b</i> (N=5)	2	3
p-vrijednost	p= 0,6194	

Tablica 32. Statističkom analizom provedenom pomoću Fisherovog egzaktnog testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih varijanti prototipova gena *EBNA-1* i varijanti promotora Zp. Provedenom analizom pokazano je da se prototip P-thr značajno češće pojavljuje u kombinaciji s prototipom Zp-P promotora Zp, dok se prototip P-ala značajno češće pojavljuje u kombinaciji s varijantom promotora Zp-V3 ($p=0,0002$).

	<i>EBNA-1</i> prototip	
Zp varijanta	P-ala (N=30)	P-thr (N=70)
Zp-P (N=84)	18	66
Zp-V3 (N=16)	12	4
p-vrijednost	p=0,0002	

4.4.3 Gen *EBNA-2*

Genotipizacijom EBV-a na temelju raznolikosti gena *EBNA-2* dobiven je tip 1, tip 1 s adicijom Leu i tip 2. Zastupljenost ova 3 genotipa uz varijante preostalih analiziranih gena statistički je ispitana Fisherovim egzaktnim testom odnosno Hi-kvadrat testom za varijante gena *LMP-1* (Tablica 30.), za prototipove gena *EBNA-1* (Tablica 31.), za podtipove gena *BLLF1* (Tablica 32.) te varijante promotora Zp (Tablica 33.). Statističkom analizom provedenom pomoću Hi-kvadrat testa pokazano je da se tip 1 značajno češće pojavljuje u kombinaciji s varijantom North Carolina gena *LMP-1* ($p=0.0009$) te da se tip 1 sa adicijom Leu značajno češće pojavljuje u kombinaciji s divljim tipom gena *LMP-1* (B95-8) ($p=0.0007$) (Tablica 30.). Također, statistički značajna vrijednost ($p<0.0001$, OR: 14.8889, CI(95%): 3.7909-58.4760) dobivena je za prototip gena *EBNA-1* P-ala koji se značajno češće pojavljuje u kombinaciji s tipom 1 bez adicije Leu, te za prototip P-thr koji značajno češće dolazi u kombinaciji s tipom 1 s adicijom Leu (Tablica 31.) u usporedbi s ostalim tipovima EBV-a. Tipovi EBV-a na temelju raznolikosti gena *EBNA-2* nisu pokazali statistički značajnu vrijednost odnosno da se značajno češće pojavljuju u kombinaciji s određenim podtipovima gena *BLLF1* ($p>0.05$) (Tablica 32.) kao ni uz različite varijante promotora Zp ($p>0.05$) (Tablica 33.).

Tablica 33. Statističkom analizom provedenom pomoću Hi-kvadrat testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih tipova EBV-a na temelju raznolikosti gena *EBNA-2* i varijanti gena *LMP-1*. Provedenom analizom pokazano je da se tip 1 značajno češće pojavljuje u kombinaciji s varijantom North Carolina gena *LMP-1* ($p=0,0009$) te da se tip 1 sa adicijom Leu značajno češće pojavljuje u kombinaciji s divljim tipom gena *LMP-1* (B95-8) ($p=0,0007$), statistički značajne vrijednosti označene su crvenom bojom.

	EBV tip (<i>EBNA-2</i>)					
<i>LMP-1</i> varijanta	Tip 1 (N=29)	Ostali	Tip 1 sa Leu	Ostali	Tip 2	Ostali
B95-8 (N=31)	4	27	26	5	1	30
China1 (N=17)	4	13	12	5	1	16
North Carolina (N=15)	11	4	3	12	1	14
Med- (N=9)	2	7	7	2	0	9
Rekombinanti (N=28)	8	20	18	10	2	26
p-vrijednost	$p=0,0009$		$p=0,0007$		$p=0,8997$	

Tablica 34. Statističkom analizom provedenom pomoću Hi-kvadrat testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih tipova EBV-a na temelju raznolikosti gena *EBNA-2* i prototipova gena *EBNA-1*. Provedenom analizom pokazano je da se prototip gena *EBNA-1* P-ala značajno češće pojavljuje u kombinaciji s tipom 1 ($p<0,0001$) te da se prototip P-thr značajno češće pojavljuje u kombinaciji s tipom 1 s adicijom Leu. Statistički značajne vrijednosti označene su crvenom bojom.

	EBV tip (<i>EBNA-2</i>)					
<i>EBNA-1</i>	Tip 1 (N=29)	Ostali	Tip 1 sa Leu	Ostali	Tip 2	Ostali
P-ala (N=30)	20	10	7	23	3	27
P-thr (N=70)	9	61	59	11	2	68
p-vrijednost	$p<0,0001$		$p<0,0001$		$p=0,1577$	

Tablica 35. Statističkom analizom provedenom pomoću Fisherovog egzaktnog testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih tipova EBV-a na temelju raznolikosti gena *EBNA-2* i različitih podtipova gena *BLLF1*. Provedenom analizom nije dobivena statistički značajna vrijednost ($p>0,05$).

	EBV tip (<i>EBNA-2</i>)					
<i>BLLF1</i> podtip	Tip 1 (N=29)	Ostali	Tip 1 sa Leu	Ostali	Tip 2	Ostali
<i>BLLF1-a</i> (N=95)	28	67	63	32	4	91
<i>BLLF1-b</i> (N=5)	1	4	3	2	1	4
p-vrijednost	p=0,6523		p=0,7720		p=0,1573	

Tablica 36. Statističkom analizom provedenom pomoću Fisherovog egzaktnog testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih tipova EBV-a na temelju raznolikosti gena *EBNA-2* i različitih varijanti promotora Zp. Provedenom analizom nije dobivena statistički značajna vrijednost ($p>0,05$).

	EBV tip (<i>EBNA-2</i>)					
Zp varijanta	Tip 1 (N=29)	Ostali	Tip 1 sa Leu (N=66)	Ostali	Tip 2 (N=5)	Ostali
Zp-P (N=84)	20	64	62	22	2	82
Zp-V3 (N=16)	9	7	4	12	3	13
p-vrijednost	p=0.0123		p=0.0007		p=0.0193	

4.4.4 Gen *BLLF1*

Analizom sekvencija gena *BLLF1* dobiveni su podtipovi *BLLF1*-a i *BLLF1*-b. Statističkom analizom prethodno provedena Fisherovim egzaktnim testom ispitano je pojavljuju li se prototipov gena *EBNA-1* značajno češće u kombinaciji s određenim podtipovima gena *BLLF1* (Tablica 28.) što odgovara rezultatu statističke analize kojom je ispitano pojavljuju li se podtipova gena *BLLF1* značajno češće u kombinaciji s određenim prototipovima gena *EBNA-1*, te stoga ovaj test nije ponavljan. Rezultat ove statističke analize nije bio značajan odnosno podtipovi gena *BLLF1* nisu značajno češći uz određene prototipove gena *EBNA-1*. Također, statističkom analizom kojom je ispitano pojavljuju li se podtipovi gena *BLLF1* značajno češće u kombinaciji s različitim varijantama gena *LMP-1* (Tablica 34.), gena *EBNA-2* (Tablica 35.) i promotora *Zp* (Tablica 36.), nije dobivena statistički značajna vrijednost ($p > 0,05$).

Tablica 37. Statističkom analizom provedenom pomoću Hi-kvadrat testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih podtipova gena *BLLF1* i različitih varijanti gena *LMP-1*. Provedenom analizom nije dobivena statistički značajna vrijednost ($p > 0,05$).

<i>LMP-1</i> varijanta	<i>BLLF1</i> podtip	
	<i>BLLF1</i> -a (N=95)	<i>BLLF1</i> -b (N=5)
B95-8 (N=31)	31	0
China1 (N=17)	16	1
North Carolina (N=15)	15	0
Med- (N=9)	8	1
Rekombinanti (N=28)	25	3
p-vrijednost	p=0.2790	

Tablica 38. Statističkom analizom provedenom pomoću Hi-kvadrat testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih podtipova gena *BLLF1* i različitih tipova EBV-a na temelju raznolikosti gena *EBNA-2*. Provedenom analizom nije dobivena statistički značajna vrijednost ($p > 0.05$).

	<i>BLLF1</i> podtip	
EBV tip (<i>EBNA-2</i>)	<i>BLLF1-a</i> (N=95)	<i>BLLF1-b</i> (N=5)
Tip 1 (N=29)	28	1
Tip 1 sa Leu (N=66)	63	3
Tip 2 (N=5)	4	1
p-vrijednost	p=0,2803	

Tablica 39. Statističkom analizom provedenom pomoću Fisherovog egzaktnog testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih podtipova gena *BLLF1* i različitih varijanti promotora Zp. Provedenom analizom nije dobivena statistički značajna vrijednost ($p > 0,05$).

	<i>BLLF1</i> podtip	
Zp varijanta	<i>BLLF1-a</i> (N=95)	<i>BLLF1-b</i> (N=5)
Zp-P (N=84)	80	4
Zp-V3 (N=16)	15	1
p-vrijednost	p=0,8030	

4.4.5 Promotor Zp

Analizom sekvencija promotora Zp dobiven je prototip Zp-P i varijanta Zp-V3. Prethodna statistička analiza provedena Fisherovim egzaktnim testom kojom je ispitano pojavljuju li se određeni prototipovi gena *EBNA-1* značajno češće u kombinaciji s određenim varijantama promotora Zp (Tablica 29.) jednaka je rezultatu statističke analize kojom je ispitano pojavljuju li se varijante promotora Zp značajno češće uz određene prototipove gena *EBNA-1*, te stoga ovaj test nije ponavljan. Provedenim testom dobivena je statistički značajna vrijednost ($p=0.0002$) koja pokazuje da prototip Zp-P češće dolazi uz prototip P-thr gena *EBNA-1*, dok varijanta promotora Zp-V3 češće dolazi uz prototip P-ala. Statistička analiza prethodno provedena Fisherovim egzaktnim testom kojom je ispitano pojavljuju li se podtipovi gena *BLLF1* značajno češće u kombinaciji s određenim varijantama promotora Zp (Tablica 36.), jednaka je rezultatu statističke analize kojom je ispitano dolaze li varijanti promotora Zp značajno češće u kombinaciji s određenim podtipovima gena *BLLF1*, te stoga ovaj test također nije ponavljan. Provedenim testom nije dobivena statistički značajna vrijednost ($p>0,05$). Također, analizom kojom je ispitano pojavljuju li se varijante promotora Zp značajno češće u kombinaciji s varijantama gena *LMP-1* nije dobivena statistički značajna vrijednost ($p>0,05$) (Tablica 37.). Statističkom analizom kojom je ispitano pojavljuju li se varijante promotora Zp značajno češće u kombinaciji s određenim varijantama tipovima EBV-a na temelju raznolikosti gena *EBNA-2*, pokazala je da se prototip Zp-P značajno češće pojavljuje u kombinaciji s tipom 1 s adicijom Leu, dok se varijanta Zp-V3 značajno češće pojavljuje u kombinaciji s ostalim tipovima ($p=0,0002$) (Tablica 38.).

Tablica 37. Statističkom analizom provedenom pomoću Hi-kvadrat testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih varijanti promotora Zp da i varijanti gena *LMP-1*. Provedenom analizom nije dobivena statistički značajna vrijednost ($p > 0,05$).

	Zp varijanta	
<i>LMP-1</i> varijanta	Zp-P (N=84)	Zp-V3 (N=16)
B95-8 (N=31)	27	4
China1 (N=17)	15	2
North Carolina (N=15)	9	6
Med- (N=9)	9	0
Rekombinanti (N=28)	24	4
p-vrijednost	p=0,0704	

Tablica 38. Statističkom analizom provedenom pomoću Hi-kvadrat testa ispitana je statistička značajnost povezanosti između različitih varijanti promotora Zp i različitih tipova EBV-a na temelju raznolikosti gena *EBNA-2*. Provedenom analizom pokazano je da se prototip Zp-P značajno češće pojavljuje u kombinaciji s tipom 1 s adicijom Leu, dok se varijanta Zp-V3 značajno češće pojavljuje u kombinaciji s ostalim tipovima ($p = 0,0002$).

	Zp varijanta	
EBV tip (<i>EBNA-2</i>)	Zp-P (N=84)	Zp-V3 (N=16)
Tip 1 (N=29)	20	9
Tip 1 sa Leu (N=66)	62	4
Tip 2 (N=5)	2	3
p-vrijednost	p=0,0002	

5. Rasprava

5.1 Gen *LMP-1*

U ovom istraživanju analizirana je molekularna raznolikost virusa EBV u djece s IM koja je pokazala karakterističnu zastupljenost pojedinih *LMP-1* varijanti i tipova rekombinanata. U ispitanika iz Hrvatske koji su bili uključeni u ovo istraživanje, analiza *LMP-1* varijanti pokazala je najveću zastupljenost divljeg tipa gena *LMP-1* koji je identičan genu u soju B95-8 prema analizi mjesta 20 aminokiselina. Ovi su rezultati u skladu s očekivanjima jer je istraživanje Banko i sur. (2012) koje je provedeno na području Srbije, geografskoj regiji bliskoj području Hrvatske, također pokazalo visoku prevalenciju divljeg tipa gena *LMP-1* (32,1%) u 30 odraslih osoba s IM i 16 osoba s NPC-om (Banko i sur., 2012). Međutim, drugo istraživanje koje su na području Srbije također su proveli Banko i sur. (2016) u 128 bolesnika s IM pokazalo je drugačiji rezultat tj. da je najzastupljenija varijanta gena *LMP-1* bila China1 (36,4%) što upućuje na zaključak da su rezultati opsežnijeg drugog istraživanja pouzdaniji (Banko i sur., 2016). Rezultati istraživanja Banko i sur. (2016) u određenoj su mjeri slični rezultatima ovog istraživanja provedenog u Hrvatskoj. Naime, u ovom su istraživanju detektirane četiri identične *LMP-1* varijante tj. China1, North Carolina, Med- i divlji tip B95-8 koje su dokazane i u istraživanju na području Srbije, no zastupljenost pojedinih varijanti bila je značajno različita. Najčešća varijanta gena *LMP-1* u ovom istraživanju bila je divlji tip B95-8 (31,0%). Osnovna razlika u rezultatima analize molekularne raznolikosti EBV-a u IM u ova dva istraživanja povezana je s detekcijom velikog broja rekombinanti (28,0%) u Hrvatskoj koje u istraživanju iz Srbije uopće nisu detektirane.

Divlji tip, B95-8, prevladavao je i u području Rusije prilikom istraživanja raznolikosti gena *LMP-1* provedenom u djece s dijagnozom IM (N=69), kao i u EBV-pozitivne zdrave djece (N=32) (Popkova i Utkin, 2022). Istraživanje koje su proveli Popkova i sur. (2023) dokazalo je prisutnost gotovo identičnih varijanti gena *LMP-1* koje su otkrivene u Hrvatskoj tj. B95-8, China1, Med-, North Carolina, no u ispitanika iz Rusije dokazana je i varijanta China2 (Popkova i Utkin, 2022). Međutim, istraživanje Popkova i sur. (2023) nije pokazalo prisutnost rekombinanata koji u istraživanju koje je provedeno u Hrvatskoj čine čak 28% analiziranih sekvencija i najčešće su nakon divljeg tipa B95-8 (31%). Prethodno istraživanje raznolikosti gena *LMP-1* na području Hrvatske koje su proveli Židovec Lepej i sur. (2023) u 73 djece s IM također je pokazalo najveću zastupljenost divljeg tipa gena *LMP-1* (32,6%), dok je postotak

rekombinanata iznosio 16,4% (Židovec Lepej i sur., 2023). Druge prisutne varijante u ovom istraživanju bile su China1, Med i North Carolina, pri čemu je većina sekvencija određenih kao Med pripadala Med-, odnosno varijanti bez delecije 30 pb. Visoka prevalencija divljeg tipa gena *LMP-1* pokazana je i u još jednom prethodnom istraživanju molekularna karakterizacije EBV-a koju su proveli Begić i sur. (2022) na području Hrvatske u ispitanika s klasičnim Hodgkinovim limfomom pri čemu je 48% sekvencija gena *LMP-1* određeno kao divlji tip B95-8, dok je druga najčešća varijanta bila Med+, prisutna u 26,0% sekvencija (Begić i sur., 2022). Zanimljivo je istaknuti da su sve varijante određene kao Med u istraživanju Begić i sur. (2022) na modelu klasičnog Hodgkinovog limfoma bile s delecijom 30 pb dok su sve Med varijante u ovom istraživanju na modelu IM bile bez delecije. Na temelju dobivenih podataka, kao i rezultata prethodnih istraživanja, možemo pretpostaviti da je varijanta Med- vezana uz IM, odnosno varijanta Med+ uz maligne bolesti povezane s EBV infekcijom. Također, istraživanje koje su proveli Begić i sur. (2022) u osoba koje su oboljele od Hodgkinova limfoma dokazalo je i prisutnost rekombinanata u 6,5% uzoraka. Unatoč tome što su na tumorima detektirane u znatno manjem postotku, aminokiselinske promjene koje odgovaraju dvjema ili više različitih varijanti nisu karakteristične samo za IM unutar ovog regionalnog područja. Prisutstvo velikog postotka rekombinanata (28,0%) upućuje na prethodnu izmjenu dijela gena između dviju različitih varijanti te naši rezultati upućuju da se rekombinacija najčešće događala između varijante China1 i divljeg tipa B95-8, te između varijante Med- odnosno divljeg tipa B95-8 sa dijelom gena koji sadrži aminokiselinu 212 odnosno polimorfizam na aminokiselini 212 koji prema Edwards i sur. (1999.) pripada nekoliko različitih varijanti: China1, China2 i Alaskan. Unutar gena *LMP-1* prisutne su već prethodno spomenute repetitivne regije duljine 33 pb čija prisutnost povećava šansu za homolognu rekombinaciju između dviju varijanti gena. Naime, aminokiselina 212 prisutna je na samom početku C-terminalnog kraja gena *LMP-1* te je udaljena od repetitivne regije prisutne unutar koordinata 168400-168555 definiranim prema prvim karakterizacijama gena *LMP-1* koje su opisali Hu i sur. (1991) (Hu i sur., 1991). Mogući razlog prisutnosti jednog polimorfizma, odnosno smislene mutacije u velikom broju rekombinanata (35,7%), je slučajna mutacija koja je uzrokovala promjenu aminokiseline jednaku promjeni karakteriziranoj prilikom determinacije varijanti. Međutim, mala je vjerojatnost da je prilikom nastanka SNP-a u svim uzorcima nastala jednaka aminokiselinska promjena. Također, prilikom analize sekvencija gena *LMP-1* nisu primijećena mjesta s učestalim SNP-ovima koja bi prilikom preklapanja s referentnom sekvencijom bila vidljiva kao područje s velikim brojem promjena, stoga promjenu aminokiseline 212 nije moguće objasniti

zbog prirode položaja aminokiseline u varijabilnom području. Također, prilikom preklapanja dobivenih sekvencija gena *LMP-1* s referentnom sekvencijom divljeg tipa B95-8 nisu otkrivene druge učestale aminokiselinske promjene unutar gena *LMP-1* koje bi, prisutne u većem broju sekvencija, mogle biti karakterizirane kao novodokumentirana aminokiselinska promjena, poput promjene na aminokiselini Arg594Lys kod gena *EBNA-1* ili adicije Leu212 kod sekvencija gena *EBNA-2*. S druge strane, prisutnost repetitivnih regija na samom kraju gena *LMP-1* može objasniti prisutnost aminokiselinske promjene na mjestu aminokiseline 352 kod 7,1% rekombinanata, koji su po svim aminokiselinskim mjestima jednaki divljem tipu, osim na poziciji 352 gdje njihova aminokiselinska promjena odgovara varijanti North Carolina. Ovakvi rekombinanti vjerojatno su posljedica jedne homologne rekombinacije gdje se izmjena gena između dviju različitih varijanti dogodila kao posljedica repetitivnih ili homolognih regija. Visok postotak rekombinanata ukazuje na veliku učestalost rekombinacije između različitih varijanti, prilikom čega je u kombinaciji najčešće prisutan divlji tip gena B95-8.

Sekvenciranjem nove generacije potvrđeni su rezultati Sangerova sekvenciranja. Cilj sekvenciranja nove generacije bio je provjeriti prisutnost zasebnih varijanti koje čine određen rekombinant te time potvrditi koinfekciju s različitim varijantama EBV-a unutar jednog izolata. U sekvencijama dobivenim sekvenciranjem nove generacije zabilježeni su jednaki polimorfizmi pronađeni u sekvencijama dobivenima Sangerovim sekvenciranjem čime je potvrđena prisutnost rekombinanata. Međutim, rezultati su pokazali isključivo prisutstvo rekombinanata u svim analiziranim uzorcima te nisu bili zabilježeni drugačiji polimorfizmi ili različite promjene na istom aminokiselinskom mjestu od interesa. Dobivenim rezultatom možemo pretpostaviti da su različite varijante EBV-a prethodno rekombinirale te se održale kao samostalne stabilne varijante. Također, dobivenim rezultatom dokazano je da koinfekcija nije prisutna u analiziranim uzorcima u dovoljno velikom postotku da bi bila zabilježena kao značajna na dobivenim rezultatima sekvenciranja nove generacije. S obzirom da je dokazana prisutnost 8 različitih kombinacija varijanti unutar rekombinanata, ne možemo tvrditi da je jedan od njih karakteristična za naše analizirane uzorke odnosno ovo regionalno područje. Rezultati ovog istraživanja ujedno su i prvi rezultati primjene sekvenciranja nove generacije u analizi rekombinanata i koinfekcija EBV-a u IM.

U ovom istraživanju sam filogenetskom analizom pokazala visok stupanj raznolikosti sekvencija gena *LMP-1*. Naime, sekvencije dobivene u ovom istraživanju nisu bile u potpunosti potpuno identične referentnoj sekvenciji B95-8 odnosno referentnim sekvencijama za

pojedine virusne varijante. Varijante gena *LMP-1* nalaze se na filogenetskom stablu uz referentnu sekvenciju određene varijante, no s njom ne tvore jedinstvenu grupu već su od referentnih sekvencija udaljene s jednom ili više manjih grupa i podgrupa. Naime, sekvencije određene kao divlji tip B95-8 grupirale su se na dio filogenetskog stabla koje se nalazi uz referentnu sekvenciju B95-8. Sukladno tome, sekvencije određene kao varijante China1, Med- i North Carolina grupirale su se uz prikladne referentne sekvencije, iako s njima nisu u potpunosti identične. Sekvencije koje odstupaju od grupe s pripadajućim referentnim sekvencijama su sekvencije EBVCROLMP-1_19 i EBVCROLMP-1_21 određene kao North Carolina prilikom čega se sekvencija broj 19 grupirala uz referentne sekvencije Med, dok se sekvencija broj 21 grupirala uz China1. Ova neočekivana grupacija moguća je posljedica brojnih drugih SNP-ova, delecija i adicija prisutnih uzduž gena *LMP-1* koje su time pridodale većoj razlici u usporedbi s referentnom sekvencijom. Također, na stablu je vidljivo da su sekvencije određene kao rekombinanti raspoređene unutar cijelog stabla sukladno određenim varijantama. Primjerice, sekvencija EBVCROLMP-1_105 određena je kao B95-8 s aminokiselinskom promjenom na poziciji 212 te je kao takva grupirana uz referentnu sekvenciju B95-8, dok je sekvencija EBVCROLMP-1_85, određena kao rekombinant China1/B95-8, grupirana bliže referentnoj sekvenciji China1 u usporedbi s referentnom sekvencijom B95-8, s obzirom da sadrži više polimorfizama koji pripadaju varijanti China1. Pozicija sekvencija na filogenetskom stablu pokazuje točnost njihova određivanja varijanti kao i veliku raznolikost. Naime, sve sekvencije se u određenoj mjeri razlikuju od pripadajuće referentne sekvencije za određenu varijantu odnosno divlji tip, ali i dalje nisu međusobno dovoljno uniforme da bi skupa tvorile zasebnu skupinu koju bismo mogli okarakterizirati kao posebnu varijantu sekvencija sa područja Hrvatske. Velik broj grupa i podgrupa prisutnih na stablu upućuje na brzu evoluciju ovog gena te provedeno sekvenciranje nove generacije kojim je dokazano odsutstvo zasebnih varijanti koje čine rekombinante, upućuje na to da su novonastale varijante stabilne i održive.

Statističkom analizom pokazano je da određene varijante gena *LMP-1* značajno češće dolaze u kombinaciji s određenim varijantama odnosno tipovima gena *EBNA-1*, *EBNA-2* i promotora Zp. Gen *LMP-1* statističkom je analizom pokazao povezanost sa svim analiziranim genima osim gena *BLLF1*. Gen *BLLF1* jedini je analiziran gen koji nije eksprimiran prilikom latentne faze već je vezan za primarnu infekciju i ulazak virusa u stanicu domaćina. Geni *EBNA-1* i *EBNA-2* eksprimirani su prilikom različitih tipova latencije, dok je promotor Zp odgovoran za

prijelaz iz latentne u litičku fazu replikacijskog ciklusa. S obzirom da se EBV unutar analiziranih izolata nalazio u litičkoj fazi koja je uzrokovala jak protuupalni odgovor domaćina, moguće je da je ova statistička značajnost između varijanti vezana za IM, odnosno za gene latentne faze. Naime, podaci o različitoj stopi infekcije s obzirom na različite varijante gena EBV-a zasad nisu dostupni, te stoga ne možemo tvrditi da navedene varijante manje doprinose latenciji odnosno potiču litičku fazu ciklusa. Prethodna istraživanja o povezanosti varijanti različitih gena EBV-a su oskudna. Istraživanje koje su u Kini proveli Ai i sur. (2012) pokazalo je da 80% uzoraka određenih kao EBV tip 1 dolazi uz varijantu China1 gena *LMP-1* te varijantu V-val gena *EBNA-1* (Ai i sur., 2012). Naime, prisutnost varijante V-val nije zabilježena među našim sekvencijama gena *EBNA-1*, dok je varijanta China1 gena *LMP-1* također vezana za tip 1, ali s dodatkom Leu na poziciji 212. Prethodna istraživanja povezanosti varijanti gena *LMP-1* s raznolikošću drugih gena, dosad nije evidentirana na ovom kao ni na geografski bliskom području.

5.2 Gen *EBNA-1*

Varijante i podvarijante gena *EBNA-1* analizirane u ovom istraživanju pripale su definiranim prototipovima ovog gena pri čemu druge varijante gena nisu otkrivene. Prototipovi P-ala i P-thr određeni su na temelju raznolikosti aminokiseline na poziciji 487 pri čemu je većina sekvencija određena kao P-thr s manjim udjelom P-ala koji je ujedno i prototip prisutan unutar divljeg tipa B95-8.

Banko i sur. (2016) su u istraživanju na području Srbije u ispitanika s IM pokazali slične rezultate tj. dokazali su 2 prototipa *EBNA-1*, slično kao i u ovom istraživanju provedenom u Hrvatskoj, pri čemu je 61,3% uzoraka pripalo P-thr, a ostatak prototipu P-ala (Banko i sur., 2016). Opsežno istraživanje raznolikosti EBV koje su Correia i sur. (2017) proveli na 254 zdrava ispitanika različite nacionalnosti i geografske lokacije, pokazala je prisutnost oba prototipa, kao i varijante V-val i V-leu (Correia i sur., 2017). Naime, ovaj rad pokazao je povezanost različitih varijanti gena s geografskom lokacijom ispitanika te je na taj način otkriveno da je varijanta V-val najčešće prisutna u području Azije i Indonezije, dok je varijanta V-leu najzastupljenija u području Afrike. Na području Europe najčešći virusni prototip bio je P-thr dok je P-ala bio rjeđe zastupljen što je u skladu s našim rezultatima u ispitanika s IM. Visoku prevalenciju virusne varijante V-val u bolesnika s NPC-om po prvi puta su dokazali

Zhang i sur. (2004) na području Kine (Zhang i sur., 2019). Također, dokazano je da varijanta V-val, u usporedbi s prototipom P-ala, iskazuje snažniji onkogeni potencijal tj. malignu transformaciju stanica NPC-a *in vitro* inducirajući ekspresiju vlastitih gena te gena stanice domaćina (Mai i sur., 2008). Na istom geografskom području Sun i sur. (2015) proveli su istraživanje molekularne raznolikost EBV-a u bolesnika s limfomima i također dokazali visoku prevalenciju varijante V-val koju su detektirali u čak 68,2% ispitanika (Sun i sur., 2015). Stoga je izostanak detekcije V-val varijante u skupini bolesnika s akutnom simptomatskom EBV infekcijom tj. IM u našem istraživanju očekivan.

Podvarijante odnosno varijante prototipa gena *EBNA-1* analizirane u ovom istraživanju bile su sukladne s dokazanim varijantama gena u bolesnika s IM. Sve sekvencije određene kao P-ala dodatno su svrstane u varijantu prototipa P-ala', dok su gotovo sve sekvencije određene kao P-thr dodatno svrstano u varijantu prototipa P-thr' uz samo dvije sekvencije koji su određene kao varijante prototipa P-thr''. Banko i sur. (2019) analizirali su raznolikost gena *EBNA-1* na području Srbije u skupini od 87 bolesnika oboljelih od NPC-a, IM ili liječenih postupkom transplantacije (Banko i sur., 2019). Rezultati su pokazali da je u 59,0% uzoraka dokazan prototip P-thr, dok su druge detektirane varijacije aminokiseline 487 bile prototip P-ala te varijante V-leu i V-ala koje nisu dokazane u IM bolesnika iz Hrvatske. Uz to, Banko i sur. (2019) su detektirali novu podvarijantu P-Thr-sv-5 koja je na filogenetskom stablu tvorila grupu sa sekvencijama izoliranim iz pacijenata s dijagnozom NPC-a, što čini dodatnu razliku s rezultatima varijanti prototipa iz Hrvatske (Banko i sur., 2019). Supstitucija Arg594Lys koja je u našem istraživanju otkrivena u svim sekvencijama gena *EBNA-1*, prethodno je opisana isključivo u oboljelih od malignih bolesti koje su povezane s EBV-om. Primjerice, Sun i sur. (2015) su u bolesnika s EBV-pozitivnim limfomima pokazali konsenzus promjene unutar sekvencija *EBNA-1* među kojima je detektirana i supstitucija Arg594Lys (Sun i sur., 2015). Također, Thuan i sur. (2019.) su promjenu Arg594Lys detektirali u uzorcima bioptata NPC-a kao dio polimorfizama za prototip P-ala te uz varijantu V-val (Thuan i sur., 2019). U recentnom istraživanju molekularne raznolikosti EBV-a na području Hrvatske po prvi puta sam otkrila ovu promjenu i u bolesnika s IM (Rozman i sur., 2025).

Rezultati filogenetske analize C-terminalnog kraja gena *EBNA-1* pokazali su postojanje dviju grupa, P-ala i P-thr pri čemu su unutar grupe P-ala vidljive dvije podgrupe od 3 sekvencije koje su sa svojom grupacijom dodatno odvojene od referentne sekvencije B95-8. Rezultati pokazuju da su sekvencije prototipa P-ala u genu *EBNA-1* iznimno slične s divljim tipom B95-8.

Sekvencije određene kao prototip P-ala su se, u skladu s očekivanjima, na filogenetskom stablu grupirale udaljenije od sekvencije B95-8. Ove sekvencije sadrže veći broj podgrupa od sekvencija prototipa P-ala pri čemu jednu zasebnu podgrupu čine sekvencije EBVCROMLMP-1_19 i EBVCOLMP-1_31, koje su ujedno i jedine sekvencije određene kao varijanta prototipa P-thr". Dobivene sekvencije C-terminalog kraja gena *EBNA-1* ne pokazuju veliku evolucijsku udaljenost od sekvencije divljeg tipa B95-8. Na filogenetskom stablu uspješno je prikazano odvajanje sekvencija prototipa P-ala i prototipa P-thr, no na stablu nije formirana zasebna odvojena grupa s većim dijelom sekvencija kojom bismo mogli definirati novu varijantu specifičnu za IM unutar ovog geografskog područja.

Statističkom analizom dobiveni su rezultati koji pokazuju da gen *EBNA-1* značajno češće dolazi u kombinaciji s određenim varijantama gena *LMP-1* i promotora *Zp*, te s različitim tipovima EBV-a na temelju raznolikosti gena *EBNA-2*, dok povezanost nije uočena kod gena *BLLF1*. Među analiziranim genima, gen *EBNA-1* najbliži je promotoru *Zp*, dok je najudaljeniji od gena *LMP-1* prema poziciji u genomu, prilikom čega s oba gena dijeli statističku značajnost u kombinaciji određenih varijanti. Također, analizirani geni prepisuju se s različite strane DNA te kombinacije njihovih varijanti ne možemo objasniti njihovom blizinom na genomu, što bi povećalo vjerojatnost da se skupa naslijede prilikom rekombinacije. Repetitivne regije koje povećavaju mogućnost rekombinacije, raspršene su uzduž genoma te se, i bez njihova prisustva, može dogoditi rekombinacija različitih DNA. Kao i kod rezultata statističke analize gena *LMP-1*, moguće objašnjenje je i što su svi geni, kao i promotor *Zp*, s kojima su prototipovi gena *EBNA-1* pokazali statističku značajnost, eksprimirani prilikom latencije. S druge strane, neki od dobivenih rezultata mogu biti objašnjeni statističkom vjerojatnošću. Primjerice, prototip P-thr se statistički značajno češće pojavljuje u kombinaciji s divljim tipom gena *LMP-1* B95-8. Istovremeno, P-thr pokazao se kao najčešći prototip u našem istraživanju kao i u prethodno spomenutim ostalim istraživanjima na bliskom geografskom području, dok je najčešća varijanta gena *LMP-1* među analiziranim sekvencijama bila jednaka divljem tipu B95-8 (31,0%) (Banko i sur., 2012; Banko i sur., 2016). Stoga, statistička značajnost kombinacije ovih dviju varijanti nije neočekivana.

5.3 Gen *EBNA-2*

Analizom fragmenta gena *EBNA-2* karakterističnog za EBV tip 1 odnosno tip 2, gotovo sve sekvencije analizirane u ovom istraživanju određene su tipu 1 dok je samo 5,0% sekvencija određeno kao tip 2, pri čemu koinfekcije nisu dokazane. U preliminarnom istraživanju na 72 bolesnika s IM iz Hrvatske samo je 1,4% sekvencija određeno kao tip 2 EBV-a (Rozman i sur., 2025). U istraživanju raznolikosti EBV-a u bolesnika s Hodgkinovim limfomom iz Hrvatske Begić i sur. (2022) su pokazali da, temeljem sekvencije gena *EBNA-3C*, nema tipa 2 EBV-a (Begić i sur., 2022). Također, u istraživanju na području Srbije koje su proveli Banko i sur. (2012.), 90,7% sekvencija gena *EBNA-2* u ispitanika s IM određeno je kao EBV tip 1 (Banko i sur., 2012). Dodatno istraživanje koje su Banko i sur. (2016) proveli 4 godine kasnije s ciljem određivanja raznolikosti EBV-a u bolesnika s IM, također je, na temelju raznolikosti gena *EBNA-2*, potvrdilo visoku prevalenciju genotipa 1 (96,9%) (Banko i sur., 2016). U istraživanju Solomay i sur. (2022) također je dokazana dominacija tipa 1 EBV-a u čak 96,7% zdravih ispitanika iz Rusije genotipizacijom gena *EBNA-2* (Solomay i sur., 2022). Tip 1 EBV-a globalno je dominantan dok je tip 2 značajno je manje zastupljen na području Europe i Amerike (Solomay i sur., 2022). Istraživanje na području Meksika koje su proveli Palma i sur. (2013) pokazalo je visoku prevalenciju EBV tipa 2 u bolesnika s EBV-pozitivnim limfomima (Palma i sur., 2013). U navedenom istraživanju, EBV tip 2 dokazan u 47,6% pedijatrijskih ispitanika dok je kombinacija oba tipa dokazana u čak 19,0% pedijatrijskih ispitanika (Palma i sur., 2013). U odraslih ispitanika dominirao je tip 2 EBV-a koji je dokazan u čak 69,2% bolesnika (Palma i sur., 2013).

U našem istraživanju, u sekvencijama određenima kao tip 1 čak 69,5% sekvencija imalo je adiciju Leu na mjestu 212. Ova adicija nije evidentirana u prethodnim istraživanjima raznolikosti EBV-a u ispitanika s IM odnosno osoba oboljelih od malignih bolesti. Naime, pozicija 212 nije dio genotipizacije EBV-a te stoga vjerojatno nije zabilježena odnosno analizirana u prethodnim analizama tipova EBV-a. U genu *EBNA-2* EBV-a tipa 2, nisu primijećene dodatne mutacije prisutne u većem dijelu sekvencija tipa 2, poput Leu212 kod tipa 1. Dodatne mutacije unutar tipa 2 do sada nisu objavljene u literaturi. Filogenetskom analizom prikazano je odvajanje sekvencija određenih kao EBV tip 1 odnosno tip 2. Sekvencije određene kao tip 1 (29,0%) koje nemaju adiciju Leu, poput referentnih sekvencija tipa 1 soja B95-8, grupirane su bliže referentnoj sekvenciji B95-8, za razliku od 66,0% sekvencija koje su sadržavale adiciju Leu na mjestu 212. Naime, sekvencije sa Leu212 sadrže nekoliko manjih

grupacija te se unutar ovih sekvencija nalazi i 5 sekvencija određenih kao tip 2 koje su grupirane uz prikladnu referentnu sekvenciju tipa 2. Sve sekvencije određene kao tip 1, s i bez adicije Leu vrlo su slične referentnoj sekvenciji B95-8 s obzirom da je vrijednost duljine grane kod prvog odvajanja sekvencija od referentne sekvencije tipa 1 vrijednosti 0. Ova vrijednost označava duljinu grane manju od 0,001 što pokazuje da se dobivene sekvencije tipa 1 minimalno razlikuju od gena *EBNA-2* referentne sekvencije za ovaj tip. Također, ovakav iznos duljine grane zabilježen je i pri samom odvajanju sekvencija tipa 1 bez Leu212 i s adicijom Leu212 što je očekivan rezultat s obzirom da se radi o adiciji jedne aminokiseline. Veće razlike u genu odnosno veće duljine grana primijećene su unutar samih grupa i podgrupa sekvencija bez Leu212, kao i unutar sekvencija sa adicijom Leu212, što je moguća posljedica SNP-ova. Grupacija sekvencija s adicijom Leu daje mogućnost imenovanja Leu212 kao, zasad, jedinstvene karakteristike unutar IM na ovom geografskom području. Iz dobivenog filogenetskog stabla vidljivo je da je gen *EBNA-2* evolucijski očuvan unutar tipa 1 tj. da sekvencije dobivene u analizi ispitanika s IM iz Hrvatske ne pokazuju veliku evolucijsku udaljenost s referentnom sekvencijom tipa 1. Sekvencije određene kao tip 2 uspješno su grupirane uz referentnu sekvenciju EBV-a tipa 2 na temelju raznolikosti gena *EBNA-2*, preuzete iz soja AG876, odnosno referentnog soja za EBV tip 2, što potvrđuje točnost njihove genotipizacije. Evolucijska očuvanost vidljiva je i kod sekvencija određenih kao EBV tip 2 gdje je zabilježena vrijednost 0 kod većine nodova koje dijele s referentnom sekvencijom tipa 2.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da tip 1 EBV-a kao i tip 1 s adicijom Leu212 statistički značajno češće dolaze u kombinaciji s određenim varijantama gena *LMP-1* i prototipovima gena *EBNA-1*, dok nije uočena povezanost s različitim varijantama gena *BLLF1* i varijantama promotora Zp. Dosadašnja istraživanja koja su analizirala molekularnu karakterizaciju EBV-a nisu uključivala odvajanje tipa 1 sa i bez Leu212 odnosno naznaku ove razlike u genu prilikom statističke obrade te nije moguće usporediti naše rezultate s literaturnim podatcima. Provedena statistička analiza uključila je ovu razliku između tipova 1 te je dobiven statistički značajan rezultat korelacije EBV-a tipa 1 s Leu212 i divljeg tipa gena *LMP-1* pri čemu se obje varijante pojavljuju u najvećem postotku te je stoga ovaj rezultat očekivan odnosno možemo ga objasniti kao statistički najvjerojatniji. S druge strane, tip 1 bez Leu212 pokazao je statističku značajnost u kombinaciji s varijantom North Carolina gena *LMP-1*. Zanimljivo, tip 1 bez Leu 212 koji je, u usporedbi s tipom 1 sa Leu 212, sličniji referentnoj sekvenciji B95-8 te dolazi u manjem postotku, pokazao je statističku značajnost s istom varijantom gena *LMP-1* poput prototipa P-

ala koji, u usporedbi s prototipom P-thr, također dolazi u manjem postotku te je sličniji referentnoj sekvenciji B95-8. Također, analizom statističke značajnosti tipova EBV-a i dobivenih prototipa gena *EBNA-1*, dobiveno je da tip 1 najčešće dolazi uz prototip P-ala, dok tip 1 sa Leu212 najčešće dolazi uz prototip P-thr. Dobiveni rezultati upućuju na mogućnost da su prototip P-ala gena *EBNA-1*, varijanta North Carolina gena *LMP-1*, kao i tip 1 bez Leu 212 određen na temelju raznolikosti gena *EBNA-2*, usko vezani odnosno najčešće se pojavljuju skupa. Tip 2 nije pokazao statističku značajnost s drugim analiziranim genima te s promotorom Zp što je očekivan rezultat s obzirom da se ovaj tip pojavljuje u samo 5% sekvencija čime je njegova brojnost nedostatna za valjanu statističku analizu.

5.4 Gen *BLLF1*

U ovom istraživanju je prema klasifikaciji gena *BLLF1* opisanoj Luo i sur. (2011), čak 95,0% analiziranih sekvencija dobivenih analizom EBV-a u ispitanika s IM pripalo je podtipu *BLLF1*-a, 5,0% podtipu *BLLF1*-b, dok je jedna sekvencija na mjestu aminokiseline 201 imala prisutan Lys. Rezultat dobiven u ovom istraživanju sukladan je s rezultatima dobivenima u istraživanju koje su proveli Luo i sur. (2011) u kojem su opisani podtipovi definirani po prvi puta (Luo i sur., 2012). Naime, u navedenom istraživanju prikupljeni uzorci uključivali su EBV izoliran iz bioptata tumorskog tkiva bolesnika s NPC-om, GC-om, te uzorke ispirka ždrijela zdravih ispitanika pri čemu su dobiveni rezultati pokazali visoku prevalenciju podtipa *BLLF1*-a koji je bio dokazan u 83,0% uzoraka, dok je u 17,0% uzoraka dokazan podtip *BLLF1*-b. S druge strane, aminokiselina Lys dokazana na poziciji 201 kod jedne naše sekvencije nije detektirana u prijašnjim radovima. Također, velika razlika između istraživanja koje su proveli Luo i sur. (2011) i našeg istraživanja raznolikosti gena *BLLF1* u bolesnika s IM primijećena je u dodatnoj podjeli *BLLF1*-a na Q201 i V252. Luo i sur. (2011) su u bolesnika s NPC-om i GC-om dokazali da većina sekvencija sadrži polimorfizam V252, dok je kod uzoraka ispirka ždrijela zdravih osoba pronađen jednak udio oba polimorfizma (Luo i sur., 2012). S druge strane, u ovom istraživanju na IM, 8 sekvencija određenih kao podtip *BLLF1*-a nije moglo biti dodatno podijeljeno na Q201 i V252, s obzirom da su na ova 2 definirana mjesta sekvencije bile jednake B95-8, dok je preostalih 87 sekvencija određenih kao *BLLF1*-a dodatno podijeljeno na Q201. Polimorfizam V252 koji je prevladavao u malignim bolestima povezanim s EBV-om te je dokazan i kod zdravih EBV-pozitivnih osoba, nije bio prisutan ni u jednom analiziranom uzorku ispitanika s EBV-om uzrokovanom IM. Velika razlika primijećena je i u analizi C-terminalnog

kraja pri čemu su Luo i sur. (2011), na temelju filogenetske analize C-terminalnog kraja, definirali dvije varijante, 9P i 9D. S druge strane, u ovom istraživanju provedenom u ispitanika s IM je u 100,0% sekvencija dokazana varijanta 9P odnosno varijanta C-terminalnog gena *BLLF1* bez delecije aminokiselina 676-684. Naime, gen *BLLF1*, prethodno radu koje su proveli Luo i sur. (2011), djelomično je karakteriziran u radu kojeg su prethodno objavili Kawaguchi i sur. (2009) prilikom čega su primijećeni karakteristični uzorci polimorfizama iz različitih staničnih sojeva EBV-a koji nisu B95-8 kao i iz GC-a te uzoraka ispirka ždrijela zdravih ispitanika (Kawaguchi i sur., 2009). Istraživanja varijanti gena *BLLF1* iznimno su oskudna s obzirom da se većina istraživanja fokusira na njegov proteinski produkt gp350/220 koji se smatra glavnim kandidatom za EBV cjepivo. Podaci o varijabilnosti gena *BLLF1* u bolesnika s IM nisu bili poznati te ih stoga nije moguće usporediti s rezultatima ovog istraživanja. Dobiveni rezultati pokazali su iznimno visoku očuvanost gena *BLLF1* odnosno veliku sličnost s referentnom sekvencijom B95-8 bez dodatnih delecija, adicija i polimorfizama. Gen *BLLF1* sadrži manje promjena odnosno mogućnosti svrstavanja u definirane podtipove, za razliku od ostalih analiziranih gena *LMP-1*, *EBNA-1* i *EBNA-2*.

Filogenetsko stablo gena *BLLF1* uspješno je razdvojilo podtip *BLLF1*-a od podtipa *BLLF1*-b prilikom čega je samo jedna sekvencija, EBVCROBLLF1_70, grupirana uz sekvencije *BLLF1*-b, dok je istovremeno definirana kao *BLLF1*-a s malom duljinom grane koja dijeli njihova 2 noda (0,0004). S obzirom da je duljina gena *BLLF1* 2721 pb, mogućnost nastanka SNP-ova je velika te može utjecati na grupaciju sekvencija na filogenetskom stablu. Sekvencija EBVCROBLLF1_70 koja je određena kao *BLLF1*-a vjerojatno je pripala grupaciji *BLLF1*-b zbog dodatnih genskih varijacija koje je dijelila s preostalim 5 sekvencija određenih kao *BLLF1*-b. Sekvencije koje su, prema dodatnoj podjeli na Q201 i V252, bile jednake divljem tipu, uspješno su se grupirale bliže referentnoj sekvenciji B95-8. Unatoč tome što rezultati determinacije podtipova *BLLF1* ne pokazuju veliku raznolikost, filogenetsko stablo gena *BLLF1* pokazuje iznimno velik broj grananja grupa i podgrupa. Formirane podgrupe najčešće sadrže vrijednosti duljine grana različite od 0 što dodatno naglašava postojeću razliku između ovih sekvencija. Ovakva raznolikost može se objasniti samom duljinom gena prilikom čega već malen broj razlika unutar 2721 pb može odvojiti dvije sekvencije određene kao isti podtip. Također, vrijednost duljine grane 0,0020 prilikom prvog odvajanja od referentne sekvencije B95-8, ukazuje na malu evolucijsku udaljenost s divljim tipom gena, unatoč velikoj varijabilnosti prisutnoj među samim sekvencijama.

Statističkom analizom nije dobiven značajan rezultat u kombinacijama s prethodno analiziranim genima odnosno varijantama promotora Zp. Međutim, ovaj rezultat nije očekivan. Naime, istraživanje koje su proveli Luo i sur. (2011) pokazalo je statistički značajnu povezanost između podtipa gena *BLLF1* i tipa EBV-a određenog na temelju raznolikosti gena *EBNA-3C* (Luo i sur., 2012). Luo i sur. (2011) su pokazali da podtip *BLLF1*-a najčešće dolazi u kombinaciji s EBV tipom 1, odnosno da podtip *BLLF1*-b značajno češće dolazi u kombinaciji s EBV tipom 2 prilikom čega je 100 sekvencija koje su određene kao EBV tip 1 istovremeno određeno kao podtip *BLLF1*-a te je 100,0% sekvencija EBV tipa 2 određeno kao podtip *BLLF1*-b (Luo i sur., 2012). Drugačiji rezultati statističke analize mogu biti objašnjeni drugačijom skupinom ispitanika ali i drugačijom geografskom lokacijom. Naime, istraživanje koje su proveli Luo i sur. (2011) nije obuhvatio ispitanike s IM te su uzorci prikupljeni sa područja Kine a ne iz Europe. S obzirom da povezanost između polimorfizama gena *BLLF1* i sposobnosti infekcije stanice domaćina nije istražena, ne možemo zaključiti da li je uspješnost infekcije ovisna o polimorfizmima gena *BLLF1*. Mogući uzrok male razlike između dobivenih 100 sekvencija gena *BLLF1* i referentne sekvencije B95-8 može biti i činjenica da je referentni soj B95-8 također izoliran iz pacijenta s dijagnozom IM, dok se istovremeno ne odnosi na gene latencije poput ostalih analiziranih gena.

5.5 Promotor Zp

U ovom istraživanju analiza sekvencija promotora Zp pokazala je dominantnost prototipa Zp-P te varijantu Zp-V3 prisutnu u 16,0% sekvencija. Raznolikost ovog promotora do sada nije bila istražena u Hrvatskoj i na bliskom geografskom području te je njegova genska varijabilnost najviše istražena na modelima malignih bolesti povezanih s EBV-om. U istraživanju koje su proveli Bristol i sur. (2018) dokazano je da varijanta Zp-V3 stvara vezno mjesto za stanični jezgri faktor aktiviranih limfocita T 1 (NFATc1, od eng. *Nuclear Factor of Activated T-cells 1*) čime potiče veću aktivnost promotora Zp-V3, u usporedbi s promotorom Zp-P, kao i litičku reaktivaciju (Bristol i sur., 2018). Međutim, sve sekvencije dobivene u radu potječu iz IM čime znamo da je litička faza bila prisutna u svim uzorcima prije izolacije EBV-a te ne postoji razlika u fazi replikacijskog ciklusa među uzorcima koji imaju varijantu Zp-V3 ili prototip Zp-P. U istraživanju koje su proveli Correia i sur. (2017) dokazano je da je varijanta promotora Zp-V3 unutar NPC-a, na uzorcima prikupljenima s područja Kine i Indonezije, prisutna u znatno većoj mjeri u usporedbi s prototipom Zp-P. Istovremeno, prototip Zp-P je, u istom istraživanju, bio

zastupljeniji među zdravim ispitanicima (Correia i sur., 2017). S ciljem objašnjena pojave Zp-V3 polimorfizma unutar IM, bit će potrebno provesti sekvenciranje promotora Zp u bolesnika s IM iz područja Europe kao i sekvenciranje promotora Zp u osoba oboljelih od malignih bolesti kako bismo mogli zaključiti jesu li postojeće promjene posljedica vrste uzorka ili geografske lokacije. Također, analiza hematolotoških parametara ispitanika s IM kod kojih su prisutne različite varijante promotora Zp, mogla bi otkriti eventualni utjecaj varijante Zp-V3 na jačinu imunološke reakcije.

Filogenetsko stablo promotora Zp prikazuje da su dobivene sekvencije gotovo jednake, odnosno jedine dvije vrijednosti duljine grana koje su određene kao veće od 0 nalaze se na mjestu razdvajanja varijanti Zp-P i Zp-V3. Prikazane sekvencije promotora Zp, za razliku od prethodno analiziranih gena, ne tvore manje podgrupe na filogenetskom stablu te se jedina prisutna podgrupa sastoji od dvije sekvencije koje pripadaju varijanti Zp-V3 i nalaze se na samom razdvajanju između prototipa i varijante. Unutar promotora Zp nisu dokazani novi polimorfizmi te se na filogenetskom stablu nije odvojila zasebna grupa koja bi predstavljala varijantu različitu od Zp-V3 i prototipa Zp-P. S obzirom na udaljenost sekvencija od referentne sekvencije B95-8 te na vrijednosti duljine grana, možemo zaključiti da je promotor Zp visoko očuvan među sekvencijama dobivenima iz IM unutar područja Hrvatske u usporedbi s divljim tipom B95-8.

Statističkom analizom dobiveni su rezultati koji se razlikuju od rezultata dobivenih u prethodnim istraživanjima. Istraživanje Correia i sur. (2017) pokazalo je da je varijanta Zp-V3 prisutna u svim uzorcima koji su pripadali EBV tipu 2 kao i u 50% uzoraka koji su bili određeni kao EBV tip 1 (Correia i sur., 2017). Kaymaz i sur. (2020) predložili su objašnjenje da je Zp-V3 originalno proizašao iz EBV-a tipa 2 te se njegova prisutnost unutar genoma EBV-a tipa 1 može objasniti ancestralnom homolognom rekombinacijom (Kaymaz i sur., 2020). U našem istraživanju samo su 3 sekvencije određene kao Zp-V3 istovremeno pripale EBV tipu 2. Naime, statističkom analizom pokazano je da prototip Zp-P najčešće dolazi uz EBV tip 1 s Leu212, dok Zp-V3 značajno češće dolazi uz druge definirane tipove EBV-a, tip 2 i tip 1 s Leu212. Gen *EBNA-1* drugi je gen s kojim je promotor Zp pokazao statističku značajnost prilikom čega je pokazano da oba prototipa, P-ala i P-thr, češće dolaze uz varijantu Zp-P. Promotor Zp potiče transkripciju litičkog gena *BZLF-1* odnosno nije eksprimiran prilikom latencije, dok su geni *EBNA-1* i *EBNA-2*, s kojima je promotor pokazao statistički značajnu vrijednost, vezani za faze latencije. Zanimljivo, nije dobivena statistički značajnost vrijednost između varijanti promotora

Zp i podtipova gena *BLLF1*, koji je također vezan za litički ciklus. Stoga, možemo pretpostaviti da je prikazana statistička značajnost neovisna o fazi replikacijskog ciklusa u kojima se geni eksprimiraju. S druge strane, istraživanje koje bi uključivalo sposobnost uspostavljanja latencije odnosno litičke reaktivacije ovisno o različitim kombinacijama gena koje statistički značajno dolaze skupa, dalo bi odgovor o utjecaju varijanti i njihovih kombinacija na uspješnost infekcije i uspostavljanja IM.

6. Zaključak

1. Bioinformatička i filogenetska analiza sekvencije gena *LMP-1* EBV-a u ispitanika s IM iz Hrvatske pokazala je visoku razinu varijabilnosti ovog gena,
2. Najčešća dokazana varijanta gena *LMP-1* bila je jednaka genu soja B95-8 čime je potvrđena hipoteza ovog istraživanja.
3. U istraživanju je dokazan visok postotak rekombinanata više varijanti gena *LMP-1* metodama Sangerovog sekvenciranja i sekvenciranja nove generacije, dok koinfekcije nisu dokazane. Metoda sekvenciranja nove generacije omogućuje detaljnu analizu arhitekture virusne populacije te adekvatnu karakterizaciju rekombinanti i koinfekcija u ovom istraživačkom modelu.
4. Ovim istraživanjem dokazano je da određene varijante gena *LMP-1* značajno češće dolaze u kombinaciji s pojedinim prototipovima gena *EBNA-1*, tipovima EBV-a određenim na temelju raznolikosti gena *EBNA-2* te uz određene varijante promotora Zp što predstavlja znanstveni temelj za buduća istraživanja utjecaja kombinacija varijanti na biološka obilježja infekcije EBV-om *in vivo*.
5. Filogenetskom analizom gena *EBNA-1* dokazano je da većina sekvencija pripada prototipu P-thr čime je opovrgnut dio hipoteze ovog istraživanja koji se odnosi na dominantnost divljeg tipa P-ala.
6. U svim sekvencijama *EBNA-1* prvi je puta dokazana promjena aminokiseline Arg u Lys na mjestu 594 koja ne pripada aminokiselinskim promjenama determinacije prototipa i varijanti gena *EBNA-1* na modelu akutne infekcije EBV-om tj. u IM.
7. Statističkom analizom dokazano je da prototipovi gena *EBNA-1* značajno češće dolaze u kombinaciji s pojedinim varijantama gena *LMP-1*, tipovima EBV-a i varijantama promotora Zp što ukazuje na potrebu dodatnih istraživanja povezanosti prisutnosti dokazanih kombinacija i ekspresije ovih gena.
8. Tip 1 EBV-a najčešći je u ispitanika s IM iz Hrvatske što je u skladu s prethodnim istraživanjima u ovom geografskom području, čime je dokazana hipoteza ovog istraživanja. Također zaključujemo da je pojava tipa 2 EBV-a iznimno rijetka u Hrvatskoj no da su potrebna dodatna prospektivna istraživanja epidemiologije tipa 2 ovog virusa.

9. U ovom je istraživanju po prvi puta otkrivena adicija na mjestu aminokiseline 212 u genu *EBNA-2* koja je prisutna u većini analiziranih sekvencija EBV tipa 1 što pokazuje na potrebu dodatnih istraživanja polimorfizama ovog gena u IM u ovom geografskom području.

10. Različiti tipovi EBV-a određeni na temelju raznolikosti gena *EBNA-2* značajno češće dolaze u kombinaciji s pojedinim varijantama prototipovima drugih analiziranih gena eksprimiranih u latentnoj fazi replikacijskog ciklusa EBV-a.

11. U ovom prvom istraživanju raznolikosti gena *BLLF1* u IM pokazan je iznimno visoki stupanj molekularne homogenosti pri čemu dominira podtip *BLLF1*-a s polimorfizmom Q201. Obzirom na to da gen *BLLF1* kodira sintezu proteina gp350 koji je neophodan za infekciju ciljnih stanica te predstavlja važnu odrednicu virusnog tropizma, homogenost ovog gena nije očekivan rezultat te su potrebna dodatna istraživanja na drugim modelima EBV infekcije. Referentni soj genoma B95-8 izoliran je iz IM te stoga možemo pretpostaviti moguću povezanost između odsutstva aminokiselinskih promjena u proteinu gp350 eksprimiranog u litičkoj fazi i razvoja akutne infekcije,

12. Analiza raznolikosti promotora Zp pokazala je najveću učestalost prototipa Zp-P čime je potvrđena hipoteza ovog istraživanja.

13. Obzirom na to da je u ovom istraživanju dokazana i varijanta Zp-V3 koja pospješuje litičku reaktivaciju, potrebno je dodatno istražiti povezanost varijabilnosti promotora Zp s opsegom imunosne reakcije na EBV u IM.

14. Obrazac statistički značajne povezanosti prototipa Zp-P i varijanti Zp-V3 s varijabilnošću drugih analiziranih gena EBV-a u IM pokazala je karakterističan obrazac što ukazuje na potrebu dodatnih istraživanja u ovom području.

7. Popis literature

- Abbott, R.J., Pachnio, A., Pedroza-Pacheco, I., Leese, A.M., Begum, J., Long, H.M., Croom-Carter, D., Stacey, A., Moss, P.A.H., Hislop, A.D., Borrow, P., Rickinson, A.B., Bell, A.I., 2017. Asymptomatic Primary Infection with Epstein-Barr Virus: Observations on Young Adult Cases. *J. Virol.* 91, e00382-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00382-17>
- Abou Harb, M., Meckes, D.G., Sun, L., 2023. Epstein-Barr virus LMP1 enhances levels of large extracellular vesicle-associated PD-L1. *J. Virol.* 97, e00219-23. <https://doi.org/10.1128/jvi.00219-23>
- Ai, J., Xie, Z., Liu, C., Huang, Z., Xu, J., 2012. Analysis of EBNA-1 and LMP-1 variants in diseases associated with EBV infection in Chinese children. *Virol. J.* 9, 13. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-13>
- Alanazi, A.E., Alhumaidy, A.A., Almutairi, H., Awadalla, M.E., Alkathiri, A., Alarjani, M., Aldawsari, M.A., Maniah, K., Alahmadi, R.M., Alanazi, B.S., Eifan, S., Alosaimi, B., 2024. Evolutionary analysis of LMP-1 genetic diversity in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: Bioinformatic insights into oncogenic potential. *Infect. Genet. Evol.* 120, 105586. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2024.105586>
- Albanese, M., Tagawa, T., Hammerschmidt, W., 2022. Strategies of Epstein-Barr virus to evade innate antiviral immunity of its human host. *Front. Microbiol.* 13, 955603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.955603>
- Aubry, V., Mure, F., Mariamé, B., Deschamps, T., Wyrwicz, L.S., Manet, E., Gruffat, H., 2014. Epstein-Barr Virus Late Gene Transcription Depends on the Assembly of a Virus-Specific Preinitiation Complex. *J. Virol.* 88, 12825–12838. <https://doi.org/10.1128/JVI.02139-14>
- Ayee, R., Ofori, M.E., Wright, E., Quaye, O., 2020. Epstein Barr Virus Associated Lymphomas and Epithelia Cancers in Humans. *J. Cancer* 11, 1737–1750. <https://doi.org/10.7150/jca.37282>
- Banko, A., Lazarevic, I., Cupic, M., Stevanovic, G., Boricic, I., Jovanovic, T., 2012. Carboxy-terminal sequence variation of LMP1 gene in Epstein–Barr-virus-associated mononucleosis and tumors from Serbian patients. *J. Med. Virol.* 84, 632–642. <https://doi.org/10.1002/jmv.23217>

- Banko, A., Lazarevic, I., Stevanovic, G., Cirkovic, A., Karalic, D., Cupic, M., Banko, B., Milovanovic, J., Jovanovic, T., 2016. Analysis of the Variability of Epstein-Barr Virus Genes in Infectious Mononucleosis: Investigation of the Potential Correlation with Biochemical Parameters of Hepatic Involvement. *J. Med. Biochem.* 35, 337–346. <https://doi.org/10.1515/jomb-2015-0021>
- Banko, A.V., Lazarevic, I.B., Karalic, D.Z., Djukic, V.B., Cupic, M.D., Stevanovic, G., Jovanovic, T.P., 2019. The sequence analysis of Epstein–Barr virus EBNA1 gene: could viral screening markers for nasopharyngeal carcinoma be identified? *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 208, 81–88. <https://doi.org/10.1007/s00430-018-0561-2>
- Bauer, M., Jasinski-Bergner, S., Mandelboim, O., Wickenhauser, C., Seliger, B., 2021. Epstein–Barr Virus—Associated Malignancies and Immune Escape: The Role of the Tumor Microenvironment and Tumor Cell Evasion Strategies. *Cancers* 13, 5189. <https://doi.org/10.3390/cancers13205189>
- Begić, V., Korać, P., Gašparov, S., Rozman, M., Simicic, P., Zidovec-Lepej, S., 2022. Molecular Characterisation of Epstein–Barr Virus in Classical Hodgkin Lymphoma. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 15635. <https://doi.org/10.3390/ijms232415635>
- Beisel, C., Tanner, J., Matsuo, T., Thorley-Lawson, D., Kezdy, F., Kieff, E., 1985. Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *J. Virol.* 54, 665–674. <https://doi.org/10.1128/jvi.54.3.665-674.1985>
- Berger, C., McQuain, C., Sullivan, J.L., Nadal, D., Quesenberry, P.J., Knecht, H., 1997. The 30-bp Deletion Variant of Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane Protein-1 Prevails in Acute Infectious Mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 176, 1370–1373. <https://doi.org/10.1086/517324>
- Binné, U.K., Amon, W., Farrell, P.J., 2002. Promoter Sequences Required for Reactivation of Epstein-Barr Virus from Latency. *J. Virol.* 76, 10282–10289. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.20.10282-10289.2002>
- 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, 296–301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>

- 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., Johannsen, E.C., Kenney, S.C., 2018. A cancer-associated Epstein-Barr virus BZLF1 promoter variant enhances lytic infection. *PLOS Pathog.* 14, e1007179. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007179>
- Bu, G.-L., Xie, C., Kang, Y.-F., Zeng, M.-S., Sun, C., 2022. How EBV Infects: The Tropism and Underlying Molecular Mechanism for Viral Infection. *Viruses* 14, 2372. <https://doi.org/10.3390/v14112372>
- Buschle, A., Hammerschmidt, W., 2020. Epigenetic lifestyle of Epstein-Barr virus. *Semin. Immunopathol.* 42, 131–142. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00792-2>
- Cai, J., Zhang, B., Li, Y., Zhu, W., Akihisa, T., Li, W., Kikuchi, T., Liu, W., Feng, F., Zhang, J., 2021. Prophylactic and Therapeutic EBV Vaccines: Major Scientific Obstacles, Historical Progress, and Future Direction. *Vaccines* 9, 1290. <https://doi.org/10.3390/vaccines9111290>
- Cancian, L., Bosshard, R., Lucchesi, W., Karstegl, C.E., Farrell, P.J., 2011. C-Terminal Region of EBNA-2 Determines the Superior Transforming Ability of Type 1 Epstein-Barr Virus by Enhanced Gene Regulation of LMP-1 and CXCR7. *PLoS Pathog.* 7, e1002164. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002164>
- Caruso, L.B., Guo, R., Keith, K., Madzo, J., Maestri, D., Boyle, S., Wasserman, J., Kossenkova, A., Gewurz, B.E., Tempera, I., 2022. The nuclear lamina binds the EBV genome during latency and regulates viral gene expression. *PLOS Pathog.* 18, e1010400. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010400>
- Caruso, L.B., Maestri, D., Tempera, I., 2023. Three-Dimensional Chromatin Structure of the EBV Genome: A Crucial Factor in Viral Infection. *Viruses* 15, 1088. <https://doi.org/10.3390/v15051088>
- Cheerathodi, M.R., Meckes, D.G., 2018. The Epstein–Barr Virus LMP1 Interactome: Biological Implications and Therapeutic Targets. *Future Virol.* 13, 863–887. <https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0120>
- Chen, J., Longnecker, R., 2019. Epithelial cell infection by Epstein–Barr virus. *FEMS Microbiol. Rev.* 43, 674–683. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz023>

- Cohen, J.I., Wang, F., Mannick, J., Kieff, E., 1989. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 9558–9562. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9558>
- Correia, S., Palser, A., Elgueta Karstegl, C., Middeldorp, J.M., Ramayanti, O., Cohen, J.I., Hildesheim, A., Fellner, M.D., Wiels, J., White, R.E., Kellam, P., Farrell, P.J., 2017. Natural Variation of Epstein-Barr Virus Genes, Proteins, and Primary MicroRNA. *J. Virol.* 91, e00375-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00375-17>
- Cui, X., Snapper, C.M., 2021. Epstein Barr Virus: Development of Vaccines and Immune Cell Therapy for EBV-Associated Diseases. *Front. Immunol.* 12, 734471. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734471>
- Damania, B., Kenney, S.C., Raab-Traub, N., 2022. Epstein-Barr virus: Biology and clinical disease. *Cell* 185, 3652–3670. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.08.026>
- Davis, A.M., Rapley, A., Dawson, C.W., Young, L.S., Morris, M.A., 2021. The EBV-Encoded Oncoprotein, LMP1, Recruits and Transforms Fibroblasts via an ERK-MAPK-Dependent Mechanism. *Pathogens* 10, 982. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080982>
- Deakyne, J.S., Malecka, K.A., Messick, T.E., Lieberman, P.M., 2017. Structural and Functional Basis for an EBNA1 Hexameric Ring in Epstein-Barr Virus Episome Maintenance. *J. Virol.* 91, e01046-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01046-17>
- Dheekollu, J., Malecka, K., Wiedmer, A., Delecluse, H.-J., Chiang, A.K.S., Altieri, D.C., Messick, T.E., Lieberman, P.M., 2017. Carcinoma-risk variant of EBNA1 deregulates Epstein-Barr Virus episomal latency. *Oncotarget* 8, 7248–7264. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14540>
- Dias, J.M., Santana, I.V.V., Da Silva, V.D., Carvalho, A.L., Arantes, L.M.R.B., 2022. Analysis of Epstein–Barr Virus (EBV) and PD-L1 Expression in Nasopharyngeal Carcinoma Patients in a Non-Endemic Region. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 11720. <https://doi.org/10.3390/ijms231911720>
- Dickerson, S.J., Xing, Y., Robinson, A.R., Seaman, W.T., Gruffat, H., Kenney, S.C., 2009. Methylation-Dependent Binding of the Epstein-Barr Virus BZLF1 Protein to Viral Promoters. *PLoS Pathog.* 5, e1000356. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000356>

- Dolan, A., Addison, C., Gatherer, D., Davison, A.J., McGeoch, D.J., 2006. The genome of Epstein–Barr virus type 2 strain AG876. *Virology* 350, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.015>
- Dunmire, S.K., Hogquist, K.A., Balfour, H.H., 2015. Infectious Mononucleosis, in: Münz, C. (Ed.), *Epstein Barr Virus Volume 1, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 211–240. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_9
- Edwards, R.H., Seillier-Moiseiwitsch, F., Raab-Traub, N., 1999. Signature Amino Acid Changes in Latent Membrane Protein 1 Distinguish Epstein–Barr Virus Strains. *Virology* 261, 79–95. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9855>
- Edwards, R.H., Sitki-Green, D., Moore, D.T., Raab-Traub, N., 2004. Potential Selection of LMP1 Variants in Nasopharyngeal Carcinoma. *J. Virol.* 78, 868–881. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.2.868-881.2004>
- Farrell, P.J., 2015. Epstein–Barr Virus Strain Variation, in: Münz, C. (Ed.), *Epstein Barr Virus Volume 1, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 45–69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_4
- Fassone, L., Bhatia, K., Gutierrez, M., Capello, D., Gloghini, A., Dolcetti, R., Vivenza, D., Ascoli, V., Coco, F., Pagani, L., Dotti, G., Rambaldi, A., Raphael, M., Tirelli, U., Saglio, G., Magrath, I., Carbone, A., Gaidano, G., 2000. Molecular profile of Epstein–Barr virus infection in HHV-8-positive primary effusion lymphoma. *Leukemia* 14, 271–277. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401651>
- Ferressini Gerpe, N.M., Vistarop, A.G., Moyano, A., De Matteo, E., Preciado, M.V., Chabay, P.A., 2020. Distinctive EBV infection characteristics in children from a developing country. *Int. J. Infect. Dis.* 93, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.044>
- Frappier, L., 2015. EBNA1, in: Münz, C. (Ed.), *Epstein Barr Virus Volume 2, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 3–34. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_1
- Friberg, A., Thumann, S., Hennig, J., Zou, P., Nössner, E., Ling, P.D., Sattler, M., Kempkes, B., 2015. The EBNA-2 N-Terminal Transactivation Domain Folds into a Dimeric Structure

- Required for Target Gene Activation. PLOS Pathog. 11, e1004910. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004910>
- Gantuz, M., Lorenzetti, M.A., Altcheh, J., De Matteo, E., Moscatelli, G., Moroni, S., Chabay, P.A., Preciado, M.V., 2013. LMP1 promoter sequence analysis in Epstein Barr virus pediatric infection reveals preferential circulation of B95.8 related variants in Argentina. Infect. Genet. Evol. 14, 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.025>
- Gatherer, D., Depledge, D.P., Hartley, C.A., Szpara, M.L., Vaz, P.K., Benkő, M., Brandt, C.R., Bryant, N.A., Dastjerdi, A., Doszpoly, A., Gompels, U.A., Inoue, N., Jarosinski, K.W., Kaul, R., Lacoste, V., Norberg, P., Origgi, F.C., Orton, R.J., Pellett, P.E., Schmid, D.S., Spatz, S.J., Stewart, J.P., Trimpert, J., Waltzek, T.B., Davison, A.J., 2021. ICTV Virus Taxonomy Profile: Herpesviridae 2021. J. Gen. Virol. 102. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001673>
- Gru, A.A., Haverkos, B.H., Freud, A.G., Hastings, J., Nowacki, N.B., Barrionuevo, C., Vigil, C.E., Rochford, R., Natkunam, Y., Baiocchi, R.A., Porcu, P., 2015. The Epstein-Barr Virus (EBV) in T Cell and NK Cell Lymphomas: Time for a Reassessment. Curr. Hematol. Malig. Rep. 10, 456–467. <https://doi.org/10.1007/s11899-015-0292-z>
- Gruffat, H., Marchione, R., Manet, E., 2016. Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key. Front. Microbiol. 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00869>
- Gruhne, B., Sompallae, R., Marescotti, D., Kamranvar, S.A., Gastaldello, S., Masucci, M.G., 2009. The Epstein–Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 2313–2318. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810619106>
- Guo, R., Gewurz, B.E., 2022. Epigenetic control of the Epstein-Barr lifecycle. Curr. Opin. Virol. 52, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.11.013>
- Gurtsevitch, V.E., Lubenskaya, A.K., Senyuta, N.B., Smirnova, K.V., 2024. Epstein–Barr virus (Orthoherpesviridae: *Lymphocryptovirus*) among Russian ethnic groups: Prevalence of EBV types (EBV-1 and EBV-2), *LMP1* gene variants and malignancies. Probl. Virol. 69, 56–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-214>

- Gutierrez, M.I., 2002. Discrete Alterations in the BZLF1 Promoter in Tumor and Non-Tumor-Associated Epstein-Barr Virus. *CancerSpectrum Knowl. Environ.* 94, 1757–1763. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.23.1757>
- Gutiérrez, M.I., Spangler, G., Kingma, D., Raffeld, M., Guerrero, I., Misad, O., Jaffe, E.S., Magrath, I.T., Bhatia, K., 1998. Epstein-Barr Virus in Nasal Lymphomas Contains Multiple Ongoing Mutations in the EBNA-1 Gene. *Blood* 92, 600–606. <https://doi.org/10.1182/blood.V92.2.600>
- Hadhri-Guiga, B., Khabir, A.-M., Mokdad-Gargouri, R., Ghorbel, A.-M., Drira, M., Daoud, J., Frikha, M., Jlidi, R., Gargouri, A., 2006. Various 30 and 69bp deletion variants of the Epstein-Barr virus LMP1 may arise by homologous recombination in nasopharyngeal carcinoma of Tunisian patients. *Virus Res.* 115, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.07.002>
- Hayman, I.R., Temple, R.M., Burgess, C.K., Ferguson, M., Liao, J., Meyers, C., Sample, C.E., 2023. New insight into Epstein-Barr virus infection using models of stratified epithelium. *PLOS Pathog.* 19, e1011040. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011040>
- Hedström, A.K., Huang, J., Michel, A., Butt, J., Brenner, N., Hillert, J., Waterboer, T., Kockum, I., Olsson, T., Alfredsson, L., 2020. High Levels of Epstein–Barr Virus Nuclear Antigen-1-Specific Antibodies and Infectious Mononucleosis Act Both Independently and Synergistically to Increase Multiple Sclerosis Risk. *Front. Neurol.* 10, 1368. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01368>
- Herrman, M., Mühe, J., Quink, C., Wang, F., 2016. Epstein-Barr Virus gp350 Can Functionally Replace the Rhesus Lymphocryptovirus Major Membrane Glycoprotein and Does Not Restrict Infection of Rhesus Macaques. *J. Virol.* 90, 1222–1230. <https://doi.org/10.1128/JVI.02531-15>
- Hu, H., Luo, M.-L., Desmedt, C., Nabavi, S., Yadegarynia, S., Hong, A., Konstantinopoulos, P.A., Gabrielson, E., Hines-Boykin, R., Pihan, G., Yuan, X., Sotiriou, C., Dittmer, D.P., Fingerroth, J.D., Wulf, G.M., 2016. Epstein–Barr Virus Infection of Mammary Epithelial Cells Promotes Malignant Transformation. *EBioMedicine* 9, 148–160. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.025>

- Hu, L.-F., Zabarovsky, E.R., Chen, F., Cao, S.-L., Ernberg, I., Klein, G., Winberg, G., 1991. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol.* 72, 2399–2409. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-10-2399>
- Huang, J., Zhang, Xiaolin, Nie, X., Zhang, Xuyuan, Wang, Y., Huang, L., Geng, X., Li, D., Zhang, L., Gao, G., Gao, P., 2024. Assembly and activation of EBV latent membrane protein 1. *Cell* 0. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.06.021>
- Huang, W., Bai, L., Tang, H., 2023. Epstein-Barr virus infection: the micro and macro worlds. *Virol. J.* 20, 220. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02187-9>
- Hudson, S., Bankier, T., Satchwell, C., Barrell, G., n.d. The Short Unique Region of the 895-8 Epstein-Barr Virus Genome.
- Hutt-Fletcher, L.M., 2015. EBV Glycoproteins: Where are we now? *Future Virol.* 10, 1155–1162. <https://doi.org/10.2217/fvl.15.80>
- Hutt-Fletcher, L.M., 2007. Epstein-Barr Virus Entry. *J. Virol.* 81, 7825–7832. <https://doi.org/10.1128/JVI.00445-07>
- Imajoh, M., Hashida, Y., Murakami, M., Maeda, A., Sato, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H., Daibata, M., 2012. Characterization of Epstein–Barr virus (EBV) BZLF1 gene promoter variants and comparison of cellular gene expression profiles in Japanese patients with infectious mononucleosis, chronic active EBV infection, and EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J. Med. Virol.* 84, 940–946. <https://doi.org/10.1002/jmv.23299>
- Indari, O., Ghosh, S., Bal, A.S., James, A., Garg, M., Mishra, A., Karmodiya, K., Jha, H.C., 2024. Awakening the sleeping giant: Epstein–Barr virus reactivation by biological agents. *Pathog. Dis.* 82, ftac002. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftac002>
- Jackman, W.T., Mann, K.A., Hoffmann, H.J., Spaete, R.R., 1999. Expression of Epstein–Barr virus gp350 as a single chain glycoprotein for an EBV subunit vaccine. *Vaccine* 17, 660–668. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00248-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00248-5)

- Jenkins, P.J., Binné, U.K., Farrell, P.J., 2000. Histone Acetylation and Reactivation of Epstein-Barr Virus from Latency. *J. Virol.* 74, 710–720. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.2.710-720.2000>
- Jin, Y., Xie, Z., Lu, G., Yang, S., Shen, K., 2010. Characterization of variants in the promoter of BZLF1 gene of EBV in nonmalignant EBV-associated diseases in Chinese children. *Virol. J.* 7, 92. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-92>
- Kawaguchi, A., Kanai, K., Satoh, Y., Touge, C., Nagata, K., Sairenji, T., Inoue, Y., 2009. The evolution of Epstein-Barr virus inferred from the conservation and mutation of the virus glycoprotein gp350/220 gene. *Virus Genes* 38, 215–223. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0323-0>
- Kaymaz, Y., Oduor, C.I., Aydemir, O., Luftig, M.A., Otieno, J.A., Ong’echa, J.M., Bailey, J.A., Moormann, A.M., 2020. Epstein-Barr Virus Genomes Reveal Population Structure and Type 1 Association with Endemic Burkitt Lymphoma. *J. Virol.* 94.
- Kieser, A., 2007. Signal transduction by the Epstein-Barr virus oncogene latent membrane protein 1 (LMP1). *Signal Transduct.* 7, 20–33. <https://doi.org/10.1002/sita.200600116>
- Kieser, A., Sterz, K.R., 2015. The Latent Membrane Protein 1 (LMP1), in: Münz, C. (Ed.), *Epstein Barr Virus Volume 2, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 119–149. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_4
- Kim, K.-D., Tanizawa, H., De Leo, A., Vladimirova, O., Kossenkova, A., Lu, F., Showe, L.C., Noma, K., Lieberman, P.M., 2020. Epigenetic specifications of host chromosome docking sites for latent Epstein-Barr virus. *Nat. Commun.* 11, 877. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14152-8>
- Kim, S.Y., Kim, J.-E., Won, J., Song, Y.-J., 2015. Characterization of the rapamycin-inducible EBV LMP1 activation system. *J. Microbiol.* 53, 732–738. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5455-z>
- Kong, I.Y., Giulino-Roth, L., 2024. Targeting latent viral infection in EBV-associated lymphomas. *Front. Immunol.* 15, 1342455. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1342455>

- Košćak Lukač, J., Baronica, K.B., Šućur, A., Sremec, J., Tomasović, S., Baronica, R., Kelava, T., Grčević, D., Kovačić, N., 2024. Serum Concentrations of Chemokines CCL20, CXCL8 and CXCL10 in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis and Their Association with Presence of Antibodies against Epstein–Barr Virus. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 8064. <https://doi.org/10.3390/ijms25158064>
- Kraus, R.J., Mirocha, S.J., Stephany, H.M., Puchalski, J.R., Mertz, J.E., 2001. Identification of a Novel Element Involved in Regulation of the Lytic Switch BZLF1 Gene Promoter of Epstein-Barr Virus. *J. Virol.* 75, 867–877. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.2.867-877.2001>
- Kwok, H., Tong, A.H.Y., Lin, C.H., Lok, S., Farrell, P.J., Kwong, D.L.W., Chiang, A.K.S., 2012. Genomic Sequencing and Comparative Analysis of Epstein-Barr Virus Genome Isolated from Primary Nasopharyngeal Carcinoma Biopsy. *PLoS ONE* 7, e36939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036939>
- Li, D., Bei, J., Mai, S., Xu, J., Chen, L., Zhang, R., Yu, X., Hong, M., Zeng, Y., Kang, T., 2009. The dominance of China 1 in the spectrum of Epstein–Barr virus strains from Cantonese patients with nasopharyngeal carcinoma. *J. Med. Virol.* 81, 1253–1260. <https://doi.org/10.1002/jmv.21503>
- Lorenzetti, M.A., Altchek, J., Moroni, S., Moscatelli, G., Chabay, P.A., Preciado, M.V., 2010. EBNA1 sequences in Argentinean pediatric acute and latent Epstein–Barr virus infection reflect circulation of novel South American variants. *J. Med. Virol.* 82, 1730–1738. <https://doi.org/10.1002/jmv.21871>
- Lu, Y., Qin, Z., Wang, J., Zheng, X., Lu, J., Zhang, X., Wei, L., Peng, Q., Zheng, Y., Ou, C., Ye, Q., Xiong, W., Li, G., Fu, Y., Yan, Q., Ma, J., 2017. Epstein-Barr Virus miR-BART6-3p Inhibits the RIG-I Pathway. *J. Innate Immun.* 9, 574–586. <https://doi.org/10.1159/000479749>
- Luo, B., Liu, M., Chao, Y., Wang, Y., Jing, Y., Sun, Z., 2012. Characterization of Epstein-Barr virus gp350/220 gene variants in virus isolates from gastric carcinoma and nasopharyngeal carcinoma. *Arch. Virol.* 157, 207–216. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1148-z>

- Mai, S.-J., Ooka, T., Li, D.-J., Zeng, M.-S., Yu, X.-J., Zhang, R.-H., Chen, S.-P., Zeng, Y.-X., n.d. Functional advantage of NPC-related V-val subtype of Epstein-Barr virus.
- Martini, M., Capello, D., Serraino, D., Navarra, A., Pierconti, F., Cenci, T., Gaidano, G., Larocca, L.M., 2007. Characterization of variants in the promoter of EBV gene BZLF1 in normal donors, HIV-positive patients and in AIDS-related lymphomas. *J. Infect.* 54, 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.04.015>
- McDonald, C., Karstegl, C.E., Kellam, P., Farrell, P.J., 2010. Regulation of the Epstein-Barr virus Zp promoter in B lymphocytes during reactivation from latency. *J. Gen. Virol.* 91, 622–629. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017277-0>
- McKenzie, J., El-Guindy, A., 2015. Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Reactivation, in: Münz, C. (Ed.), *Epstein Barr Virus Volume 2, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 237–261. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_8
- Mei, Y., Messick, T.E., Dheekollu, J., Kim, H.J., Molugu, S., Muñoz, L.J.C., Moiskeenkova-Bell, V., Murakami, K., Lieberman, P.M., 2022. Cryo-EM Structure and Functional Studies of EBNA1 Binding to the Family of Repeats and Dyad Symmetry Elements of Epstein-Barr Virus *oriP*. *J. Virol.* 96, e00949-22. <https://doi.org/10.1128/jvi.00949-22>
- Mendes, T.M., Oliveira, L.C.D., Yamamoto, L., Del Negro, G.M.B., Okay, T.S., 2008. Epstein-Barr virus nuclear antigen-2 detection and typing in immunocompromised children correlated with lymphoproliferative disorder biopsy findings. *Braz. J. Infect. Dis.* 12, 186–191. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000300005>
- Möhl, B.S., Chen, J., Sathiyamoorthy, K., Jardetzky, T.S., Longnecker, R., 2016. Structural and Mechanistic Insights into the Tropism of Epstein-Barr Virus. *Mol. Cells* 39, 286–291. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0066>
- Münz, C., 2019. Latency and lytic replication in Epstein–Barr virus-associated oncogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 691–700. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0249-7>
- Murata, T., 2023. Tegument proteins of Epstein-Barr virus: Diverse functions, complex networks, and oncogenesis. *Tumour Virus Res.* 15, 200260. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2023.200260>

- 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, 2344. <https://doi.org/10.3390/v13122344>
- Murray-Nerger, L.A., Lozano, C., Burton, E.M., Liao, Y., Ungerleider, N.A., Guo, R., Gewurz, B.E., 2024. The nucleic acid binding protein SFPQ represses EBV lytic reactivation by promoting histone H1 expression. *Nat. Commun.* 15, 4156. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48333-x>
- Nanbo, A., 2024. Current Insights into the Maturation of Epstein–Barr Virus Particles. *Microorganisms* 12, 806. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040806>
- Neves, M., Marinho-Dias, J., Ribeiro, J., Sousa, H., 2017. Epstein–Barr virus strains and variations: Geographic or disease-specific variants? *J. Med. Virol.* 89, 373–387. <https://doi.org/10.1002/jmv.24633>
- Novalic, Z., Van Rossen, T.M., 2016. Agents and Approaches for Lytic Induction Therapy of Epstein-Barr Virus Associated Malignancies. *Med. Chem.* 6. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000384>
- Nowalk, A., Green, M., 2016. Epstein-Barr Virus. *Microbiol. Spectr.* 4, 4.3.47. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0011-2015>
- Palma, I., Sánchez, A.E., Jiménez-Hernández, E., Alvarez-Rodríguez, F., Nava-Frias, M., Valencia-Mayoral, P., Salinas-Lara, C., Velazquez-Guadarrama, N., Portilla-Aguilar, J., Pena, R.Y., Ramos-Salazar, P., Contreras, A., Alfaro, A., Espinosa, A.M., Nájera, N., Gutierrez, G., Mejia-Arangure, J.M., Arellano-Galindo, J., 2013. Detection of Epstein-Barr Virus and Genotyping Based on EBNA2 Protein in Mexican Patients With Hodgkin Lymphoma: A Comparative Study in Children and Adults. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 13, 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2012.11.010>
- Peng, R.-J., Han, B.-W., Cai, Q.-Q., Zuo, X.-Y., Xia, T., Chen, J.-R., Feng, L.-N., Lim, J.Q., Chen, S.-W., Zeng, M.-S., Guo, Y.-M., Li, B., Xia, X.-J., Xia, Y., Laurensia, Y., Chia, B.K.H., Huang, H.-Q., Young, K.H., Lim, S.T., Ong, C.K., Zeng, Y.-X., Bei, J.-X., 2019. Genomic and transcriptomic landscapes of Epstein-Barr virus in extranodal natural killer T-cell lymphoma. *Leukemia* 33, 1451–1462. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0324-5>

- Popkova, M.I., Utkin, O.V., 2022. Genetic diversity of the Epstein–Barr virus: a modern view of the problem. *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 99, 93–108. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-228>
- Portes-Sentis, S., 1997. A particular DNA structure is required for the function of a cis-acting component of the Epstein-Barr virus OriLyt origin of replication. *Nucleic Acids Res.* 25, 1347–1354. <https://doi.org/10.1093/nar/25.7.1347>
- Price, A.M., Luftig, M.A., 2015. To Be or Not IIb: A Multi-Step Process for Epstein-Barr Virus Latency Establishment and Consequences for B Cell Tumorigenesis. *PLOS Pathog.* 11, e1004656. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004656>
- Rennekamp, A.J., Lieberman, P.M., 2011. Initiation of Epstein-Barr Virus Lytic Replication Requires Transcription and the Formation of a Stable RNA-DNA Hybrid Molecule at OriLyt. *J. Virol.* 85, 2837–2850. <https://doi.org/10.1128/JVI.02175-10>
- Romero-Masters, J.C., Huebner, S.M., Ohashi, M., Bristol, J.A., Benner, B.E., Barlow, E.A., Turk, G.L., Nelson, S.E., Baiu, D.C., Van Sciver, N., Ranheim, E.A., Gumperz, J., Sherer, N.M., Farrell, P.J., Johannsen, E.C., Kenney, S.C., 2020. B cells infected with Type 2 Epstein-Barr virus (EBV) have increased NFATc1/NFATc2 activity and enhanced lytic gene expression in comparison to Type 1 EBV infection. *PLOS Pathog.* 16, e1008365. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008365>
- Rozman, M., Korać, P., Jambrosic, K., Židovec Lepej, S., 2022. Progress in Prophylactic and Therapeutic EBV Vaccine Development Based on Molecular Characteristics of EBV Target Antigens. *Pathogens* 11, 864. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080864>
- Rozman, M., Prtorić, L., Šokota, A., Bodulić, K., Tešović, G., Židovec-Lepej, S., 2025. Previously unreported Arg594Lys in EBNA-1 and Leu212 in EBNA-2 among patients with EBV-associated infectious mononucleosis in Croatia. *Virology* 603, 110340. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110340>
- Salahuddin, S., Fath, E.K., Biel, N., Ray, A., Moss, C.R., Patel, A., Patel, S., Hilding, L., Varn, M., Ross, T., Cramble, W.T., Lowrey, A., Pagano, J.S., Shackelford, J., Bentz, G.L., 2019. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein-1 Induces the Expression of SUMO-1 and SUMO-2/3 in LMP1-positive Lymphomas and Cells. *Sci. Rep.* 9, 208. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36312-4>

- Santón, A., Cristóbal, E., Aparicio, M., Royuela, A., Villar, L.M., Álvarez-Cermeño, J.C., 2011. High frequency of co-infection by Epstein–Barr virus types 1 and 2 in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 17, 1295–1300. <https://doi.org/10.1177/1352458511411063>
- Sausen, D., Bhutta, M., Gallo, E., Dahari, H., Borenstein, R., 2021. Stress-Induced Epstein-Barr Virus Reactivation. *Biomolecules* 11, 1380. <https://doi.org/10.3390/biom11091380>
- Shechter, O., Sausen, D.G., Gallo, E.S., Dahari, H., Borenstein, R., 2022. Epstein–Barr Virus (EBV) Epithelial Associated Malignancies: Exploring Pathologies and Current Treatments. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 14389. <https://doi.org/10.3390/ijms232214389>
- Silva, J.D.M., Alves, C.E.D.C., Pontes, G.S., 2024. Epstein-Barr virus: the mastermind of immune chaos. *Front. Immunol.* 15, 1297994. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1297994>
- Skalsky, R.L., Cullen, B.R., 2015. EBV Noncoding RNAs, in: Münz, C. (Ed.), *Epstein Barr Virus Volume 2, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 181–217. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_6
- Sokal, E.M., Hoppenbrouwers, K., Vandermeulen, C., Moutschen, M., Léonard, P., Moreels, A., Haumont, M., Bollen, A., Smets, F., Denis, M., 2007. Recombinant gp350 Vaccine for Infectious Mononucleosis: A Phase 2, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Evaluate the Safety, Immunogenicity, and Efficacy of an Epstein-Barr Virus Vaccine in Healthy Young Adults. *J. Infect. Dis.* 196, 1749–1753. <https://doi.org/10.1086/523813>
- Solomay, T.V., Malakhova, M.V., Shitikov, E.A., Bespiatykh, D.A., Veselovsky, V.A., Semenenko, T.A., Smirnova, D.I., Gracheva, A.V., Fayzuloev, E.B., 2022. Epstein—Barr virus: evaluation of gp350 and EBNA2 gene variability. *Mol. Genet. Microbiol. Virol. Russ. Version* 40, 32. <https://doi.org/10.17116/molgen20224003132>
- Sullivan, K., Isabel, S., Khodai-Booran, N., Paton, T.A., Abdulnoor, M., Dipchand, A.I., Hébert, D., Ng, V.L., Allen, U.D., 2019. Epstein-Barr virus latent gene EBNA-1 genetic diversity among transplant patients compared with patients with infectious mononucleosis. *Clin. Transplant.* 33, e13504. <https://doi.org/10.1111/ctr.13504>

- Sun, L., Zhao, Z., Liu, S., Liu, X., Sun, Z., Luo, B., 2015. Sequence Variation Analysis of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Gene in the Virus Associated Lymphomas of Northern China. *PLOS ONE* 10, e0140529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140529>
- Taf*, M., Ib, C., I, B.-C., Bmr, C., Flp, R., Jlf, M., Ec, S.J., Rs, B., Yb, G., Rc, S., 2024. Genetic Identification of EBNA1 Gene in Cases of Infectious Mononucleosis (IM) in the Metropolitan Region of Belem, Para, Brazil. *J. Biomed. Res. Environ. Sci.* 5, 912–920. <https://doi.org/10.37871/jbres1971>
- Tattevin, P., Le Tulzo, Y., Minjolle, S., Person, A., Chapplain, J.M., Arvieux, C., Thomas, R., Michelet, C., 2006. Increasing Incidence of Severe Epstein-Barr Virus-Related Infectious Mononucleosis: Surveillance Study. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1873–1874. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1873-1874.2006>
- Teshome, S., Ahmed, E.H., Zealiyas, K., Abubeker, A., Tadesse, F., Weigel, C., Baiocchi, R.A., Abebe, T., 2023. Genotypes Distribution of Epstein–Barr Virus among Lymphoma Patients in Ethiopia. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 13891. <https://doi.org/10.3390/ijms241813891>
- Thuan, L., Kha, N., Minh, N., Thuy, L., 2019. Novel patterns of the Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA-1) V-Val subtype in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma from Vietnam. *Balk. J. Med. Genet.* 22, 61–68. <https://doi.org/10.2478/bjmg-2019-0011>
- Torne, A.S., Robertson, E.S., 2024. Epigenetic Mechanisms in Latent Epstein-Barr Virus Infection and Associated Cancers. *Cancers* 16, 991. <https://doi.org/10.3390/cancers16050991>
- Tzellos, S., Farrell, P., 2012. Epstein-Barr Virus Sequence Variation—Biology and Disease. *Pathogens* 1, 156–174. <https://doi.org/10.3390/pathogens1020156>
- Vince, A., Lepej, S.Ž., Kurelac, I., Baršić, B., Kozić, S., Klinar, I., Žarković, K., 2007. Virological and immunological characteristics of fatal Epstein-Barr virus mononucleosis in a 17-year-old Caucasian male presenting with meningoencephalitis and hemophagocytic syndrome. *J. Neurovirol.* 13, 389–396. <https://doi.org/10.1080/13550280701447042>

- Wang, Z., Yi, X., Du, L., Wang, H., Tang, J., Wang, M., Qi, C., Li, H., Lai, Y., Xia, W., Tang, A., 2017. A study of Epstein-Barr virus infection in the Chinese tree shrew(*Tupaia belangeri chinensis*). *Virol. J.* 14, 193. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0859-5>
- Wen, Y., Xu, H., Han, J., Jin, R., Chen, H., 2022. How Does Epstein–Barr Virus Interact With Other Microbiomes in EBV-Driven Cancers? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 852066. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.852066>
- Xia, W., Chen, H., Feng, Y., Shi, N., Huang, Z., Feng, Q., Jiang, X., He, G., Xie, M., Lai, Y., Wang, Z., Yi, X., Tang, A., 2022. Tree Shrew Is a Suitable Animal Model for the Study of Epstein Barr Virus. *Front. Immunol.* 12, 789604. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.789604>
- Xu, M., Yao, Y., Chen, H., Zhang, S., Cao, S.-M., Zhang, Z., Luo, B., Liu, Z., Li, Z., Xiang, T., He, G., Feng, Q.-S., Chen, L.-Z., Guo, X., Jia, W.-H., Chen, M.-Y., Zhang, X., Xie, S.-H., Peng, R., Chang, E.T., Pedernana, V., Feng, L., Bei, J.-X., Xu, R.-H., Zeng, M.-S., Ye, W., Adami, H.-O., Lin, X., Zhai, W., Zeng, Y.-X., Liu, J., 2019. Genome sequencing analysis identifies Epstein–Barr virus subtypes associated with high risk of nasopharyngeal carcinoma. *Nat. Genet.* 51, 1131–1136. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0436-5>
- Yates, J.L., Camiolo, S.M., Bashaw, J.M., 2000. The Minimal Replicator of Epstein-Barr Virus oriP. *J VIROL* 74.
- Yea, C., Tellier, R., Chong, P., Westmacott, G., Marrie, R.A., Bar-Or, A., Banwell, B., On behalf of the Canadian Pediatric Demyelinating Disease Network, 2013. Epstein-Barr virus in oral shedding of children with multiple sclerosis. *Neurology* 81, 1392–1399. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a841e4>
- Yu, H., Robertson, E.S., 2023. Epstein–Barr Virus History and Pathogenesis. *Viruses* 15, 714. <https://doi.org/10.3390/v15030714>
- Zanella, L., Riquelme, I., Buchegger, K., Abanto, M., Ili, C., Brebi, P., 2019. A reliable Epstein-Barr Virus classification based on phylogenomic and population analyses. *Sci. Rep.* 9, 9829. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45986-3>
- Zhang, L., Wang, R., Xie, Z., 2022. The roles of DNA methylation on the promotor of the Epstein–Barr virus (EBV) gene and the genome in patients with EBV-associated

- diseases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106, 4413–4426.
<https://doi.org/10.1007/s00253-022-12029-3>
- Zhang, Z., Zhang, H., Yu, Y., Ouyang, Y., Chen, Z., He, X., He, Z.-M., 2019. Carboxyl terminal activating region 3 of latent membrane protein 1 encoded by the Epstein-Barr virus regulates cell proliferation and protein expression in NP69 cells. *Mol. Med. Rep.* <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10859>
- Zheng, X., Qiu, M., Chen, S., Xiao, J., Ma, L., Liu, S., Zhou, J., Zhang, Q., Li, X., Chen, Z., Wu, Y., Chen, H., Jiang, L., Xiong, Y., Ma, S., Zhong, X., Huo, S., Ge, J., Cen, S., Chen, Q., 2016. High prevalence and diversity of viruses of the subfamily Gammaherpesvirinae, family Herpesviridae, in fecal specimens from bats of different species in southern China. *Arch. Virol.* 161, 135–140. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2614-9>
- Zidovec-Lepej, S., Batovic, M., Rozman, M., Bodulić, K., Prtorić, L., Šokota, A., Nikcevic, A., Simicic, P., 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, 915.
<https://doi.org/10.3390/pathogens12070915>

8. ŽIVOTOPIS

Marija Rozman rođena je 24. svibnja, 1996. godine u Sisku, Hrvatska. Završila je preddiplomski studij molekularne biologije 2019. godine te diplomski studij molekularne biologije 2021. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija radila je u laboratoriju Inovagen od 2020. do 2021. godine te je metodama molekularne dijagnostike analizirala nasljedne bolesti. Doktorski studij Biologije upisala je 2021. godine na Biološkom odsjeku PMF-a u Zagrebu. Zaposlena je u Klinici za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” od 2021. godine u svojstvu asistenta i kao doktorand na znanstveno-istraživačkom projektu Hrvatske zaklade za znanosti “Molekularna raznolikost virusa Epstein-Barr”. Od 2022. godine naslovni je asistent na Zavodu za molekularnu biologiju PMF-a Sveučilišta u Zagrebu gdje sudjeluje u izvedbi laboratorijskih vježbi “Molekularna biologija stanice” i “Genetika”. Tijekom dokorskog studija objavila je 5 znanstvenih radova, 3 izvorna znanstvena rada i 2 pregledna rada. Sudjelovala je na više nacionalnih i međunarodnih znanstvenih konferencija u svojstvu autora ili ko-autora posterskih prezentacija, a održala je 2 usmene prezentacije na međunarodnim konferencijama iz područja infektologije. Najvažnija područja njenog znanstvenog interesa su genetika u području mikrobiologije i onkologije.