

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Ana V. Banko

Povezanost genetičke varijabilnosti
Epštajn-Bar virusa i oboljenja udruženih
sa Epštajn-Bar virusnom infekcijom

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Ana V. Banko

Correlation between Epstein-Barr virus genetic
variability and Epstein-Barr virus-associated
diseases

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

PODACI O MENTORU I KOMISIJI

Mentor:

Prof. dr Tanja Jovanović - Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komisija:

1. Prof. dr Maja Ćupić – Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Ivana Lazarević – Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Doc. dr Goran Stevanović – Klinika za infektivne i tropske bolesti Kliničkog centra Srbije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. Prof. dr Jelena Milašin – Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Dobrila Stanković Đorđević - Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

“Važno je nikad ne prestati postavljati pitanja.”

Albert Einstein

Zahvaljujem se mojoj porodici, na beskrajnoj ljubavi. Roditelji, hvala vam na vaspitanju, безусловnoj podršci i osloncu, na ličnosti kojom se predstavljam. Zahvalna sam i mom najvećem prijatelju, mojoj voljenoj sestri. A Bojanu, svakodnevnom partneru u dobru i zlu, zahvalna sam na ljubavi, poverenju i beskompromisnoj iskrenosti.

Zahvalna sam mojim prijateljima i sreći da u svom radnom okruženju saradujem sa kolegama koji su prepoznali moje kvalitete. Prof. dr Tanja Jovanović uvek je podržavala sve moje ideje, a svojim sugestijama doprinela je da ova teza bude ponos šestogodišnjeg rada. Doc. dr Ivana Lazarević bila je moj najbliži saradnik, učitelj u “molekularnom svetu” i prvi sagovornik u rešavanju naučnih problema. Zahvalna sam i prof. dr Maji Ćupić na stručnoj, ali pre svega, iskrenoj ljudskoj podršci.

Iskrenu zahvalnost na svesrdnoj pomoći dugujem i kolegama Doc. dr Goranu Stevanoviću sa Klinike za infektivne i tropske bolesti KCS, dr Miljanu Foliću sa Klinike za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju KCS i dr Anđi Ćirković sa Instituta za medicinsku statistiku i informatiku. Takođe bih se zahvalila laboratorijskim tehničarima Gabrijeli Pavlović, Mariji Životić i Nataši Rakić.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem Kostu, mojoj najvećoj ljubavi, iskonskoj radosti i neprevaziđenoj inspiraciji.

Povezanost genetičke varijabilnosti Epštajn-Bar virusa i oboljenja udruženih sa Epštajn-Bar virusnom infekcijom

UVOD: Primarna Epstein-Barr virusna (EBV) infekcija može se manifestovati kao infektivna mononukloza (IM). Takođe, EBV infekcija može predstavljati važnu kariku u etiologiji velikog broja tumora, među kojima su najbrojniji limfomi, nazofaringealni (NFK) i гастриčni karcinom, kao i limfoproliferativne bolesti kod imunosuprimiranih pacijenata. Brojna su istraživanja koja nagoveštavaju vezu između karakteristika pojedinih EBV genotipova i onkogenog potencijala. Pretpostavlja se i da postoji veza između geografske specifičnosti virusa sa potencijalno onkogenom strukturom njegovog genoma.

CILJEVI: Ovim istraživanjem utvrđuje se dominacija EBV genotipa i određuju LMP-1 varijante i EBNA-1 subtipovi. Takođe, ciljevi se odnose i na identifikaciju novih i geografski specifičnih mutacija, kao i utvrđivanje moguće povezanosti polimorfizama različitih EBV gena, identifikovanih mutacija i prirode oboljenja.

MATERIJAL I METODOLOGIJA: Studija je obuhvatila 360 pacijenata sa IM, transplantiranim organom (T) ili NFK tipa UCNT (engl. undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type). Korišćeni su uzorci krvi IM i T pacijenata, kao i parafinski kalupi tkiva UCNT pacijenata. Nested-PCR metod korišćen je za dokazivanje EBNA-2, LMP-1 i EBNA-1 gena, kao i za genotipizaciju EBNA-2 gena. Nakon DNK sekvenciranja specifičnih regiona LMP-1 i EBNA-1 gena, sledila je filogenetska analiza dobijenih sekvenci. Obradene sekvence koristile su se za uzajamno poređenje varijabilnosti EBV gena, kao i za poređenje sa kliničkim parametrima pojedinačnih oboljenja.

REZULTATI: Devedeset uzoraka (25%) bilo je pozitivno na prisustvo EBV DNK. Dominantan genotip EBNA-2 izolata bio je genotip 1 (89,61%). Identifikovano je 4 od sedam poznatih LMP-1 varijanti: B95-8, Kina 1, SK (Severna Karolina) i Med (Mediteran) i 2, do sada nepoznate, varijante Srb 1 i Srb 2 (Srbija 1 i 2). Najučestalija bila je varijanta B95-8 (31%), a dokazana je i statistički značajna razlika u distribuciji varijanti među

oboljenjima ($p=0,039$). LMP-1 delecije su otkrivene kod 39% izolata, i to: dve poznate delecije od 30-bp i 69-bp, i dve novoidentifikovane delecije od 27-bp i 147-bp. Prisustvo delecije nije bilo povezano sa određenim oboljenjem. Kod nekih LMP-1 varijanti pronađene su dodatne jedinstvene aminokiseline: kod B95-8 Ser na lokusu 309, kod Kine 1 Asn na lokusu 322, a kod SK Asn na lokusu 250. Takođe je pokazano da je kraća delecija povezana sa manjim brojem 33-bp ponovaka.

Identifikovana su 4 EBNA-1 subtipa: P-thr, P-ala, V-val i V-ala. Distribucija subtipova nije se razlikovala među oboljenjima. Najčešći subtip P-thr, dalje je klasifikovan u 6 subvarijanti (sv-1 do sv-6) pri čemu su P-thr-sv-2, P-thr-sv-4, P-thr-sv-5 i P-thr-sv-6 novoidentifikovane subvarijante. P-thr-sv-5 dokazan je kao specifičan za UCNT izolate.

Prisustvo EBV DNK koreliralo je sa težinom kliničke slike IM. Učestalost prisustva EBV DNK u UCNT biopsijama opadalo je sa rastom TNM gradusa. Najlošiji TNM gradus (N3) UCNT bioptata bio je povezan sa prisustvom LMP-1 delecije. Ispitivane su i kombinacije varijabilnosti između EBV gena, pa je identifikovano 10 različitih grupa polimorfizama. Dokazana je veza između genotip 1/Med/P-thr polimorfizma sa NFK, a genotip 1/Kina 1/P-thr sa IM. Pojedine LMP-1 varijante bile su povezane sa određenim EBNA-1 subtipom: Kina 1 sa P-thr, SK sa P-ala, dok je jedan Srb 1 izolat bio udružen sa P-thr. Takođe, izolati V-ala i P-ala subtipa uglavnom su bili udruženi sa LMP-1 bez delecije. Sa povišenim vrednostima AST kod IM izolata, bila su povezana 2 polimorfizma: "sa LMP-1 del/P-thr" i "bez LMP-1 del/P-ala". Kod povišenih vrednosti ALT, bio je prisutan samo polimorfizam "bez LMP-1 del/P-ala". Kao mogući prediktori UCNT progresije, identifikovani su: genotip $1/\leq 4,5$ 33-bp pon/P-ala i genotip $1/> 4,5$ 33-bp pon/P-thr.

ZAKLJUČAK: Rezultati ove studije ukazuju na nova mesta za definisanje pojedinih kategorija varijabilnosti, opisuju novoidentifikovane mutacije, 2 nove LMP-1 delecije, LMP-1 varijante Srb1 i Srb2 i 5 EBNA-1 subvarijanti. Takođe, dokazane su posebne povezanosti između polimorfizama 2, odnosno 3 EBV gena. Identifikovane su i geografski specifične mutacije, ali i izmene genoma koje su u korelaciji sa kliničkim tokom oboljenja. Tako je utvrđena povezanost delecije u okviru LMP-1 gena sa najlošijim TNM gradusom (N3) UCNT izolata.

Ključne reči: Epstein-Barr virus (EBV), nazofaringealni karcinom (NFK), EBNA-2, LMP-1, EBNA-1, genotip, varijanta, subtip, polimorfizam

Naučna oblast/uža naučna oblast: Molekularna medicina/Virusologija

SUMMARY

Correlation between Epstein-Barr virus genetic variability and Epstein-Barr virus-associated diseases

INTRODUCTION: Primary Epstein-Barr virus (EBV) infection could result in infectious mononucleosis (IM). Also, EBV infection has an important role in etiology of numerous tumors: lymphomas, nasopharyngeal (NPC) carcinoma, gastric carcinoma, and lymphoproliferative diseases in immunocompromised patients. There are many studies which suggest the association between EBV genotypes and oncogenic potential of this virus. It is also assumed that geographical specificity of EBV genome could correlate with potentially oncogenic structure of viral genome.

AIMS: The aims of this study were to determine the prevalence of EBV genotypes and to identify LMP-1 variants and EBNA-1 subtypes. The aims also included identification of new and geographical specific mutations, as well as investigation of possible association between EBV genes polymorphisms, detected mutations and disease characteristics.

MATERIALS AND METHODS: This research included 360 patients with IM, transplanted organ (T) or NPC (type UCNT, undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type). Blood samples from IM and T patients, as well as paraffin embedded tissue blocks from UCNT patients were included. Nested-PCR was used for detection of EBNA-2, LMP-1 and EBNA-1 genes, and also for EBNA-2 genotyping. After DNA sequencing of selected regions of LMP-1 and EBNA-1 genes, phylogenetic analysis of obtained sequences were performed. Finally, the sequences were used for investigation of correlation between EBV genes variabilities or between gene variabilities and clinical characteristics of disease.

RESULTS: EBV DNA was present in 90 samples (25%). Among two EBNA-2 genotypes, genotype 1 was dominant (89,61%). Four out of 7 known LMP-1 variants were identified: B95-8, China 1, NC (North Carolina), Med (Mediterranean). Moreover, 2 new variants were detected: Srb 1 and Srb 2 (Serbia 1 and 2). The most frequent was B95-8 (31%). There was statistically significant difference in variant distribution between diseases

($p=0,039$). LMP-1 deletions were detected in 39% isolates: two known 30-bp i 69-bp, and two yet unknown 27-bp i 147-bp. The presence of deletion was not related to any specific disease. Additional unique amino-acids were found in some LMP-1 variants: Ser on locus 309 in B95-8, Asn on locus 322 in China 1, and Asn on locus 250 in NC. In addition, shorter deletions were associated with lower number of 33-bp repeats.

Four EBNA-1 subtypes were identified: P-thr, P-ala, V-val and V-ala. Their distribution was not disease-dependent. The most frequent subtype P-thr, was further classified in 6 subvariants (sv-1 to sv-6). According to published data, 4 subvariants (P-thr-sv-2, P-thr-sv-4, P-thr-sv-5 and P-thr-sv-6) were yet unknown. P-thr-sv-5 was demonstrated as UCNT specific.

The presence of EBV DNA correlated with clinical presentation in IM patients. In UCNT biopsies, EBV DNA presence declined in TNM stages, from beneficial to unfavorable. The worst TNM stage (N3) was associated with the presence of LMP-1 deletions. After the investigation of combinations between obtained EBV gene variabilities, 10 polymorphisms were defined. It was shown that there is association between genotype 1/Med/P-thr polymorphism and NPC, and between genotype 1/China 1/P-thr and IM. Some LMP-1 variants correlated with specific EBNA-1 subtype: China 1 with P-thr, NC with P-ala, and one Srb 1 with P-thr. In addition, isolates with V-ala and P-ala subtypes were mostly associated with LMP-1 without deletion. In IM isolates, 2 polymorphisms were associated with elevated value of AST: "LMP-1 with del/P-thr" and "LMP-1 without del/P-ala". In patients with elevated value of ALT, only "LMP-1 without del/P-ala" was present. Finally, 2 polymorphisms were identified as possible predictors for UCNT progression: genotype 1/ $\leq 4,5$ 33-bp repeats/P-ala and genotype 1/ $> 4,5$ 33-bp repeats/P-thr.

CONCLUSION: This study demonstrated that there were new positions for definition of different variability types, new mutations, 2 new LMP-1 deletions, new LMP-1 variants Srb1 and Srb2 and 5 new EBNA-1 subvariants. Furthermore, correlation between 2 or 3 EBV genes variabilities was shown, as well as some geographical-associated mutations. In addition, specific genome changes correlated with clinical course of the disease. Thus, the

association between LMP-1 deletions and the worst TNM stage (N3) of UCNT isolates was ascertained.

Key words: Epstein-Barr virus (EBV), nasopharyngeal carcinoma (NPC), EBNA-2, LMP-1, EBNA-1, genotype, variant, subtype, polymorphism

Scientific field: Molecular medicine/Virology

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Istorijat i klasifikacija EBV.....	3
1.2. Strukturne i genetičke karakteristike EBV.....	5
1.2.1. Morfološke i strukturne karakteristike.....	5
1.2.2. Genetičke karakteristike.....	6
1.2.3. Genski produkti (latentni i strukturni) i njihova uloga.....	8
1.2.3.1. EBV nuklearni antigeni (EBNA).....	8
1.2.3.2. Latentni membranski protein (LMP).....	10
1.3. Životni ciklus EBV – latentna i litička infekcija.....	11
1.3.1. Latentna infekcija.....	13
1.3.2. Litička infekcija.....	15
1.4. Oboljenja udružena sa EBV infekcijom kao modeli patogeneze.....	16
1.4.1. Primarna infekcija: infektivna mononukleoza.....	16
1.4.2. EBV infekcija kod imunokompromitovanih pacijenata: infekcija nakon transplantacije bubrega.....	18
1.4.3. Karcinom povezan sa EBV infekcijom: nazofaringealni karcinom.....	19
1.5. Genetička varijabilnost EBV.....	21
1.5.1. Varijabilnost EBNA-2 gena.....	22
1.5.2. Varijabilnost LMP-1 gena.....	23
1.5.3. Varijabilnost EBNA-1 gena.....	25
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	27
3. MATERIJAL I METODOLOGIJA	29
3.1. Pacijenti.....	29
3.2. Klinički uzorci.....	32
3.3. Metodologija.....	33
3.3.1. Deparafinizacija.....	33
3.3.2. Izolovanje virusne DNK iz tkiva.....	34
3.3.3. Izolovanje virusne DNK iz krvi.....	34
3.3.4. Dokazivanje i genotipizacija EBNA-2 gena nested-PCR metodom.....	35
3.3.5. Dokazivanje LMP-1 gena nested-PCR metodom.....	37
3.3.6. Dokazivanje EBNA-1 gena nested PCR metodom.....	39
3.3.7. Vizuelizacija nested-PCR produkata – elektroforeza u agaroznom gelu.....	41
3.3.8. DNK sekvenciranje.....	42
3.3.8.1. Prečišćavanje PCR produkta.....	42

3.3.8.2. Reakcija cikličnog sekvenciranja – Cycle Sequencing.....	43
3.3.8.3. Prečišćavanje produkata cikličnog sekvenciranja.....	43
3.3.8.4. Kapilarna elektroforeza u automatskom sekvencioneru i analiza elektroferograma.....	44
3.3.9. Analiza DNK sekvenci.....	44
3.3.9.1. Određivanje varijanti i subvarijanti LMP-1 gena.....	44
3.3.9.2. Određivanje subtipova i subvarijanti EBNA-1 gena.....	45
3.3.9.3. Filogenetska analiza EBV izolata.....	46
3.4. Statistička obrada dobijenih rezultata.....	47
4. REZULTATI.....	48
4.1. Dokazivanje EBNA-2, LMP-1 i EBNA-1 gena nested-PCR metodom.....	50
4.2. Određivanje EBV genotipa analizom EBNA-2 gena.....	53
4.3. Ispitivanje genetičke varijabilnosti LMP-1 gena.....	54
4.3.1. Određivanje varijanti i subvarijanti LMP-1 gena.....	54
4.3.2. Analiza mutacija u okviru LMP-1 gena.....	57
4.3.2.1. Ispitivanje delecija LMP-1 gena.....	57
4.3.2.2. Ispitivanje broja ponovaka od 33-bp u LMP-1 genu.....	59
4.3.2.3. Ispitivanje dodatnih mutacija LMP-1 gena.....	61
4.4. Određivanje subtipova i subvarijanti EBNA-1 gena.....	67
4.5. Filogenetska analiza izolata.....	72
4.5.1. Filogenetska analiza LMP-1 izolata.....	72
4.5.2. Filogenetska analiza EBNA-1 izolata.....	74
4.6. Utvrđivanje međusobnih povezanosti genetičkih markera virusa i poređenje sa karakteristikama oboljenja.....	76
4.6.1. Povezanost EBV genetičke varijabilnosti i laboratorijskih i kliničkih parametara pacijenata sa infektivnom mononukleozom.....	77
4.6.2. Povezanost EBV genetičke varijabilnosti i podataka pacijenata sa transplantiranim organom.....	80
4.6.3. Povezanost EBV genetičke varijabilnosti i kliničkih parametara pacijenata sa UCNT.....	85
4.6.4. Povezanost genetičkih markera virusa svih pacijenata u istraživanju.....	94
5. DISKUSIJA.....	98
6. ZAKLJUČCI.....	124
7. LITERATURA.....	129
SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU.....	140

1. UVOD

Epstein-Barr virus (EBV) ili Humani Herpesvirus 4 jedan je od najrasprostranjenijih humanih virusa. Prevalencija infekcije u svetu iznosi preko 90%.

EBV infekcija predstavlja važnu kariku u etiologiji velikog broja tumora, među kojima su najbrojniji limfomi (Burkitt, Hodgkin, nazalni NK/T ćelijski), zatim nazofaringealni i gastrični karcinom, kao i limfoproliferativne bolesti kod transplantiranih i drugih imunosuprimiranih pacijenata. Nakon istraživanja koja nagoveštavaju vezu između karakteristika pojedinih EBV genotipova i onkogenog potencijala, interesovanje za identifikaciju takvih genetskih osobina je poraslo.

U dosadašnjim studijama takođe je pokazan tzv. geografski polimorfizam. Pretpostavlja se da postoji veza između geografske specifičnosti virusa sa potencijalno onkogenom strukturom njegovog genoma.

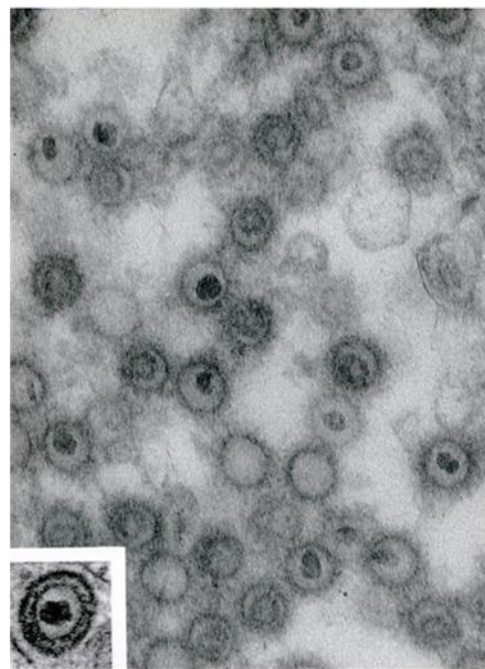
1.1. Istorijat i klasifikacija EBV

Epstein-Barr virus otkriven je pre pola veka elektronskom mikroskopijom kulture ćelija Burkitt-ovog limfoma (BL). Denis Burkitt, britanski kolonijalni hirurg u Ugandi, 1957. godine susreće se sa do tada nepoznatim multifokalnim tumorima vilice kod dece (Slika 1.). Dokazuje da se radi o B ćelijskim limfomima i iskazuje sumnju da je etiologija ovih tumora infektivne prirode. Nekoliko godina kasnije, Anthony Epstein, patolog Ujedinjenog Kraljevstva, uspeva da kultiviše ćelije Burkitt-ovog limfoma, i da u njima elektronskim mikroskopom identifikuje herpesvirus (Epstein, i sar., 1965) (Slika 2.). Zajedno sa Bert Achong i Yvonne Barr otkriva razlike novootkrivenog virusa u odnosu na druge predstavnike herpesvirusa, te tako, EBV postaje prvi humani tumorski virus i prototip buduće "onkogene" podfamilije *Gammaherpesvirinae* (Rickinson i Kieff, 2007).

Nakon ovog otkrića, i epidemiološke studije pokazale su vezu između BL i EBV infekcije, te ustanovile kosmopolitsku distribuciju EBV. Sedamdesetih i osamdesetih



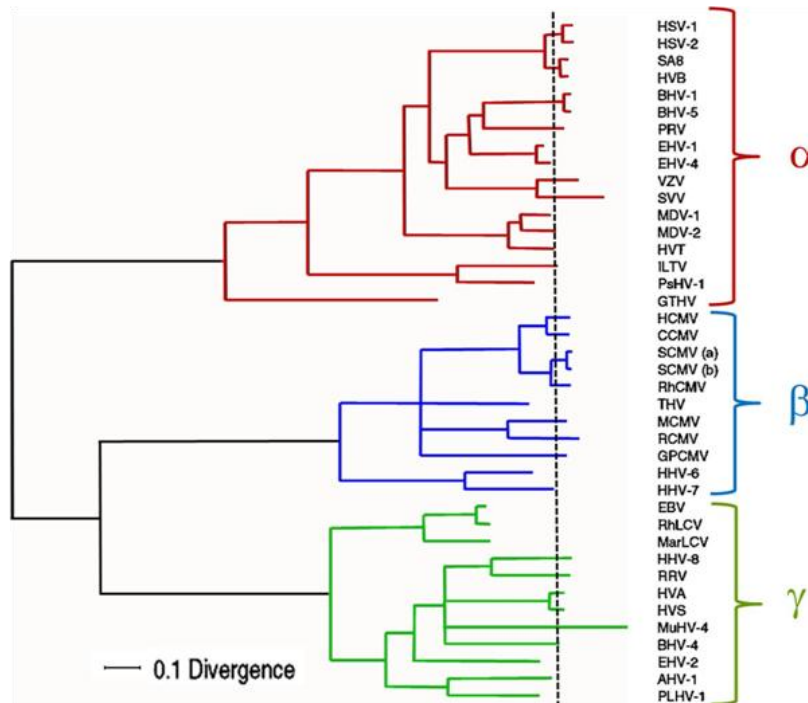
Slika 1. Burkitt-ov limfom
(Adeyemo i sar., 2011.)



Slika 2. Elektronska mikroskopija EBV
(Epstein i sar., 1964.)

godina dvadesetog veka, dokazuje se veza između EBV i drugih humanih tumora, pre svega nazofaringealnog karcinoma (NFK) i limfoma kao što su non-Hodgkin (NHL), T-ćelijski (TL) i Hodgkin (HL) (Kutok i Wang, 2006).

Prema poslednjoj klasifikaciji Internacionalnog komiteta za taksonomiju virusa (engl. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) (King, i sar., 2012), familija *Herpesviridae* podeljena je na tri podfamilije: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* i *Gammaherpesvirinae*. Prvobitni taksonomski kriterijumi bazirali su se na biološkim svojstvima, da bi se kasnije, usvojili dodatni kriterijumi koji se odnose na homologiju i specifične filogenetske odnose genoma (Rickinson i Kieff, 2007). Epstein-Barr virus, jedini je humani predstavnik roda *Lymphocryptovirus* (LCV) u okviru podfamilije *Gammaherpesvirinae* (Grafikon 1.). I među nehumanim predstavnicima ovog roda dokazana je veza između EBV infekcije i patogeneze tumora.

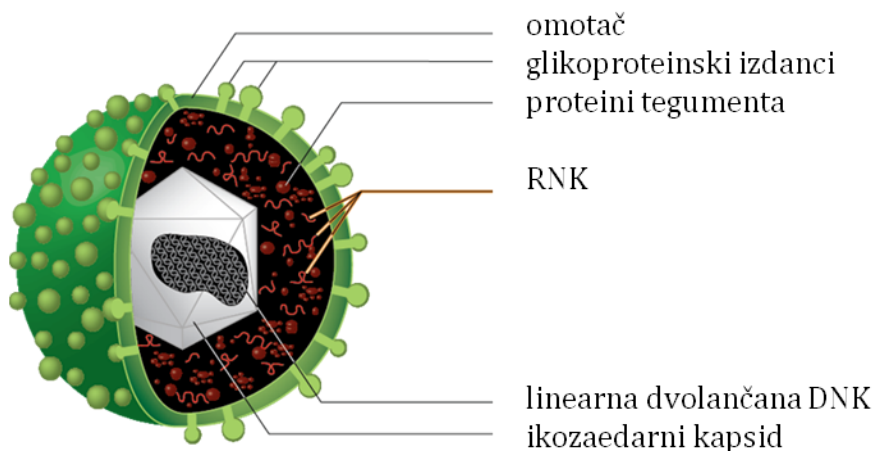


Grafikon 1. Filogenetsko stablo familije *Herpesviridae* (Grose, 2012.)

1.2. Strukturne i genetičke karakteristike EBV

1.2.1. Morfološke i strukturne karakteristike

Kao i ostali herpesvirusi, EBV je sferičnog oblika, veličine 150-200 nm. Posедуje linearnu dvolančanu DNK sa terminalno umnoženim krajevima. Stožezdesetdve kapsomere formiraju ikozaedarni kapsid (100-110 nm) oko koga se nalazi omotač porekla jedarne membrane inficirane ćelije. Između kapsida i omotača je tegument koji je fibrilarne strukture. Na spoljašnjem omotaču nalaze se glikoproteinski izdanci (Slika 3.).



Slika 3. Šematski prikaz EBV

U virusnom omotaču nalazi se 11 glikoproteina: MA (membranski antigen) kompleks koji čine gp350/220 (BLLF-1) i gH (gp85, BXLF-2) odgovornih za vezivanje i penetraciju virusa u ćeliju; zatim kompleks gN (BLRF-1) i gM (BBRF-3) čija je uloga u sazrevanju virusa; gB (gp110, BALF-4) odgovornog za otpuštanje virusa iz litično inficirane ćelije; 4 proteina omotača nedovoljno poznatih funkcija:

Prvi kompletno kloniran i sekvenciran genom herpesvirusa bio je upravo genom EBV (Baer, i sar., 1984), izolovan od pacijenta sa infektivnom mononukleozom (IM), a označen kao B95-8 soj (pristupni broj V01555). Iako predstavlja prototip, B95-8 ima nedostatak genske sekvence dužine 11,8 kbp. Kako je ovakva sekvenca retka kod većine izolata, sintetisan je hibrid sa dodatkom ovog segmenta iz EBV genoma poreklom od Raji ćelija (Parker, i sar., 1990)(pristupni broj NC_007605).

EBV genom ima kapacitet za kodiranje oko 80 proteina, ali do sada nisu svi identifikovani. U latentnoj infekciji eksprimiran je ograničen set od 6 gena nuklearnih proteina (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP), 3 gena latentnih membranskih proteina (LMP-1, -2A, -2B) i 2 male nekodirajuće RNK (EBER-1 i -2). Različita ekspresija latentnih gena uslovlila je i klasifikaciju latentne infekcije na tri tipa, gde je jedino u tipu III eksprimiran kompletan set latentnih proteina (Tabela 1.) (Rickinson i Kieff, 2007). U litičkoj infekciji eksprimirani su i tzv. najraniji, rani i kasni geni. U najranije i rane spadaju transaktivatori, pre svega BZLF-1 (Zta) i BRLF, 6 replikativnih enzima, BCL-2 proteini sa velikim uticajem na apoptozu, zatim BNLF-2A, BARF-1 i drugi. Produkti ranih gena objedinjeni su kompleksom EA (engl. early antigens) predstavljaju važan serološki marker. Kasni geni kodiraju glikoproteine MA kompleksa (membranski antigeni) i strukturne proteine kapsida objedinjene VCA kompleksom (virusni kapsidni antigeni) koji je takođe važan serološki marker.

Tabela 1. Ekspresija gena po tipovima latencije

TIP LATENCIJE	EBNA-1	EBNA-2	EBNA-3 (A,B,C)	EBNA-LP	LMP-1	LMP-2A	LMP-2B	EBER	BOLEST
I	+	-	-	-	-	-	-	+	BL
II	+	-	-	-	+	+	+	+	NFK, HL, NKL TL
III	+	+	+	+	+	+	+	+	IM, PTLD
zdravi nosioci	+/-	-	-	-	-	+	-	+	latencija u B limfocitima

Burkitt-ov limfom (BL); Nazofaringealni karcinom (NFK); Hodgkin limfom (HL); Limfom NK i T ćelija (NKL i TL); Infektivna mononukleoza (IM); Posttransplantacioni limfoproliferativni poremećaj (PTLD).

1.2.3. Genski produkti (latentni i strukturni) i njihova uloga

1.2.3.1. EBV nuklearni antigeni (EBNA)

EBNA-1 antigen je DNK vezujući nuklearni fosfoprotein, neophodan za replikaciju i održavanje epizomalne EBV DNK u latentno inficiranim B limfocitima. Ovo postiže specifičnim vezivanjem za OriP region (Rickinson i Kieff, 2007). Sastoji se od 641 aminokiseline (ak) organizovane u 4 domena: amino-terminalni (N-terminalni); kopolimer glicina (Gly) i alanina (Ala); argininom (Arg) bogat region; i karboksi-terminalni (C-terminalni). Njegov Gly-Arg kopolimerni domen je cis-aktivacioni inhibitor MHC-1 prezentacije, što onemogućava adekvatnu prezentaciju antigena i prepoznavanje od strane CD8+ T ćelija. Takođe, može da interaguje sa pojedinim virusnim promotorima i tako doprinese regulaciji transkripcije svih EBNA

gena i LMP-1 (Young i Rickinson, 2004). Zapaženo je i da inhibira apoptozu u ćelijama BL (Kennedy, Komano i Sugden, 2003).

EBNA-2 je jedino eksprimiran u III tipu latencije, a najznačajniju ulogu ima u transformaciji B limfocita. Ovaj fosfoprotein je transkripcioni aktivator i virusnih i ćelijskih gena. Reguliše ekspresiju LMP-1 i LMP-2A, kao i ćelijskih antigena CD21, CD23, *c-FGR* i *c-MUC*. Zajedno sa ćelijskim DNK vezujućim proteinom RBP-JK pomaže konverziju mirujućih B limfocita u limfoblastoidne B ćelije (Kutok i Wang, 2006). Novija istraživanja pokazuju da EBNA-2 funkcionalno može zameniti intracelularni region transmembranskih Notch proteina (engl. neurogenic locus notch homolog protein), što predstavlja jedan vid mimikrije (Hofelmayr, i sar., 2001).

EBNA-LP interaguje sa EBNA-2 radi efikasnog razvoja transformisanih B ćelija ali i povećanja sposobnosti EBNA-2 u transaktivaciji LMP-1 (Lawrence, i sar., 2007). Aminokiseline u njegovom sastavu formiraju 4 segmenta (2, 44, 11 i 34 ak). Kako broj ponovaka može varirati, tako je i dužina EBNA-LP različita među EBV izolatima.

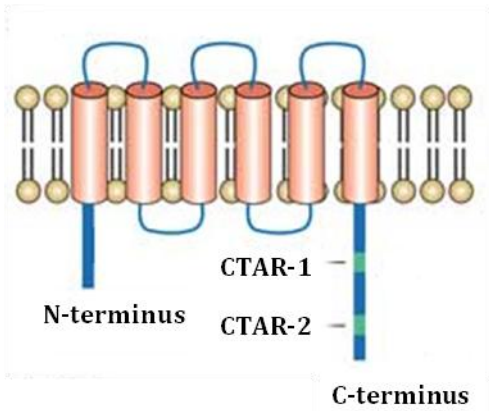
Interakciju EBNA-2 i EBNA-LP u transkripcionoj aktivaciji usklađuje porodica **EBNA-3** proteina. Njihova uloga je u inhibiciji EBNA-2 vođene transaktivacije, pre svega na nivou ćelijskog DNK vezujućeg proteina RBP-JK (Lawrence, i sar., 2007). Za B ćelijsku transformaciju *in vitro*, neophodni su EBNA-3A i EBNA-3C, dok prisustvo EBNA-3B nije obavezno. EBNA-3C povećava ekspresiju i ćelijskih (CD21) i virusnih (LMP-1) gena, a zajedno sa Ras signalnim proteinima ometa restrikciona mesta ćelijskog ciklusa u fibroblastima glodara (Parker, Touitou i Allday, 2000). EBNA-3B indukuje ekspresiju ćelijskih antigena CD40 i filamentoznog proteina vimentina (Lawrence, i sar., 2007).

1.2.3.2. Latentni membranski protein (LMP)

LMP-1 je integralni membranski protein od 62 kd. Predstavlja najznačajniji protein u EBV vođenoj karcinogenezi, jer je esencijalan za B ćelijsku imortalizaciju. Ima sposobnost da transformiše fibroblaste glodara i izazove tumore laboratorijskih miševa (Wang, Liebowitz i Kieff, 1985) (Moorthy i Thorley-Lawson, 1993). Funkcionalno je analogan CD40 molekulu. Signalni put aktivacije preko LMP-1, kao i onaj preko ćelijskog CD40 receptora, uslovljava proliferaciju B limfocita (Kulwichit, i sar., 1998) (Rowe, i sar., 1994). Komplementarno svojoj proliferativnoj funkciji, LMP-1 inhibira proapoptozne molekule kao što su *bcl-2*, *mcl-1* i *bcl-2* regulacioni protein A1 (*Bfl-1*) i blokira p53 posredovanu apoptozu preko indukcije *A20* gena (Young i Rickinson, 2004), (Rowe, i sar., 1994). Čak i kada je ekspresija LMP-1 veoma mala, njegov onkogeni potencijal se održava. Pokazano je da se inhibicijom LMP-1 ekspresije postiže i zaustavljanje rasta tumorskih ćelija (Hannigan i Wilson, 2010).

LMP-1 stimuliše ekspresiju površinskih molekula CD23, CD39, CD40, CD44 i MHC II klase, kao i produkciju citokina IL-6, IL-8, IL-10 (Rickinson i Kieff, 2007) (Eliopoulos, Stack, i sar., 1997) (Eliopoulos, Gallagher, i sar., 1999). Pokazano je da je LMP-1 jedan od receptora TNF (engl. tumor necrosis factor), tj. TNFR. Aktivira nekoliko ligand-nezavisnih signalnih puteva (Lawrence, i sar., 2007). Neki od signalnih puteva u koje je uključen LMP-1 su MAP kinazni, JAK/STAT i fosfatidilinozitol kinazni (PI3-K) putevi (Lawrence, i sar., 2007) (Dawson, Tramontanis, i sar., 2003).

Protein LMP-1, izgrađen od 386 amikokiseline, organizovan je u tri domena: kratki (25 ak) N-terminalni citoplazmatski rep, 6 hidrofobnih transmembranskih petlji i dugi (200 ak) C-terminalni rep koji sadrži i dva signalna domena CTAR 1 i 2 (engl. carboxy-terminal activating region) (Slika 4.). C-terminalni region interaguje sa ćelijskim proteinima kao što je NF- κ B (transkripcioni nuklearni faktor NF- κ B), što vodi inhibiciji apoptoze (Hatzivassiliou i Mosialos, 2002).



Slika 4. Šematski prikaz LMP1

LMP-2 proteini LMP-2A i LMP-2B predstavljaju dominantne negativne regulatore signalnih puteva B ćelijskog receptora, pre svega tirozin kinaznog puta, sprečavajući ulazak ćelije u litičku fazu (Kutok i Wang, 2006). Na taj način, učestvuju u proliferaciji i preživljavanju B limfocita, ali nijedan nije neophodan za B ćelijsku transformaciju (Longnecker, 2000).

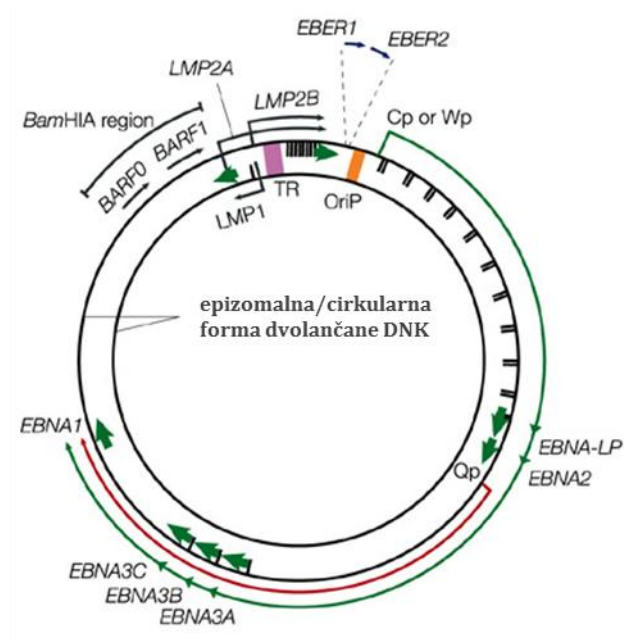
Opisani mehanizmi dejstva LMP-2A su brojni, pa je poznato da ovaj protein može transformisati epitelne ćelije i povećati njihovu adhezivnu sposobnost i pokretljivost, i da takođe, može učestovati u inhibiciji apoptoze i supresiji ćelijskog imuniteta (Young i Rickinson, 2004). Strukture LMP-2A i -2B su slične i obuhvataju: 12 transmembranskih domena i citoplazmatski C-terminus od 27 aminokiselina (Rickinson i Kieff, 2007). LMP-2A takođe poseduje i N-terminus od 119 aminokiselina.

1.3. Životni ciklus EBV – latentna i litička infekcija

Ulazak EBV u B limfocit odvija se interakcijom virusnog površinskog glikoproteina gp350/220 i ćelijskog receptora CD21 (CR2) (Fingerth, i sar., 1984). Glikoprotein 350/220 je najznačajnije ciljno mesto EBV neutrališućih antitela, pa se na nivou ovog glikoproteina ulažu naponi za sintezu buduće anti-EBV vakcine (Thorley-Lawson i Poodry, 1982) (Cohen, i sar., 2013). Nakon vezivanja za receptor, i ulaska u ćeliju, otpočinje aktivacija tirozin/fosfatidilinozitol kinaznog (TK i PI), kao i NF- κ B signalnog puta (Lawrence, i sar., 2007). Dokazano je, međutim, da gp350/220-CD21 nije jedina moguća interakcija vezivanja i penetracije virusa, te da i neki drugi virusni proteini poput kompleksa gH/gL/gp42 mogu učestvovati u inficiranju ćelije

domaćina (Janž, i sar., 2000) (Lawrence, i sar., 2007). Naime, posle inicijalne reakcije gp350/220-CD21, gp42 se vezuje za površinske molekule HLA klase II (engl. Human leukocyte antigen) kao koreceptore, što je praćeno regulisanom fuzijom virusa i ćelije od strane gH/gL kompleksa (Hutt-Fletcher i Lake, 2001). Jedno od poslednjih otkrića, ukazuje na novi receptor na B ćelijama, receptor komplekta tip 1, CD35 (Ogembo, i sar., 2013). Iako EBV može inficirati i ćelije poput epitelnih, mezenhimalnih i T limfocita, receptori na tim ćelijama ostaju nepoznati. Alfa-5-beta-1 opisan je kao mogući molekul koji učestvuje u vezivanju virusa za epitelne ćelije (Tugizov, Berline i Palefsky, 2003).

Ulazak virusa u ćeliju odvija se fuzijom virusnog omotača i citoplazmatske membrane i to, tzv. endozitoza zavisnim, u B ćelijama, ili endocitoza nezavisnim putem u epitelnim ćelijama. Zatim se oslobađa kapsid i dalje kretanje ide duž mikrotubula ćelije sve do jedarnih pora (Lindsey, 2007). U jedru DNK molekul formira cirkularni epizom tokom narednih 8-12 sati (Slika 5.) (Rickinson i Kieff,



Slika 5. EBV epizom sa produktima transkripcije

2007). Dokazano je, takođe, da EBV DNK može opstati i kao integrisana u hromozomsku DNK sa ili bez prisustva epizomalne forme u istoj ćeliji (Rickinson i Kieff, 2007). Sledeća 2-3 dana ćelija ne ulazi u S fazu ćelijskog ciklusa što obezbeđuje ekspresija svih EBNA i LMP. Konačno, počinje

prva mitozna i ekspresija EBER, sa deobama ćelija na svakih 36-48 sati.

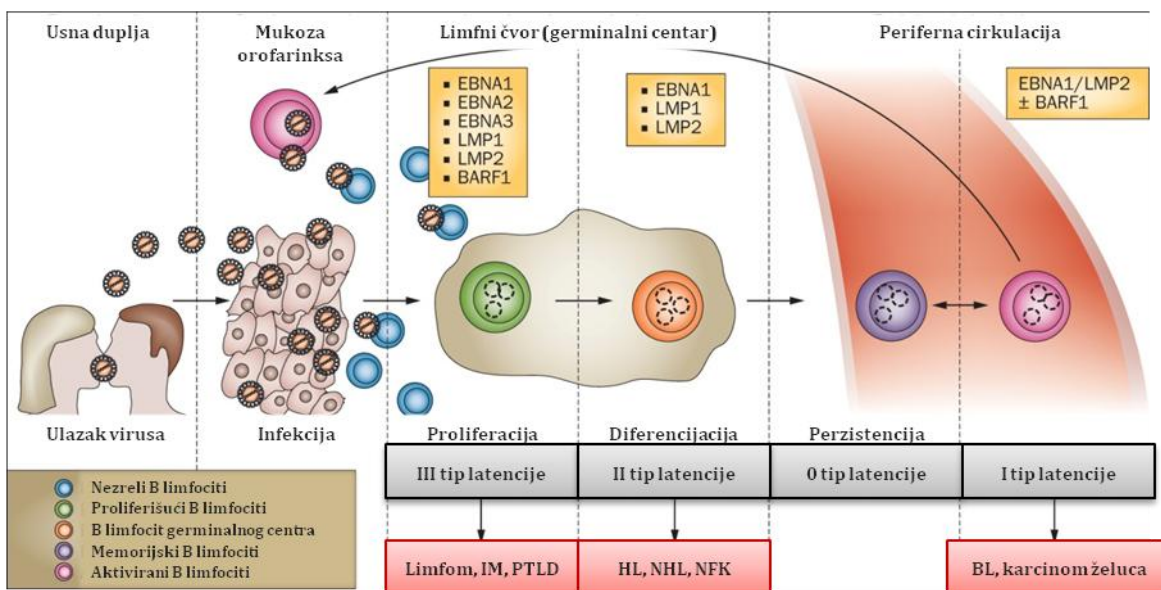
Životni ciklus EBV je vrlo specifičan, pa ekspresija virusnih gena zavisi od tipa ćelija kao i njenog diferencijalnog i aktivacionog statusa. Jedna od biološki važnih karakteristika komunikacije EBV i ćelije je sposobnost uspostavljanja latencije. U latentnoj infekciji eksprimiraju se samo najraniji i rani virusni geni, dok u produktivnoj infekciji dolazi do kompletne replikacije virusa sa produkcijom novih virusnih partikula.

1.3.1. Latentna infekcija

Interesantno je da EBV može da uspostavi tri različita programa latencije, pri čemu u svakom programu, njegov genom ostaje u epizomalnoj formi. Značajno je i to da se različiti tipovi latencije manifestuju kroz brojne tumore povezane sa EBV infekcijom (Tabela 1.).

Tokom primarne infekcije EBV inficira epitelne ćelije orofarinksa, a uspostavlja latentnu infekciju u B limfocitima. Zapravo, kada putem salive virus dospe do epitela Waldeyer-ovog tonzilarnog prstena orofarinksa, on započinje litičku infekciju epitelnih ćelija. Zatim virus inficira naivne B limfocite u lokalnom limfnom tkivu, što pokreće njihovu aktivaciju i transformaciju u limfoblaste. Ovaj proces *in vitro* je predstavljen uspostavljanjem limfoblastoidnih ćelijskih linija (engl. lymphoblastoid cell lines, LCL) (Kutok and Wang 2006). U aktivisanim limfoblastima uspostavlja se **III tip latencije**, koju prati ekspresija čitavog seta latentnih proteina (6 nuklearnih i 3 latentna membranska proteina) kao i rani transkripti dve male nekodirajuće RNK (Tabela 1.). Kako su ovi limfoblasti visoko imunogeni, bivaju odstranjeni od strane EBV-specifičnih citotoksičnih T limfocita. Preživljavanje virusa ipak je moguće zahvaljujući suprimiranju imunogenih proteina B ćelija, i to u dve faze. Prvo se B ćelije transportuju do limfnih žlezda gde proliferišu eksprimirajući samo EBNA-1 i

LMP-1/2 (**II tip latencije**). U sledećoj fazi, ove ćelije napuštaju limfne žlezde diferentovani u IgD memorijske ćelije bez ikakvog eksprimiranja virusnih proteina (**tip latencije 0**), zbog čega su “nevidljivi” za imunološko prepoznavanje. U cirkulišućim memorijskim B limfocitima može se aktivirati transkripcioni program iz početka. Ove ćelije se, u tom slučaju, dele i eksprimiraju samo EBNA-1 protein (**I tip latencije**), što omogućava da se sa ćelijskim podeli i virusni genom (Hochberg, i sar., 2004). Memorijske ćelije mogu, eventualno, da se vrate u faringealni predeo. Tada dolazi do diferencijacije u plazma ćelije i pokretanja litičke infekcije sa kompletnom virusnom replikacijom i aktivnim izlučivanjem virusa putem salive. Na taj način, virus obezbeđuje nove ćelijske rezervoare i prenos na novog domaćina (Slika 6.). Kod velikog broja doživotnih EBV nosilaca, male količine virusa mogu se dokazati u ispirku guše i salivi. Dokazano je da je u perifernoj krvi asimptomatskih nosilaca 1-50 od 10^6 B limfocita latentno inficirano (Rickinson i Kieff, 2007.). Sličan je broj i u slučaju B ćelijskih populacija tonzilarog i adenoidnog tkiva, dok se u slezini i mezenteričnim limfnim žlezdama nalazi 20 puta manja količina (Laichalk, Hochberg, Babcock, Freeman i Thorley-Lawson, 2002). Takođe, povremeno izlučivanje virusa



Slika 6. Životni ciklus EBV (Bollard i sar., 2012.)

zapaženo je i u cerviksu, pa čak i plućima (Sixbey, Lemon i Pagano, 1986) (Egan, i sar., 1995). Konačno, ćelije koje izlučuju virus nisu jasno definisane. Dugo se smatralo da su to pljuvačne žlezde, ali bi umesto njih to mogao biti epitel jezika (Rickinson i Kieff, 2007).

Iako se B ćelijska populacija, i to IgD, smatra najvažnijim mestom perzistencije EBV, uloga skvamoznih epitelnih ćelija ostaje nedovoljno razjašnjena. Naime, virus je dokazan u epitelnim ćelijama pacijenata sa leukoplakijom i imunosuprimiranih sa benignim oralnim lezijama, ali ga obično nema u zdravom epitelu orofarinksa i tonzila pacijenata sa infektivnom mononukleozom, kao ni u epitelu koji okružuje nazofaringealni ili gastrični karcinom (Lawrence, i sar., 2007).

1.3.2. Litička infekcija

Signal koji započinje reaktivaciju virusa *in vivo* nije identifikovan, ali se smatra da on nije virusnog porekla. Zapravo, pojedini memorijski B limfociti pri prolasku kroz limfno tkivo diferenciraju se u plazma ćelije i započinju **litičku fazu** EBV životnog ciklusa (Laichalk i Thorley-Lawson, 2005). Litičku infekciju prati produktivna infekcija.

Tokom produktivne infekcije eksprimira se oko 80 virusnih proteina uključujući: aktivatore transkripcije, zatim faktore DNK replikacije, i konačno, strukturne proteine poput virusnog kapsidnog antigena (VCA). Kao prvi indikatori litičke infekcije, sintetišu se tzv. najraniji proteini BZLF-1 i BRLF-1. Njihova uloga je u regulisanju prelaska iz latentne u litičku fazu (Kutok i Wang, 2006). Ovi proteini su transaktivatori drugih litičkih gena, uključujući i gen za DNK polimerazu, koja omogućava replikaciju virusne DNK po principu kotrljajućeg obruča sa sintezom linearnih konkatermera. Svi proteini koji učestvuju u replikaciji funkcionišu kao delovi različitih kompleksa. ZEBRA kao transkripcioni faktor, interaguje sa helikaza/primaza/pristupni protein kompleksom i dovodi ih do ZEBRA vezujućih

mesta na ori-L kako bi formirali rani kompleks za koji će se vezivati DNK vezujući proteini. Ovaj rani kompleks otvara DNK heliks i sintetiše RNK prajmere. Sledi dolazak DNK polimeraze i njenih udruženih proteina sa nesmetanim odvijanjem procesa DNK replikacije (Fujii, i sar., 2000). Virusnu replikaciju, međutim, stimulišu i transkripcioni faktori ćelije (ZBP-89 i Sp-1) koji kao i ZEBRA interaguju sa helikaza/primaza/pristupni protein kompleksom (Baumann, i sar., 2000). Konačno, konkatemere se spajaju terminalnim ponovcima (TP), pakuju u prokapside, preuzimaju deo ćelijske membrane formirajući omotač i oslobađaju iz ćelije. Nakon izlaska virusa ovakva ćelija umire.

1.4. Oboljenja udružena sa EBV infekcijom kao modeli patogeneze

Litička infekcija, kao i različite forme latentne infekcije, predstavljaju stadijume EBV životnog ciklusa, ali i osnove patogenetskih mehanizama različitih EBV udruženih oboljenja. Sve ove bolesti generalno se mogu podeliti na one koje se javljaju kod imunosuprimiranih pacijenata, i na one koje se javljaju kod pacijenata za koje nemamo jasan dokaz imunosupresije (Kutok i Wang, 2006).

1.4.1. Primarna infekcija: infektivna mononukleoza

Većina primarnih EBV infekcija ostaje klinički neprepoznata jer prolaze asimptomatski ili u vidu nespecifičnog virusnog sindroma. Za razliku od nerazvijenih i zemalja u razvoju, gde se infekcija najčešće javlja kod dece do tri godine starosti, u razvijenim zemljama češća je infekcija starije dece, adolescenata i mladih odraslih ljudi. Upravo kod male dece, prvi susret sa virusom prolazi asimptomatski. Izuzetno retko, on se ispoljava kao sindrom infektivne mononukleoze (IM). Kod adolescenata, međutim, ovaj sindrom je skoro obavezna manifestacija primoinfekcije.

Infektivna mononukleoza je samoograničavajuća limfoproliferativna bolest čiji se simptomi javljaju 4 do 6 nedelja posle infekcije. Pošto se pacijenti klinički prepoznaju tek posle dugog inkubacionog perioda, najraniji mehanizmi između virusa i ćelije nakon orofaringealnog kontakta sa salivom ostaju nedovoljno razjašnjeni. Klinička slika varira individualno, od niske temperature, bola u grlu, i blage malaksalosti, do višenedelnog tonzilofaringitisa sa otokom vrata i mogućom opstrukcijom, limfadenopatijom, zapaljenjem srednjeg uha, splenomegalijom i opštom malaksalošću. U laboratorijskom nalazu mogu se naći povišene vrednosti alanin i aspartat aminotransferaze (ALT i AST), kao i povišena vrednost laktatdehidrogenaze (LDH). Većina simptoma može nastati i delovanjem drugih infektivnih agenasa, a rezultat je dejstva proinflamatornih citokina IL-1, IFN- γ , TNF- α i korelira sa CD8 T limfocitozom (Rickinson i Kieff, 2007). Takođe, ovi simptomi mogu biti prisutni i u sklopu drugih bolesti. Zato je veoma teško postaviti sigurnu dijagnozu IM bez primene laboratorijskih testova. Ovi testovi mogu obuhvatiti nalaz limfocitoze sa atipičnim limfocitima u krvi, Paul-Bunnell ili Monospot test heterofilnih antitela, zatim dokazivanje i određivanje titra virus specifičnih antitela na pojedinačne virusne antigene, i konačno, dokazivanje virusne DNK. Najveća viremija dostiže se 2 nedelje nakon primarne infekcije, posle čega pada na veoma niske ili nedetektabilne vrednosti. Ako, međutim, ova viremija traje duže od 6 meseci zajedno sa simptomima mononukleoze i atipičnom serologijom, a u odsustvu imunosupresije, govorimo o hroničnoj aktivnoj EBV infekciji (Okano, i sar., 2005).

Preko inficirane salive EBV dospeva do orofaringealnog epitela gde se odvija virusna replikacija, odnosno litička infekcija, pa se u akutnoj fazi IM, preko orofarinksa izlučuju velike količine infektivnih virusa. Replikacijom u epitelu, EBV dolazi i do ciljnih subepitelnih B ćelija. Za vreme vrhunca kliničkih manifestacija, između 0.1% i 1% B ćelija periferne krvi sadrži EBV, i u njima se odvija III tip latencije. Ovi proliferišući B limfociti dalje mogu infiltrirati druga limfna tkiva kao što je tkivo tonzila. Invazija B limfocita stimuliše i snažan CD8+ T ćelijski odgovor, ali T limfociti pokazuju karakterističnu atipiju i mogu se videti u razmazu periferne krvi

IM pacijenata. Kao posledica ove nespecifične T ćelijske proliferacije javljaju se periferna limfocitoza, limfadenopatija i splenomegalija. Vremenom, T ćelijski odgovor redukuje broj inficiranih B limfocita, pa virus ulazi u latentnu fazu infekcije.

1.4.2. EBV infekcija kod imunokompromitovanih pacijenata: infekcija nakon transplantacije bubrega

Primaoci transplantiranih organa, pre svega solidnih organa (bubrega, srca i pluća), imaju jatrogenu imunosupresiju, pa se EBV limfoproliferativni poremećaji javljaju kao posledica nemogućnosti kontrole perzistentne virusne infekcije. Serološki status pacijenta pre transplantacije veoma je važan prediktivni faktor, pa je tako rizik za dobijanje EBV limfoproliferativnih poremećaja 20 puta viši kod seronegativnih recipijenata (Rickinson i Kieff, 2007). Mala deca zbog toga su u posebnom riziku. Posttransplantaciona limfoproliferativna bolest (engl. post-transplantation lymphoproliferative disorder, PTLD) obuhvata poremećaje B ćelijske proliferacije koji se mogu spontano povući, progredirati u limfoplazmocitoidno B ćelijsko širenje nalik inflamatornoj reakciji, ili voditi u letalnu klonalnu proliferaciju B limfocita identičnu NHL-u (Kutok i Wang, 2006). Svetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organisation, WHO) dala je podelu ovih bolesti, ali njihove razlike u kliničkoj praksi mogu biti vrlo diskretne: a) limfoidna hiperplazija nalik IM; b) poliklonalni PTLD; c) monoklonalni PTLD ekvivalentan B i T ćelijskom NHL-u; d) HL i PTLD nalik HL-u. Kliničku sliku najčešće karakteriše povišena temperatura, limfadenopatija, i vrlo retko akutna sistemska bolest. Umesto lokalizacije u tkivima samih nodusa, ovi tumori imaju i multifokalnu ektranodalnu distribuciju, pa često zahvataju i transplantirani organ ili gastrointestinalni trakt. U slučaju transplantacije bubrega, incidenca PTLD je 1-5% (Rickinson i Kieff, 2007).

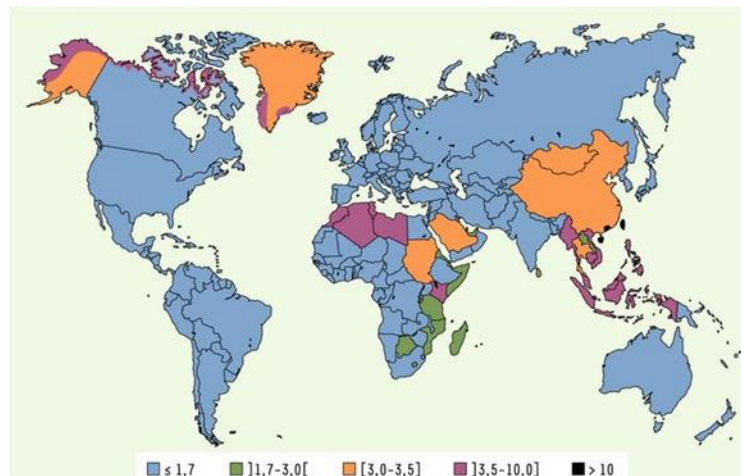
Većina posttransplantacionih limfoma nastaje u toku prve godine nakon transplantacije, kada je imunosupresija najintenzivnija. Virus koji je odgovoran za

njihov nastanak najčešće je poreklom od recipijenta. EBV viremija često se može dokazati i pre vidljivih lezija ili simptoma, pa se rutinski kontroliše kao prediktivni faktor za PTLD. U virusom transformisanim B limfocitima eksprimirani set gena odgovara III tipu latencije. Interesantno je da limfomi kod teške imunosupresije AIDS pacijenata pokazuju identičan fenotip. Kako su eksprimirani LMP-1 i EBNA-2, dolazi do ćelijske transformacije, a citotoksična T ćelijska funkcija je neefikasna da ovakve ćelije eliminiše. Kod pacijenata koji su primali EBV-specifične citotoksične T limfocite alogenih donora, poliklonalne EBV lezije su se povlačile (Kutok i Wang, 2006).

1.4.3. Karcinom povezan sa EBV infekcijom: nazofaringealni karcinom

Karcinomi nazofaringealnog epitela (NFK) klasifikovani su prema histopatološkim, diferencijalno dijagnostičkim, terapijskim i prognostičkim parametrima na: tip 1 ili keratinišući skvamozno-ćelijski karcinom, tip 2 ili nekeratinišući skvamozno-ćelijski karcinom i tip 3 ili nediferentovani karcinom nazofaringealnog tipa UCNT (engl. undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type) (Shanmugaratnam i Sobin, 1978). Najučestaliji tip je 3, dok se povezanost sa EBV jedino isključuje kod tipa 1 (Neel, Pearson i Taylor, 1984). U većem delu sveta, NFK predstavlja retkost, ali se južna Kina i jugoistočna Azija, sa incidencijom 20-30 na 100 000 ljudi godišnje, smatraju endemskim podnebljima (Slika 7.) (Jia i Qin, 2012). U Srbiji, kao i Evropi i SAD, incidencija je 0,5-1 na 100 000 ljudi godišnje, a dominantni tip je UCNT (Jemal, i sar., 2011). Ovaj tip tumora takođe je najčešći i u endemskim zemljama.

Nazofaringealni tumor nastaje kao rezultat kompleksne interakcije Epstein-Barr virusa, genetskih faktora domaćina i dejstva egzogenih kancerogena. Ovakva teorija zasnovana je na pojavi grupa krvnih srodnika sa većim brojem obolelih, iako ove grupe vode poreklo iz različitih geografskih regija (Zeng i Jia, 2002). EBV, koji je od strane IARC (engl. International Agency for Research and Cancer) uvršten u 1. grupu kancerogenih faktora, skoro je univerzalno povezan sa UCNT. Ova povezanost



Slika 7. Geografska distribucija incidencija nazofaringealnog karcinoma (preračunatih na 100 000 muškaraca godišnje). (Busson i sar., 2004.)

otkrivena je pronalaskom EBV receptora na faringealnim epitelnim ćelijama i virusnih epizoma u UCNT ćelijama (Siegler, i sar., 2004), (Raab-Traub i Flynn, 1986). Iako sve ćelije tumora sadrže monoklonalni virusni genom, što znači da se infekcija događa pre ekspanzije malignog ćelijskog klona, nepoznat je tačan trenutak kada uloga EBV infekcije postaje presudna za tok NFK onkogeneze (Kutok i Wang, 2006). Najznačajniji virusni onkoprotein LMP-1 dokazuje se u svim prekanceroznim lezijama, ali ne i u ćelijama karcinoma, što sugeriše značaj ovog proteina u ranoj transformaciji, ali ne i u daljoj onkogenezi (Pathmanathan, i sar., 1995). Međutim, postoje indirektni dokazi da ovaj protein može podstaći progresiju metastaza (Busson, i sar., 2004). Za razliku od LMP-1, sve ćelije tumora ekspimiraju EBNA-1 i EBER. Na osnovu ovakve ekspresije, tip latencije koji EBV infekcija uspostavlja u NFK, zapravo je između latencije tip I i II. Takođe, interesantno je da ćelije NFK nisu potpuno permisivne za EBV replikaciju (Kutok i Wang, 2006).

Prelazak iz latencije u litičku infekciju može biti ključni korak u razviću UCNT, iako do sada nije identifikovan specifičan induktor EBV reaktivacije. Ovaj prelazak moguće je identifikovati pomoću poznatih seroloških biomarkera koji uključuju

antitela sintetisana na produkte EBV litičkih gena, anti-VCA IgA i anti-Zta IgA (Chien, i sar., 2001). Danas je ovakvo serološko testiranje široko rasprostranjeno u skriningu i ranoj dijagnozi UCNT u endemskom delu južne Kine. Virusna reaktivacija, tj. replikacija koja korelira sa težinom tumora, dokazuje se određivanjem EBV viremije, kao dijagnostičkog, prognostičkog i terapijskog markera NFK pacijenata (Wang, Twu, i sar., 2010).

Epidemiološke studije definisale su pored EBV nekoliko faktora rizika za NFK koji obuhvataju specifičan stil života: pušenje, tradicionalne navike u ishrani (konzumiranje slane konzervirane ribe, konzumiranje konzerviranog povrća ili nedovoljno unošenje svežeg povrća i voća) i profesionalna izloženost hemijskim kancerogenima (Chang i Adami, 2006). Iako je za nekoliko hemijskih agenasa (forbol-12-miristat-13-acetat-TPA, sodium butirat i trihostatin A) opisan mehanizam aktivacije EBV litičke infekcije, pušenje je jedini faktor rizika za koji je utvrđena povezanost sa EBV seropozitivnošću (Xu, i sar., 2012). Takođe, dokazane su brojne genetske izmene u NFK ćelijama: delecije hromozoma 3p, 9p, 11q, 13q i 14q, kao i hipermetilacije specifičnih gena na hromozomima 3p (RASSF1A i receptor retinoinske kiseline $\beta 2$) i 9p (gena koji kodiraju INK4A, INK4B, ARF i protein kinaze regulatora ćelijske smrti). Ove izmene postoje u ranim displazijama, ali i kod ljudi sa visokim rizikom za dobijanje NFK. Dakle, genetske izmene nastaju u najranijim fazama maligne transformacije, i mogu predstavljati tzv. "pre-maligni" genetski status epitelnih ćelija u kojima će se odviti kancerogeneza (Lo i Huang, 2002) (Jia i Qin, 2012).

1.5. Genetička varijabilnost EBV

Otkriće razlika u genomima EBV izolovanih iz ćelijskih linija zapadnoafričkog Burkitt-ovog limfoma, Jijoye i AG876, u odnosu na prototipnu sekvencu B95-8, predstavlja početak istraživanja razlika genoma brojnih EBV izolata. Tako je, na

osnovu varijabilnosti latentnih EBV gena, izvršena klasifikacija na tipove, tj. genotipove, varijante i subtipove. Pretpostavka da određeni genotipovi i varijante imaju posebnu ulogu u nastanku tumora konstantno otvara mogućnosti istraživanja varijabilnosti genoma Epstein-Barr virusa. Sa mnogo više uspeha pokazan je tzv. geografski polimorfizam (Chang, i sar., 2009) (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999) (Khanim, i sar., 1996). Međutim, ovo ne isključuje mogućnost da su upravo varijacije određenih EBV gena odgovorne za različitu distribuciju maligniteta povezanih sa ovim virusom (Lawrence, i sar., 2007).

1.5.1. Varijabilnost EBNA-2 gena

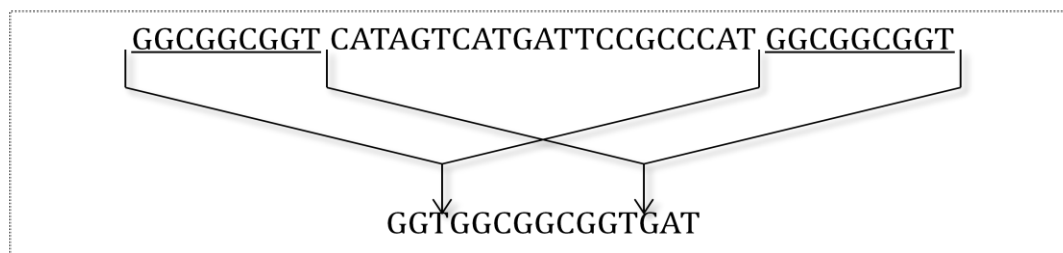
Polimorfizmi gena koji kodiraju EBV nuklearne antigene EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C i EBNA-LP predstavljaju osnov za podelu na EBV genotip 1 (A) i EBV genotip 2 (B) (Sample, i sar., 1990) (Chang, i sar., 2009). U zavisnosti od lokusa, genotipovi pokazuju 53-84% identičnosti među sekvencama, sa najmanjim varijacijama u okviru EBNA-2 gena. Zbog toga je osnovna genotipizacija Epstein-Barr virusa zapravo vezana za polimorfizam EBNA-2 gena. Definisanost genotipa 1 zasnovana je na sličnosti sa sekvencom B95-8 prototipa, dok je genotip 2 sličan sekvencama Jijoye i AG876 izolata (Lawrence, i sar., 2007).

Genotipovi pokazuju različitu geografsku distribuciju, pri čemu je genotip 1 učestaliji u većini populacija. Ipak, na južnoj hemisferi, pre svega Novoj Gvineji i ekvatorijalnoj Africi, distribucija oba genotipa približno je jednaka (Thomson i Kurzrock, 2004). Primera radi, genotip 2 se može naći u skoro polovini endemskih Burkitt-ovih limfoma Afrike, dok je genotip 1 zastupljen u 85% endemskih nazofaringealnih karcinoma Tajvana (Thomson i Kurzrock, 2004). Primećeno je, takođe, da imunokompromitovani nosioci najčešće imaju oba EBV genotipa, što se uglavnom objašnjava kao superinfekcija tipom 2 u toku imunosupresije (Borisch, i sar., 1992) (Chang, i sar., 2009). Kako tehnologija genotipizacije napreduje, tako sve više studija pokazuje da su i mnoge imunokompetentne osobe nosioci dva tipa virusa

(Lawrence, i sar., 2007). *In vitro* studije pokazale su da izolati genotipa 1 imaju veći potencijal za B ćelijsku transformaciju, kao i da genotipom 2 transformisani limfociti sporije rastu (Buisson, i sar., 1994).

1.5.2. Varijabilnost LMP-1 gena

Polimorfizam LMP-1 gena predstavljen je varijabilnošću sekvenci C-terminalnog i N-terminalnog domena, s tim da je varijabilnost konzistentnija u okviru C-terminusa. Definisani su EBV LMP-1 tipovi ili varijante, među kojima su poznatije varijante utvrđene mutacijama u okviru C-terminalne sekvence. Do sada su opisane različite delecije, od kojih je najznačajnija delecija od 30 baznih parova (30-bp del) (Slika 8.), insercije različitog broja ponovaka od 33 bazna para (33-bp ponovci) kao i zamene nukleotida, odnosno amino kiselina. Glavni polimorfizam N-terminalnog kraja čini odsustvo XhoI restrikcionog mesta (Chang, i sar., 2009).



Slika 8. 30-bp LMP-1 delecija EBV B95-8 prototipne sekvence. Jedan od 2 nukleotidna ponovka veličine 9-bp, koja kodiraju po 3 Gly, sadržan je u okviru delecije kao njen početak ili kraj.

Smatra se da pojedine LMP-1 varijante imaju različit onkogeni potencijal, kao i da između njih postoji različita geografska distribucija (Knecht, Bachmann, i sar., 1993). Tako je pokazano da za razliku od EBV bez delecije, virus koji poseduje 30-bp del ima veći onkogeni, a manji imunogeni potencijal (Lyons i Liebowitz, 1998).

Takođe, ova delecija produžava poluživot LMP-1, naročito kod imunosuprimiranih domaćina (Moorthy i Thorley-Lawson, 1993). Ipak, još uvek je nejasno da li su izolati sa delecijom povlašćeni prilikom selekcije tokom latencije i patogeneze (Kingma, i sar., 1996) (Larcher, Bernhard, i sar., 2003). Na primer, postoji neslaganje u učestalosti 30-bp del među izolatima iz ispirka guše (20%) kao i iz biopsija postnazalnog prostora (100%) istog pacijenta sa nazofaringealnim karcinomom (Tan, Peh i Sam, 2003).

Tabela 2. Edwards-ovi kriterijumi klasifikacije LMP-1 varijanti prema mutacijama koje dovode do substitucija amino kiselina karakterističnih lokusa

Varijanta	Lokus	Amino kiselina
Kina 1	229	Ser
	334	Gln u Arg
	344	Delecija
Kina 2	344	Gly u Asp
Mediteran	229	Ser u Thr
	322	Gln u Glu
	344	Gly ili delecija
Kina 3	229	Ser
	322	Gln
	334	Gln
	338	Leu u Ser
	344	Delecija
Aljaska	229	Ser
	312	Asp u Asn
	322	Gln u Lys
	334	Gln
	344	Gly
Severna Karolina	229	Ser
	306	Leu u Gln
	312	Asp
	322	Gln u Thr
	334	Gln
	344	Gly
B95-8	229	Ser
	306	Leu
	312	Asp
	322	Gln
	334	Gln
	338	Leu
	344	Gly

Do sada je izolovano sedam LMP-1 varijanti iz kliničkih uzoraka: B95-8, Aljaska (AL), Kina 1, Kina 2, Kina 3, Mediteran (sa subvarijantama Med + sa delecijom i Med – bez delecije), i Severna Karolina (SK, engl. North Carolina) (Miller, i sar., 1994) (Sung, i sar., 1998) (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999). Ove varijante definišu sekvence njihovih kodirajućih regiona, kao i brojne pojedinačne zamene amino kiselina u odnosu na prototip B95-8, dok su im imena dodeljena prema geografskom poreklu prvih izolata (Tabela 2.) (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999). Takođe, opisane su i delecije u okviru regiona CTAR-1 i CTAR-2, koje dovode do gubitka 10 amino kiselina između ova dva regiona. Nađene su u Kina 1 i Med+ izolatima (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999).

1.5.3. Varijabilnost EBNA-1 gena

Varijabilnost EBNA-1 gena prvo je ispitivana u okviru C-terminalnog regiona kod izolata NFK (Snudden, i sar., 1995). Nakon toga, analizom sekvenci različitih izolata, definisano je pet EBNA-1 subtipova na osnovu različitih aminokiselina na kodonu 487: dva prototipa, P-ala (prisutan kod B95-8) i P-thr i 3 varijante V-val, V-pro, V-leu (Tabela 3.) (Bhatia, i sar., 1996). Prototipni subtipovi se pored substitucije na lokusu 487 razlikuju u još 3 amino kiseline od B95-8, a varijante u još 15 amino kiselina (Gutierrez, i sar., 1997). Daljom klasifikacijom dobijene su i subvarijante na osnovu dodatnih supstitucija van mesta 487 (Sandvej, Zhou i Hamilton-Dutoit, 2000) (Do, i sar., 2008) (Lorenzetti, Altchek, i sar., 2010). Varijanta V-ala dodatak je postojećoj klasifikaciji. Ona nema mutaciju na lokusu 487, ali ima drugih 6 mutacija u odnosu na prototipnu sekvencu (Chang, i sar., 2009).

Brojne studije upućuju na zaključak da EBNA-1 varijabilnost omogućava različit tropizam virusa, odnosno širok spektar maligniteta (Puchhammer-Stockl i Gorzer, 2006) (Sandvej, Zhou i Hamilton-Dutoit, 2000). Takođe je moguća i korelacija sa progresijom nazofaringealnog karcinoma (Wang, i sar., 2003). Ipak, ima i onih

Tabela 3. Klasifikacija EBNA-1 subtipova prema mutacijama koje dovode do substitucija amino kiselina na karakterističnim lokusima C-terminalnog domena

	P-ala	P-thr	V-val	V-pro	V-leu	V-ala
Lokus	Amino kiselina/ Kodon					
471	CAA/Gln			Glu	Glu/GAA	
475	AAC/Agn				Ser/AGC	
476	CCG/Pro	CAG/Gln		Gln	Gln/CAG	
479	GAG/Glu	CAG/Gln				
487	GCT/Ala	ACT/Thr	GTT/Val	Pro/CCT	Leu/CTT	
492	AGT/Ser	TGT/Cys		Cys/TGT	Cys/TGT	
499	GAC/Asp	GAT/Asp	GAG/Glu	Glu/GAG	Glu/GAG	Glu/GAG
500	GAA/Glu			Asp/GAT	Asp/GAT	Asp/GAT
502	ACT/Thr		AAT/Asn	Asn/AAT	Asn/AAT	Asn/AAT
517	CTT/Leu					Leu/TTA
520	CTA/Leu	CTC/Leu	CTC/Leu		Leu/CTC	Leu/CTC
524	ACT/Thr	ATT/Ile	ATT/Ile	Ile/ATT	Ile/ATT	Ile/ATT
525	GCC/Ala	(GGC/Gly)		Gly/GGC	Gly/GGC	
528	ATT/Ile		(GTT/Val)			
533	CTT/Leu		ATT/Ile			

istraživanja koja ovakve veze opovrgavaju (Puchhammer-Stockl i Gorzer, 2006) (Sandvej, Zhou i Hamilton-Dutoit, 2000). Pored toga, utvrđena je različita geografska distribucija EBNA-1 subtipova i varijanti. Na primer, V-val se pojavljuje kao predominantan u Kini, V-leu u Americi i Africi, a P-thr i P-ala u nekim delovima Evrope (Lorenzetti, Altchek, i sar., 2010).

Na N-terminalnom kraju, genetičke izmene karakteristične su za kodone 16, 24 i 27 (Chang, i sar., 2009).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA



Planom istraživanja određeni su sledeći ciljevi:

- ✓ Određivanje prisustva EBV DNK u uzorcima pacijenata sa različitim oboljenjima udruženim sa Epstein-Barr virusnom infekcijom;
- ✓ Identifikacija i određivanje zastupljenosti EBNA-2 genotipa, varijanti i subvarijanti na nivou LMP-1 gena i subtipova i subvarijanti na nivou EBNA-1 gena;
- ✓ Filogenetska analiza EBV izolata i identifikacija novih, geografski specifičnih mutacija;
- ✓ Utvrđivanje moguće povezanosti polimorfizama različitih EBV gena, specifičnih mutacija i prirode oboljenja.

3. MATERIJAL I METODOLOGIJA



Istraživanje predviđeno temom ove doktorske disertacije rađeno je u periodu od aprila 2008. do aprila 2014. godine.

Dizajn studije je studija preseka.

Sve laboratorijske procedure obavile su se u virusološkoj laboratoriji Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.1. Pacijenti

Istraživanje je obuhvatilo 360 pacijenata sa različitim EBV-udruženim oboljenjima koji su dali pisani informisani pristanak za učešće u ovoj studiji. Kriterijum za uključivanje pacijenata u ispitivanje bila je dijagnoza njihove osnovne bolesti: infektivna mononukleoza, transplantacija bubrega ili nazofaringealni karcinom. U zavisnosti od frekventnosti bolesnika sa specifičnom dijagnozom osnovne bolesti u izabranim ustanovama, definisan je i period sakupljanja uzoraka.

Prvu grupu činilo je 128 pacijenata sa dijagnozom infektivne mononukleoze koji su lečeni na Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog Centra Srbije u periodu od aprila 2008. do decembra 2010. godine. Sedamdesetjedan pacijent bio je muškog (55,5%), a 57 ženskog pola (44,5%). Starost ispitivanih pacijenata kretala se od 15 do 38 godina (prosečna starost: $23,55 \pm 3,24$). Dijagnoza je postavljana na osnovu kliničke slike, Paul-Bounell testa ili nalaza atipičnih limfocita u razmazu krvi. Devedesetjedan pacijent imao je takvu kliničku sliku i nalaz biohemijskih parametara da je hospitalizacija bila neophodna: produžena malaksalost, povišena temperatura, bol u grlu, limfadenopatija, moguća hepatomegalija, splenomegalija, povišeni alanin i aspartat aminotransferaze (ALT i AST) i laktatdehidrogenaza (LDH).

Drugu grupu, činilo je 116 pacijenata kojima je izvršena transplantacija bubrega, i koji se leče na Klinici za urologiju Kliničkog Centra Srbije u periodu od aprila 2008. do aprila 2014. godine. Sedamdesetjedan pacijent bio je muškog (61,2%), a 45 ženskog pola (38,8%). Starost ispitivanih pacijenata kretala se od 18 do 73 godine (prosečna starost: $37,44 \pm 16,24$). Njihovi uzorci su slani u virusološku laboratoriju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu radi laboratorijske dijagnostike aktivne EBV infekcije, koja je deo obaveznog protokola posttransplantacionog skrininga virusnih infekcija.

U poslednju grupu uključeno je 116 pacijenata sa nazofaringealnim karcinomom tipa UCNT lečenih u periodu od 2008. do 2013. godine na Klinici za

Otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Kliničkog Centra Srbije. Osamdesetpet pacijenata bili su muškarci (73,3%), a 31 žene (26,7%). Starost ispitivanih pacijenata kretala se od 18 do 78 godina (prosečna starost: 54,03 ± 13,06). Nakon endoskopije, njihova dijagnoza postavljena je na osnovu patohistološkog pregleda bioptata. Terapija ovih pacijenata, u zavisnosti od stadijuma bolesti, obuhvatala je: radioterapiju (RT) kao osnovni režim lečenja, zatim hemioterapiju (HT), radio-hemioterapiju (RHT), hirurško ili samo simptomatsko lečenje. Prema dostupnim podacima, ovi pacijenti klasifikovani su na osnovu 6 različitih kriterijuma: pol (muško/žensko); prebivalište (Vojvodina, Beograd, Šumadija sa Zapadnom Srbijom, Jugoistočna Srbija, Kosovo i Metohija); pušenje (pušač/nepušač); postojanje prethodnog oboljenja (ima/nema); TNM klasifikacija prema Američkom udruženju za karcinome, AJCC (engl. The American Joint on Cancer) (Tx, I, II, III, IVA, IVB, IVC); poslednji poznati ishod bolesti (Ter-terapija u toku, KR-kompletna remisija, PR-parcijalna regresija, S-stabilizacija, P-progresija i/ili prisustvo metastaza).

3.2. Klinički uzorci

Pacijentima sa infektivnom mononukleozom i pacijentima sa transplantiranim bubregom uzimani su uzorci krvi u vakutajnerima sa dodatkom EDTA (Becton Dickenson Vacutainer Systems, Plimut, Velika Britanija). Nakon dostave u virusološku laboratoriju, bez prethodnog zamrzavanja, uzorci pune krvi centrifugirani su 10 minuta na 2500 x g kako bi se izdvojili slojevi: plazma na površini, bela loza (engl. "buffy coat") u sredini i eritrociti u vidu taloga. Virusna DNK je izolovana iz 200 µl izdojenog sloja "buffy coat" sa plazmom. U slučaju naknadne izolacije, ovako izdvojen sloj zamrzavao se i čuvao na -70°C.

Od pacijenata sa UCNT laboratorijski su obrađivani trajni parafinski kalupi tkiva arhivirani u periodu od 2008-2013. godine. Virusna DNK je izolovana iz prethodno isečenih listića parafinskih kalupa.

3.3. Metodologija

3.3.1. Deparafinizacija

Neophodna priprema parafinskih kalupa tkiva radi uspešnog izolovanja virusne DNK, obuhvatala je sledeći protokol:

- Isecanje listića parafinskog kalupa histopatološkim nožem u debljini od 5-10 μm . Kako ne bi došlo do kontaminacije, posle svakog kalupa sledi dezinfekcija noža 70% alkoholom. Na kraju je neophodno pakovanje po 3 listića svakog kalupa u tubicu od 1,5 ml i čuvanje na sobnoj temperaturi.
- Dodavanje 1200 μl ksilena prethodno zagrejanog na temperaturi 57°C radi uklanjanja parafina, sa energičnim mešanjem vorteksovanjem 10 sekundi.
- Centrifugiranje na maksimalnoj brzini, 5 minuta na sobnoj temperaturi.
- Uklanjanje supernatanta pažljivim pipetiranjem bez narušavanja taloga.
- Dodavanje ksilena sa vorteksovanjem, centrifugiranjem i uklanjanjem supernatanta ponavlja se još dva puta.
- Dodavanje 1200 μl etanola (96-100%) radi uklanjanja viška ksilena sa mešanjem vorteksovanjem 5-10 sekundi.
- Centrifugiranje na maksimalnoj brzini, 5 minuta na sobnoj temperaturi.
- Uklanjanje etanola pažljivim pipetiranjem bez narušavanja taloga.
- Dodavanje etanola sa vorteksovanjem, centrifugiranjem i uklanjanjem supernatanta ponavlja se još dva puta.
- Inkubacija otvorene tubice na 37°C 30-60 minuta dok etanol ne ispari.
- Resuspenzija taloga tkiva u 180 μl ATL pufera iz komercijalnog kita QIAamp Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) za izolovanje virusne DNK.

3.3.2. Izolovanje virusne DNK iz tkiva

Resuspendovanom tkivu u tubici dodaje se QIAGEN proteaza K (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka), a nakon mešanja sledi inkubacija preko noći na temperaturi od 56°C sa povremenim mešanjem. Kada tkivo potpuno lizira, sledi se protokol komercijalnog kita QIAamp DNA mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača sa malim izmenama:

- Dodavanje AL pufera, sa mešanjem vorteksovanjem i inkubacija smeše na 70°C tokom 10 minuta. U ovom koraku dolazi do lize ćelijskih membrana i denaturacije proteina.
- Dodavanje etanola (96-100%) sa mešanjem i centrifugiranjem tubice sa QIAamp Mini kolonom kada dolazi do vezivanja DNK za silicijumsku membranu kolone.
- Ispiranje puferima AW1 i AW2 sa centrifugiranjem.
- Dodavanje pufera za eluciju (AE) sa inkubacijom od 1 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim i centrifugiranje gde se izolovana DNK dobija kao konačni filtrat u volumenu od 25 µl.

3.3.3. Izolovanje virusne DNK iz krvi

Iz pripremljenih uzoraka krvi izolovanje virusne DNK vršeno je primenom komercijalnog kita QIAamp DNA mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka). Prema uputstvu proizvođača, sa malim izmenama, izolovanje je obuhvatalo sledeći protokol:

- Dodavanje QIAGEN proteaze i AL pufera na 200 µl uzorka, a zatim mešanje vorteksovanjem i inkubacija smeše na 56°C tokom 30 minuta. U ovom koraku dolazi do lize ćelijskih membrana i denaturacije proteina.

- Dodavanje etanola (96-100%) sa mešanjem i centrifugiranjem tubice sa QIAamp Mini kolonom kada dolazi do vezivanja DNK za silicijumsku membranu kolone.
- Ispiranje puferima AW1 i AW2 sa centrifugiranjem.
- Dodavanje pufera za eluciju (AE) sa inkubacijom od 1 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim i centrifugiranje gde se izolovana DNK dobija kao konačni filtrat u volumenu od 25 µl.

3.3.4. Dokazivanje i genotipizacija EBNA-2 gena nested-PCR metodom

Za dokazivanje i identifikovanje EBNA-2 genotipova, vršene su po dve PCR reakcije za dokazivanje svakog genotipa. Prvi set prajmera koristio se za umnožavanje skoro čitave dužine EBNA-2 gena, a nakon toga su se radile dve odvojene nested-PCR reakcije koristeći genotip-1, odnosno, genotip-2 specifične prajmere (Tabele 4., 5. i 6.) (Mendes, i sar., 2008).

Tabela 4. Nukleotidna sekvenca spoljašnjeg para prajmera za EBNA-2 umnožavanje

Položaj u genomu EBV	Nukleotidna sekvenca	Veličina PCR produkta
nt 48810-48829	5' - AGGGATGCCTGGACACAAGA - 3'	596 bp
nt 49385-49406	5' - TGGTGCTGCTGGTGGTGGCAAT - 3'	

Tabela 5. Nukleotidna sekvenca unutrašnjeg para prajmera za EBNA-2 genotip-1 umnožavanje

Položaj u genomu EBV	Nukleotidna sekvenca	Veličina PCR produkta
nt 48839-48862	5' - TCTTGATAGGGATCCGCTAGGATA - 3'	497 bp
nt 49335-49311	5' - ACCGTGGTTCTGGACTATCTGGATC - 3'	

Tabela 6. Nukleotidna sekvenca unutrašnjeg para prajmera za EBNA-2 genotip-2 umnožavanje

Položaj u genomu EBV	Nukleotidna sekvenca	Veličina PCR produkta
*	5' – CATGGTAGCCTTAGGACATA - 3'	150 bp
	5' - AGACTTAGTTGATGCCCTAG - 3'	

* nisu specifični za B95-8 referentnu sekvencu

PCR smešu prve reakcije, u volumenu od 25 µl, činilo je:

- 12,5 µl Qiagen TaqPCR Master Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- po 0,5 µl svakog od spoljašnjih prajmera koncentracije 25µM/ml (“forward” i “reverse”) (Invitrogen by Life technologies, Carlsbad, California, USA),
- 5 µl izolovane DNK iz uzorka i
- 6,5 µl vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

PCR smeše drugih reakcija (za genotip-1, odnosno genotip-2), u volumenima od po 25 µl, činilo je:

- 12,5 µl Qiagen TaqPCR Master Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- po 0,5 µl svakog od unutrašnjih prajmera koncentracije 25µM/ml (“forward” i “reverse”) (Invitrogen by Life technologies, Carlsbad, California, USA),
- 5 µl PCR produkta prve reakcije i
- 6,5 µl vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

Umnožavanje prve reakcije vršeno je u PCR termosajkleru “Master Cycler Gradient” (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), prema sledećem protokolu: nakon inicijalne denaturacije na 95°C - 5 min, usledilo je 40 ciklusa 95°C – 1 min, 50°C – 1 min, 72°C – 1 min, a zatim i finalna elongacija na 72°C – 10 min.

Umnožavanje druge reakcije za genotip-1 vršeno je u PCR termosajkleru "Master Cycler Gradient" (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), prema sledećem protokolu: nakon inicijalne denaturacije na 95°C - 5 min, usledilo je 40 ciklusa 95°C - 1 min, 50°C - 1 min, 72°C - 1 min, a zatim i finalna elongacija na 72°C - 10 min.

Umnožavanje druge reakcije za genotip-2 vršeno je u PCR termosajkleru "Master Cycler Gradient" (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), prema sledećem protokolu: nakon inicijalne denaturacije na 95°C - 5 min, usledilo je 40 ciklusa 95°C - 1 min, 47°C - 1 min, 72°C - 1 min, a zatim i finalna elongacija na 72°C - 10 min.

U sve tri reakcije, uz uzorke, pripremane su i pozitivne kontrole za svaki genotip (sa uzorcima pozitivnim na EBV DNK genotip-1/2) i negativna kontrola (bez EBV DNK). Na taj način omogućena je kontrola ispravnosti same procedure, kao i kontrola prisustva kontaminacije.

3.3.5. Dokazivanje LMP-1 gena nested-PCR metodom

Umnožavanje dela C terminalnog regiona LMP-1 gena vršeno je korišćenjem dva seta prajmera, spoljašnjih i unutrašnjih, za prvi, odnosno drugi PCR (Tabele 7. i 8.) (Li, i sar., 2009). Navedeni prajmeri ograničavaju 169 aminokiselina (ak) sa karakterističnim regionom delecije od 10 ak.

Tabela 7. Nukleotidna sekvenca spoljašnjeg para prajmera za LMP-1 umnožavanje

Položaj u genomu EBV	Nukleotidna sekvenca	Veličina PCR produkta
nt 168744-168722	5' - GCTAAGGCATTCCCAGTAAA - 3'	663 bp
nt 168100-168081	5' - GATGAACACCACCACGATG - 3'	

Tabela 8. Nukleotidna sekvenca unutrašnjeg para prajmera za LMP-1 umnožavanje

Položaj u genomu EBV	Nukleotidna sekvenca	Veličina PCR produkta
nt 168719-168701	5' - CGGAACCAGAAGAACCCA - 3'	506 bp
nt 168231-168213	5' - TCCCGCACCTCAACAAG - 3'	

PCR smešu prve reakcije, u volumenu od 25 µl, činilo je:

- 12,5 µl Qiagen TaqPCR Master Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- po 1 µl svakog od spoljašnjih prajmera koncentracije 25µM/ml (“forward” i “reverse”) (Invitrogen by Life technologies, Carlsbad, California, USA),
- 5 µl izolovane DNK iz uzorka i
- 5,5 µl vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

PCR smešu druge reakcije, u volumenu od 25 µl, činilo je:

- 12,5 µl Qiagen TaqPCR Master Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- po 1 µl svakog od unutrašnjih prajmera koncentracije 25µM/ml (“forward” i “reverse”) (Invitrogen by Life technologies, Carlsbad, California, USA),
- 5 µl PCR produkta prve reakcije i
- 5,5 µl vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

Umnožavanje prve, kao i druge reakcije, vršeno je u PCR termosajkleru “Master Cycler Gradient” (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), prema sledećem protokolu: nakon inicijalne denaturacije na 95°C - 5 min, usledilo je 40 ciklusa 95°C – 1 min, 47°C – 1 min, 72°C – 1 min, a zatim i finalna elongacija na 72°C – 10 min.

U obe reakcije, uz uzorke, pripremane su i pozitivna (sa EBV DNK) i negativna kontrola (bez EBV DNK), radi kontrole ispravnosti same procedure, kao i kontrole prisustva kontaminacije.

3.3.6. Dokazivanje EBNA-1 gena nested PCR metodom

Umnožavanje dela C terminalnog regiona EBNA-1 gena vršeno je korišćenjem dva seta prajmera, spoljašnjih i unutrašnjih, za prvi, odnosno drugi PCR (Tabele 9. i 10.) (Lorenzetti, Altchek, i sar., 2010).

Tabela 9. Nukleotidna sekvenca spoljašnjeg para prajmera za EBNA-1 umnožavanje

Položaj u genomu EBV	Nukleotidna sekvenca	Veličina PCR produkta
nt 109218-109236	5' - AGATGGTGAGCCTGACGTG - 3'	464 bp
nt 109663-109682	5' - GCATCCTTCAAAACCTCAGC - 3'	

Tabela 10. Nukleotidna sekvenca unutrašnjeg para prajmera za EBNA-1 umnožavanje

Položaj u genomu EBV	Nukleotidna sekvenca	Veličina PCR produkta
nt 109261-109280	5' - CCCGCAGATGACCCAGGAGA - 3'	329 bp
nt 109570-109590	5' - GGGTCCAGGGGCCATTCCAAA - 3'	

PCR smešu prve reakcije, u volumenu od 25 μ l, činilo je:

- 12,5 μ l Qiagen TaqPCR Master Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- po 1 μ l svakog od spoljašnjih prajmera koncentracije 25 μ M/ml (“forward” i “reverse”) (Invitrogen by Life technologies, Carlsbad, California, USA),
- 5 μ l izolovane DNK iz uzorka i
- 5,5 μ l vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

PCR smešu druge reakcije, u volumenu od 25 μ l, činilo je:

- 12,5 μ l Qiagen TaqPCR Master Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- po 1 μ l svakog od unutrašnjih prajmera koncentracije 25 μ M/ml (“forward” i “reverse”) (Invitrogen by Life technologies, Carlsbad, California, USA),
- 2,5 μ l PCR produkta prve reakcije i
- 8 μ l vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

Umnožavanje prve reakcije vršeno je u PCR termosajkleru “Master Cycler Gradient” (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), prema sledećem protokolu: nakon inicijalne denaturacije na 95°C - 5 min, usledilo je 40 ciklusa 94°C – 1 min, 57°C – 2 min, 72°C – 90 sek, a zatim i finalna elongacija na 72°C – 10 min.

Umnožavanje druge reakcije vršeno je u PCR termosajkleru “Master Cycler Gradient” (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), prema sledećem protokolu: nakon inicijalne denaturacije na 95°C - 5 min, usledilo je 40 ciklusa 94°C – 1 min, 60°C – 2 min, 72°C – 90 sek, a zatim i finalna elongacija na 72°C – 10 min.

U obe reakcije, uz uzorke, pripremane su i pozitivna (sa EBV DNK) i negativna kontrola (bez EBV DNK), radi kontrole ispravnosti same procedure, kao i kontrole prisustva kontaminacije.

3.3.7. Vizuelizacija nested-PCR produkata – elektroforeza u agaroznom gelu

Za očitavanje dobijenih PCR produkata korišćena je elektroforeza u 2% agaroznom gelu. Električno polje uspostavljeno je povezivanjem sistema za elektroforezu sa izvorom struje od 80 V. Blago alkalnu sredinu činio je Tris-acetat-EDTA (TAE) pufer. U bunarčice gela unošeno je po 6 µl nested-PCR produkata pomešanih sa 2 µl pufera za punjenje (engl. Loading buffer – 250 mg/ml saharoze i 2,5 mg/ml bromofenol plavog).

Za vizuelizaciju molekula DNK u gelu koristio se etidijum bromid (1% rastvor, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka) koji ima sposobnost umetanja između DNK lanaca i fluoresciranja pod UV svetlom. On je dodat agaroznom gelu u finalnoj koncentraciji od 0,2 µg/ml.

Kompjuterskim sistemom za fotodokumentaciju položaj dobijenih nested-PCR produkata u gelu poređen je sa položajem DNK markera (engl. ladder) od 100-1000 bp (DNK Standard 100 bp – Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka). Pozitivnim nalazima, smatralo se prisustvo sledećih produkata:

- 497 bp za genotip 1 EBNA-2 gena,
- 150 bp za genotip 2 EBNA-2 gena,
- 506 bp za LMP-1 gen,
- 329 bp za EBNA-1 gen.

Pozitivni uzorci zamrzavani su na -20°C do DNK sekvenciranja.

3.3.8. DNK sekvenciranje

Za određivanje LMP-1 varijanti, kao i EBNA-1 subtipova i subvarijanti korišćena je metoda DNK sekvenciranja. Takođe, pomoću ove metode, bilo je moguće otkriti specifične mutacije, delecije i insercije.

Način sekvenciranja bazirao se na metodi završetka lanca sa fluorescentno obeleženim didezoksiribonukleotidima (engl. dye-terminator sequencing) (Sanger, Nichlen i Coulson, 1977). Postupak je obuhvatao prečišćavanje PCR produkta, zatim reakciju cikličnog sekvenciranja (engl. cycle sequencing), prečišćavanje produkta cikličnog sekvenciranja, i konačno, kapilarnu elektroforezu u automatskom sekvencioneru. Analiza DNK sekvence vršeno je kompjuterski.

3.3.8.1. Prečišćavanje PCR produkta

Za prečišćavanje PCR produkta korišćen je QIAGEN MinElute Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka). Prema uputstvu proizvođača, uz male izmene, postupak je obuhvatao sledeće:

- Dodavanje PB pufera PCR produktu (8-15 μ l u zavisnosti od količine nested-PCR produkta) u tubici sa MinElute kolonom, kada dolazi do vezivanja DNK za silicijumsku membranu. PH indikator PB pufera omogućava proveru pH uslova za vezivanje DNK za membranu. Dakle, neophodan pH je ispod 7,5 kada je boja miksa bledo-žuta.
- Centrifugiranje kako bi se odstranili enzimi, prajmeri i nukleotidi iz PCR reakcije.
- Dodavanje i dvostruko centrifugiranje sa PE puferom kada se odstranjuju soli PB pufera.
- Dodavanje EB pufera za eluciju sa inkubacijom i centrifugiranjem. Dobijeni filtrat predstavlja koncentrovanu prečišćenu DNK u volumenu od 8 μ l.

3.3.8.2. Reakcija cikličnog sekvenciranja – Cycle Sequencing

Reakcija cikličnog sekvenciranja rađena je za svaki DNK lanac pojedinačno (“forward” i “reverse”). Dakle, za svaki uzorak rađene su po dve reakcije. Korišćen je Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, SAD) i prethodno navedeni unutrašnji prajmeri LMP-1 i EBNA-1 gena. Na taj način, određivane su sekvence dužine 506 bp za LMP-1 i 329 bp EBNA-1 gena.

Reakcione smeše sadržale su: Big Dye Terminator Mix (DNK polimeraza, smeša deoksi- i fluorescentno obeleženih dideoksi-ribonukleotida), Big Dye Terminator pufer, po jedan unutrašnji prajmer (0,25 μ M), 2 μ l prečišćenog PCR produkta i vodu (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) do ukupne zapremine od 10 μ l.

Sve reakcije cikličnog sekvenciranja vršene su u PCR termosajkleru “Master Cycler Gradient” (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) prema sledećem protokolu: nakon inicijalne denaturacije na 96°C tokom 1 minuta, usledilo je 40 ciklusa: 96°C – 10 sek, 50°C – 5 sek, 60°C – 4min.

3.3.8.3. Prečišćavanje produkata cikličnog sekvenciranja

Pre kapilarne elektroforeze, produkti cikličnog sekvenciranja prečišćavani su 75% izopropanolom u odnosu 1:8. Nakon dodavanja izopropanola, sledila je inkubacija 15 minuta u mraku i centrifugiranje 45 minuta na 2000 x g. Supernatant se odbacivao, a onda su se okrenute tubice ponovo centrifugirale 2 minuta na 700 x g kako bi se izopropanol kompletno odstranio. Konačno, tubice sa istaloženom DNK su se sušile u mraku 60 minuta.

3.3.8.4. Kapilarna elektroforeza u automatskom sekvencioneru i analiza elektroferograma

Priprema za kapilarnu elektroforezu obuhvatala je i denaturaciju DNK. Zbog toga su produkti cikličnog sekvenciranja resuspendovani u 10-35 µl Hi-Di TM formamida (Applied Biosystems, Foster City, SAD) u zavisnosti od jačine inicijalnog nested-PCR produkta. Zatim je vršena denaturacija u PCR termosajkleru "Master Cycler Gradient" (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) prema sledećem protokolu: 95°C – 2 minuta i 4°C – 2 minuta.

Kapilarna elektroforeza vršena je u ABI Prism 310 Genetic Analyser system-u (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Za analizu sekvenci korišćen je Sequence Analysis 5.1 softver (Applied Biosystems, Foster City, SAD). U njemu su analizirani elektroferogrami, tj. grafički zapisi svake sekvence, a samo oni koji su imali dovoljan kvalitet u intenzitetu signala, kao i dužini i čistoći sekvence, ulazili su u proceduru dalje obrade.

Kako je sekvenciranje rađeno sa svaki lanac DNK pojedinačno, dobijene "forward" i "reverse" sekvence istih uzoraka morale su međusobno da se spajaju. Na taj način dodatno je unapređen kvalitet sekvenci svakog od uzoraka.

3.3.9. Analiza DNK sekvenci

3.3.9.1. Određivanje varijanti i subvarijanti LMP-1 gena

Za analizu dobijenih sekvenci LMP-1 gena, veličine 506 bp, korišćen je ClustalW metod u okviru MEGA softvera (MEGA version 6.0) (Tamura, Stecher, i sar., 2013). U njemu su poređene sve dobijene LMP-1 sekvence sa referentnim sekvencama za svaku poznatu varijantu LMP-1 gena (engl. multiple alignment). Referentne

sekvence preuzete su iz GenBank/EMBL/DDBJ genske internet baze podataka. Zatim je definisan najadekvatniji model evolucije za region koji je sekvenciran, korišćenjem jModelTest 2.1.4. (Darriba, i sar., 2012). Konačno, konstruisano je filogenetsko stablo na način opisan u poglavlju 3.3.9.3.

Konačna identifikacija LMP-1 varijanti rađena je pomoću BioEdit softvera (Hall, 1999). Dobijene LMP-1 sekvence poređene su sa referentnom sekvencom "divljeg" soja (engl. wild-type) kako bi se ispitalo prisustvo karakterističnih mutacija svake od 7 LMP-1 varijanti koje je opisao Edwards sa saradnicima (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999). Inspekcijom pojedinačnih ak dokazivane su i nove, do sada neklasifikovane mutacije.

3.3.9.2. Određivanje subtipova i subvarijanti EBNA-1 gena

Za analizu dobijenih sekvenci EBNA-1 gena, veličine 329 bp, korišćen je ClustalW metod u okviru MEGA softvera (MEGA version 6.0) (Tamura, Stecher, i sar., 2013). U njemu su poređene sve EBNA-1 sekvence sa referentnom sekvencom B95-8 preuzetom iz GenBank/EMBL/DDBJ genske internet baze podataka (engl. multiple alignment). Zatim je definisan najadekvatniji model evolucije za region koji je sekvenciran, korišćenjem jModelTest 2.1.4. (Darriba, i sar., 2012). Konačno, konstruisano je filogenetsko stablo na način opisan u poglavlju 3.3.9.3.

Konačna identifikacija EBNA-1 subtipova i subvarijanti rađena je pomoću BioEdit softvera (Hall, 1999). Dobijene EBNA-1 sekvence poređene su sa referentnom sekvencom "divljeg" soja (engl. wild-type) kako bi se ispitalo prisustvo karakterističnih substitucija koje dovode do izmena aminokiselina na lokusima: 471, 475, 476, 479, 487, 492, 499, 500, 502, 517, 520, 524, 525, 528 i 533. Inspekcijom pojedinačnih ak ispitivano je i prisustvo novih, do sada neklasifikovanih mutacija, odnosno substitucija.

3.3.9.3. Filogenetska analiza EBV izolata

Za filogenetsku analizu izolata korišćeni su programi:

- ✓ MEGA (MEGA version 6.0) (Tamura, Stecher, i sar., 2013),
- ✓ jModelTest 2.1.4. (Darriba, i sar., 2012),
- ✓ PhyML 3.0. (Guindon i Gascuel, 2003) i
- ✓ FigTree v.1.4.0. (Rambaut, 2012).

Analiza dobijenih sekvenci LMP-1, odnosno EBNA-1 gena, veličine 506 bp, odnosno 329 bp, urađena je ClustalW metodom u okviru MEGA softvera. U njemu su poređene sekvence ove studije sa referentnim sekvencama preuzetim iz GenBank/EMBL/DDBJ genske internet baze podataka (engl. multiple alignment). Takođe, MEGA je korišćen i za određivanje nukleotidnih distanci, tj. udaljenosti među izolatima za LMP-1 kao i EBNA-1 gen. Ova distanca predstavlja evolutivno odstupanje sekvenci na nivou nukleotida, a za njeno izračunavanje upotrebljen je Maximum Composite Likelihood model (Tamura, Nei i Kumar, 2004). Zatim je definisan najadekvatniji model evolucije za region koji je sekvenciran, korišćenjem jModelTest 2.1.4. (Darriba, i sar., 2012). Konstruisanje Maximum-likelihood (ML) filogenetskih stabala izvršeno je u PhyML 3.0. softveru. Radi potvrde statističkog značaja filogenetskih odnosa korišćena je "bootstrap" analiza sa 1000 ponavljanja. Konačno, radi grafičke prezentacije i obrade dobijenih stabala, korišćen je FigTree v.1.4.0. softver.

U cilju preciznije i detaljnije filogenetske obrade dobijenih sekvenci, korišćene su referentne, ali i sekvence drugih geografskih područja, preuzete iz GenBank/EMBL/DDBJ genske internet baze podataka. Navedeni su pristupni brojevi preuzetih sekvenci: V01555 (B95-8 referentna sekvenca), AY493742 i AY493743 (B95-8 varijante), AY337721 (Med + sa delecijom od 30 bp), AY337722 i AY493810

(Med – bez delecije od 30 bp), AY337723 i AY493835 (Kina 1), AY337724 i AY493799 (Kina 2), AY337725 (Aljaska), AY337726 (SK) i X58140 (Cao izolat).

Pedesettri LMP-1 sekvence ove studije dostupne su u GenBank/EMBL/DDBJ bazi podataka pod pristupnim brojevima JF901761-JF901803 i JN971082-JN971091.

3.4. Statistička obrada dobijenih rezultata

Za statističku obradu podataka korišćen je SPSS program ver. 21.

U cilju deskripcije varijabli parametarskog tipa normalne raspodele, a koja je testirana računskim i grafičkim metodama, korišćena je aritmetička sredina i standardna devijacija ($\bar{x} \pm sd$).

Kod poređenja dve nezavisne grupe ispitanika po parametarskom obeležju sa normalnom raspodelom upotrebljen je Studentov t test, dok je statistička značajnost kod poređenja tri grupe ispitivana ANOVA-om. Dva ili više uzoraka po nominalnom tipu podataka, ili dva nominalna multikategorijalna tipa podataka, upoređivana su Fisher testom. Kada numerička ograničenja ovog testa nisu bila ispunjena (niske očekivane učestalosti) korišćena je Monte Carlo simulacija na 1000 uzoraka i 95% intervalom poverenja.

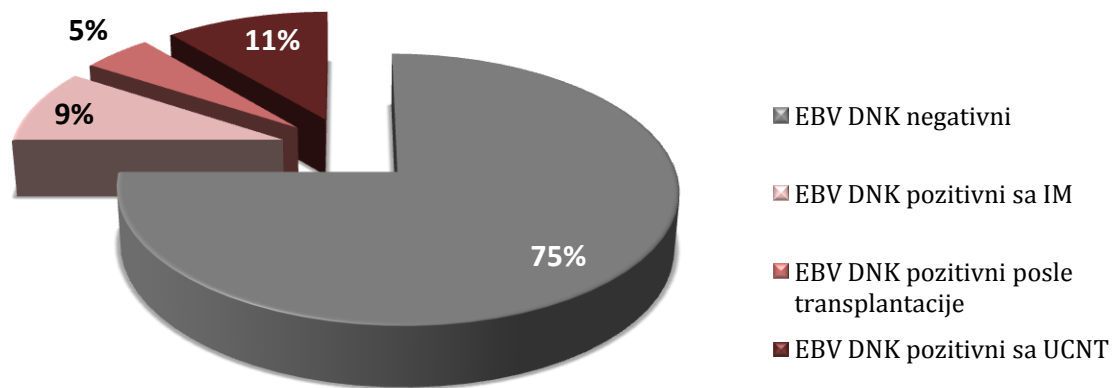
U cilju ispitivanja eventualnih faktora rizika, tj. prediktora (progresija, regresija, teži gradus TNM) koristila se univarijantna i multivarijantna logistička regresija.

Statistička značajnost je ocenjivana za nivo značajnosti od 0,05.

4. REZULTATI

Ukupno je ispitano 360 kliničkih uzoraka na prisustvo EBV DNK, i to 244 uzorka krvi i 116 trajnih parafinskih kalupa tkiva.

Devedeset (25%) uzoraka bilo je pozitivno na prisustvo EBV DNK, i takvi uzorci su dalje analizirani. Pozitivni uzorci dobijeni su od 33 pacijenta sa IM (25,78%), 17 pacijenata posle transplantacije (T) (14,65%) i 40 sa UCNT (34,48%) (Grafikon 3.).



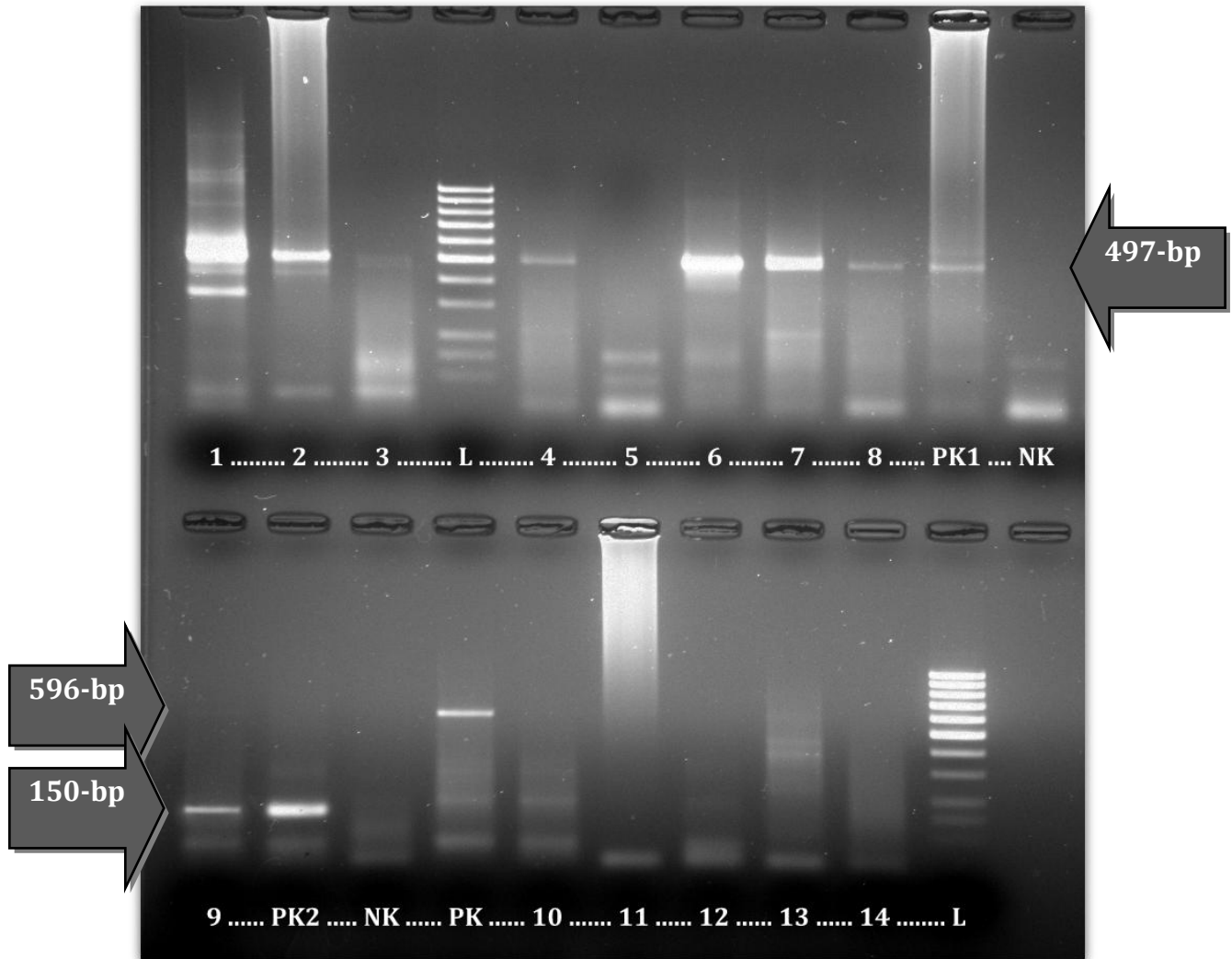
Grafikon 3. Distribucija EBV DNK pozitivnih uzoraka

Dobijeni EBV izolati koristili su se za određivanje genotipova, subgenotipova, varijanti i subvarijanti tri različita gena, dok je analizom njihovih sekvenci ispitivana genetička varijabilnost na nivou specifičnih mutacija.

Ovakvi rezultati korišćeni su i za poređenje sa svim dostupnim anamnestičkim i kliničkim podacima pacijenata ove studije.

4.1. Dokazivanje EBNA-2, LMP-1 i EBNA-1 gena nested-PCR metodom

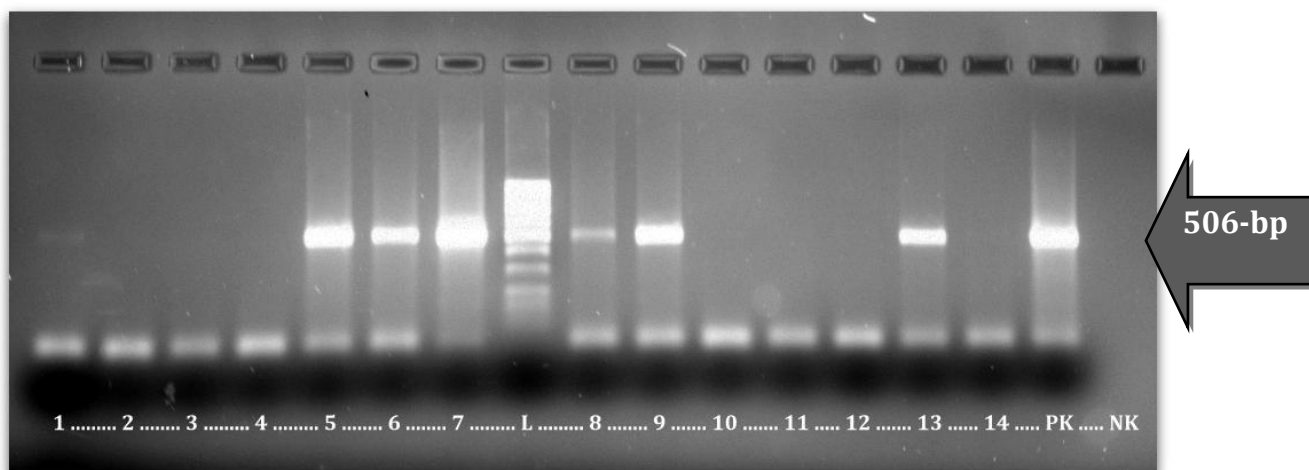
EBNA-2 gen dokazan je kod 77 od ukupno 360 uzoraka (21,39%): 32 od 128 uzoraka krvi pacijenata sa IM (25%), 13 od 116 uzoraka krvi pacijenata nakon transplantacije (11,21%) i 32 od 116 bioptata pacijenata sa UCNT (27,59%).



Slika 9. Gel-elektroforeza: Analiza nested-PCR produkata EBNA-2 gena veličine 596-, 497- i 150-bp (pozitivni uzorci na genotip-1: 1-4 i 6-8; pozitivni uzorak na genotip-2: 9; negativni uzorci: 5 i 10-14; L-100-bp standard; PK-pozitivna kontrola prvog kruga; PK1-pozitivna kontrola za genotip-1; PK2-pozitivna kontrola za genotip-2; NK-negativna kontrola).

Nakon drugog kruga umnožavanja nested-PCR metodom, unutrašnji prajmeri ograničavali su produkte veličine 497-bp ili 150-bp. Ovakvi produkti vizuelizovani su gel elektroforezom, što je predstavljalo dokaz uspešnog umnožavanja EBNA-2 gena (Slika 9.).

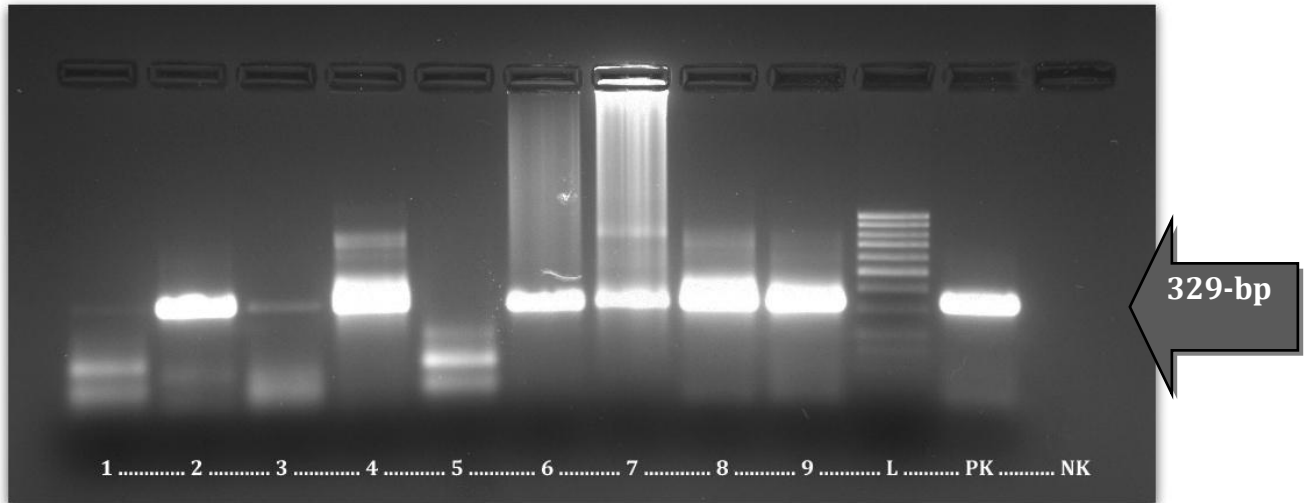
LMP-1 gen uspešno je umnožen kod 85 uzoraka, što čini 23,61% ukupnog broja uzoraka ove studije. Ovaj gen dokazan je kod 33 uzorka krvi pacijenata sa IM (25,78%), 17 uzoraka krvi pacijenata nakon transplantacije (14,65%) i 35 bioptata pacijenata sa UCNT (30,17%). Nakon drugog kruga umnožavanja nested-PCR metodom, unutrašnji prajmeri ograničavali su produkt veličine 506-bp, koji se mogao vizuelizovati gel elektroforezom (Slika 10.).



Slika 10. Gel-elektroforeza: Analiza nested-PCR produkta LMP-1 gena veličine 506-bp (pozitivni uzorci 1, 5-9 i 13; negativni uzorci 2-4, 10-12 i 14; L-100-bp standard; PK-pozitivna kontrola; NK-negativna kontrola).

EBNA-1 gen uspešno je umnožen kod 87 uzoraka, što čini 24,17% ukupnog broja uzoraka ove studije. Ovaj gen dokazan je kod 31 uzorka krvi pacijenata sa IM (24,22%), 16 uzoraka krvi pacijenata nakon transplantacije (13,79%) i 40 bioptata pacijenata sa UCNT (34,48%). Produkt veličine 329-bp, koji se mogao vizuelizovati gel

elektroforezom, bio je dokaz uspešnog umnožavanja nakon drugog kruga nested-PCR metode korišćenjem para unutrašnjih prajmera (Slika 11.).

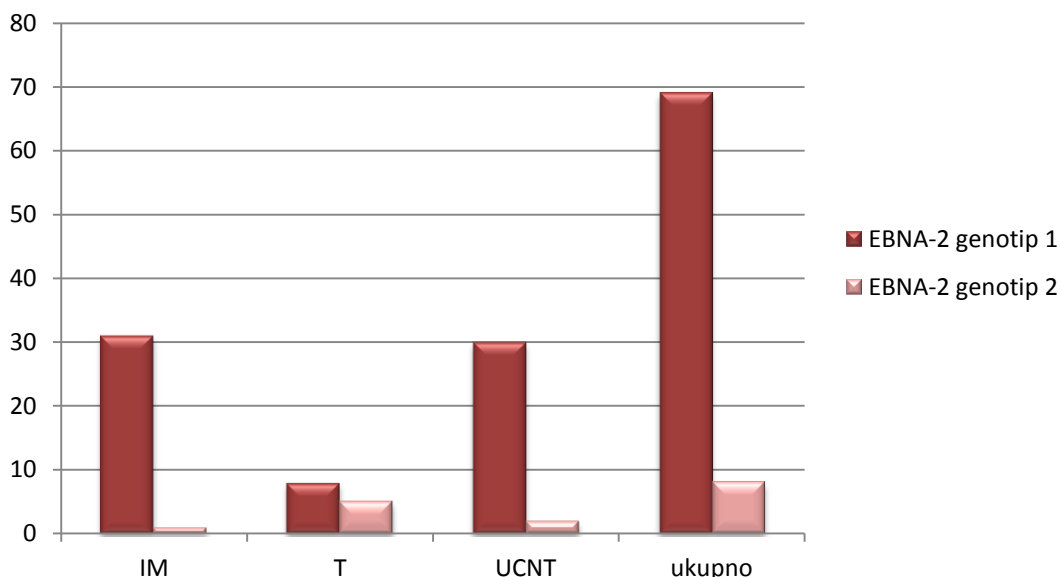


Slika 11. Gel-elektroforeza: Analiza nested-PCR produkta EBNA-1 gena veličine 329-bp (pozitivni uzorci 1-4 i 6-9; negativni uzorak 5; L-100-bp standard; PK-pozitivna kontrola; NK-negativna kontrola).

Uspešno umnožavanje sva tri ispitivana gena (EBNA-2, LMP-1 i EBNA-1) izvršeno je kod 71/90 (78,89%) EBV DNK pozitivnih uzoraka, i to kod: 31 IM uzorka, 13 uzoraka pacijenata sa transplantacijom i 27 UCNT uzoraka.

4.2. Određivanje EBV genotipa analizom EBNA-2 gena

Genotip Epstein-Barr virusa određen je analizom 77 izolata pozitivnih na EBNA-2 gen, i to na osnovu veličine nested-PCR produkta (Slika 9.). Naime, produkti dužine 497-bp bili su dokaz uspešnog umnožavanja izolata sa EBNA-2 genotipom 1, dok su produkti dužine 150-bp bili dokaz uspešnog umnožavanja izolata sa EBNA-2 genotipom 2. Dominantan genotip bio je genotip 1 pronađen kod 69 uzoraka (89,61%), genotip 2 pronađen je kod 8 uzoraka (10,39%). Utvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti EBNA-2 genotipova po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima ($p=0,001$). Najveći procenat genotip 2 izolata bio je u grupi pacijenata sa transplantiranim organom (38,5%), dok je u grupi pacijenata sa infektivnom mononukleozom ovaj genotip bio prisutan samo kod 1 izolata (3,1%) (Grafikon 4.). Kod 13 uzoraka pozitivnih na neki od drugih EBV gena, EBNA-2 nije dokazan.



Grafikon 4. Distribucija EBNA-2 genotipova po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima: IM-infektivna mononukleoz, T-transplantacija, UCNT- nediferentovani karcinom nazofaringealnog tipa

4.3. Ispitivanje genetičke varijabilnosti LMP-1 gena

4.3.1. Određivanje varijanti i subvarijanti LMP-1 gena

Svih 85 LMP-1 pozitivnih izolata korišćeno je za sekvenciranje C-terminalnog regiona LMP-1 gena između nukleotida 168719-168213. Poređenjem sa B95-8 prototipnom sekvencom, otkriveno je 4 od 7 poznatih LMP-1 varijanti: B95-8, Med, Kina 1 i SK. Nijedan izolat ove studije nije identifikovan kao varijanta Aljaska, Kina 2 ili Kina 3.

Konstruisanjem radijalnog filogenetskog stabla (dendrograma) izvršeno je grupisanje dobijenih 85 sekvenci i referentne B95-8 sekvence iz GenBank baze podataka (Grafikon 5.).

Konačna identifikacija varijanti obuhvatala je inspekciju karakterističnih mutacija koje dovode do izmene aminokiselina (ak) na 7 lokusa: 229, 306, 312, 322, 334, 338 i 344 (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999). I prema ovom kriterijumu, dokazane su 4 varijante, sa najučestalijom B95-8 varijantom pronađenom kod 26 izolata (30,59%) (Tabela 11.).

Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji LMP-1 varijanti po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima ($p=0,039$). Kina 1 bila je najčešća varijanta među pacijentima sa IM (36,4%), B95-8 među pacijentima nakon transplantacije (35,3%), a Med među pacijentima sa UCNT (34,3%) (Tabela 11.).

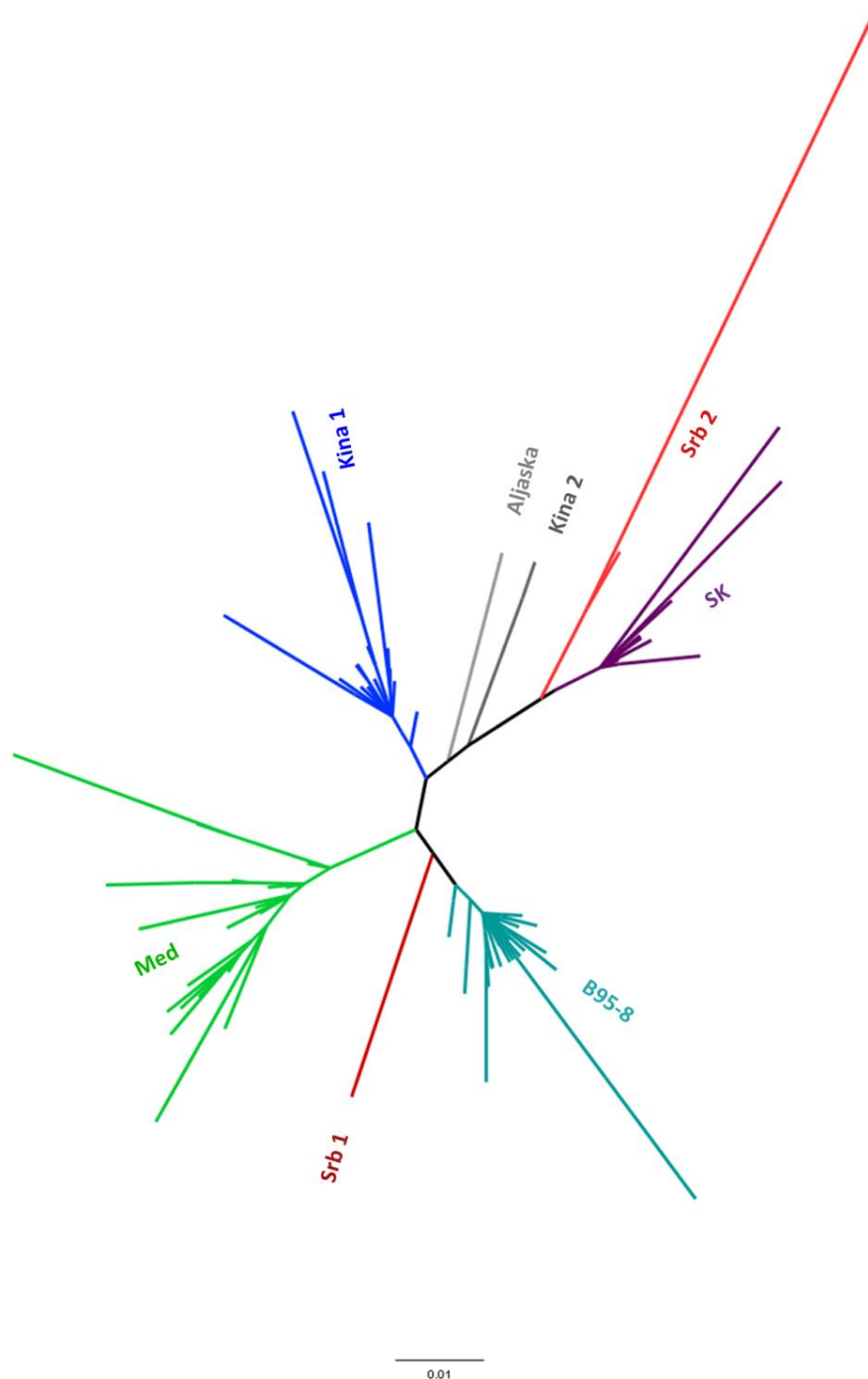
Tri izolata iz grupe pacijenata sa UCNT nisu se grupisala sa preostalim sekvencama ove studije, kao ni sa sekvencama preuzetim iz GenBank baze podataka. Pri tome, izolat UCNT 344 izdvojio se kao zaseban, dok su se izolati UCNT 1399 i UCNT 1621 izdvojili u zajedničku grupu. Nakon inspekcije karakterističnih mutacija, kod pomenutih izolata uočene su određene specifičnosti zbog čega oni ni prema ovom kriterijumu nisu mogli da se svrstaju u poznate varijante. Naime, izolat UCNT 344

pokazao je nove mutacije na karakterističnim pozicijama aminokiselina 312 (Asp → Ala) i 334 (Gln → Pro). Zbog toga je ovoj varijanti pridruženo privremeno ime Srb 1 (Srbija 1). Kod izolata UCNT 1399 i UCNT 1621 nisu identifikovane nove mutacije. Izmene njihovih aminokiselina na karakterističnim mestima nisu pokazivale konzistentnost jedne varijante, već su te izmene pripadale varijantama Med i SK. Tako je varijanta kojoj pripadaju ova dva izolata, dobila privremeno ime Srb 2 (Srbija 2).

Tabela 11. Distribucija LMP-1 varijanti po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima: : IM-infektivna mononukleoza, T-transplantacija, UCNT- nediferentovani karcinom nazofaringealnog tipa

		Grupe pacijenata prema oboljenju				p vrednost
		IM	T	UCNT	ukupno	
LMP-1 varijanta	B95-8	10 (30,3%)	6 (35,3%)	10 (28,6%)	26 (30,6%)	p=0,039
	Kina 1	12 (36,4%)	5 (29,4%)	2 (5,7%)	19 (22,4%)	
	SK	6 (18,2%)	1 (5,9%)	8 (22,9%)	15 (17,6%)	
	Med	5 (15,1%)	5 (29,4%)	12 (34,3%)	22 (25,9%)	
	Srb 1	-	-	1 (2,8%)	1 (1,2%)	
	Srb 2	-	-	2 (5,7%)	2 (2,3%)	
Broj testiranih uzoraka		33	17	35	85	

Kako varijanta Med ima i dve subvarijante, bila je neophodna i analiza prisustva delecije, na osnovu koje se razlikuju, kod 22 Med sekvence. Identifikovano je 11 sekvenci sa delecijom (subvarijanta Med+) i 11 bez delecije (subvarijanta Med-). Subvarijanta Med+ bila je prisutna kod 1 pacijenta sa IM, 4 pacijenta sa transplantiranim organom i 6 pacijenata sa UCNT. Subvarijanta Med- bila je prisutna kod 4 pacijenta sa IM, 1 pacijenta sa transplantiranim organom i 6 pacijenata sa UCNT.



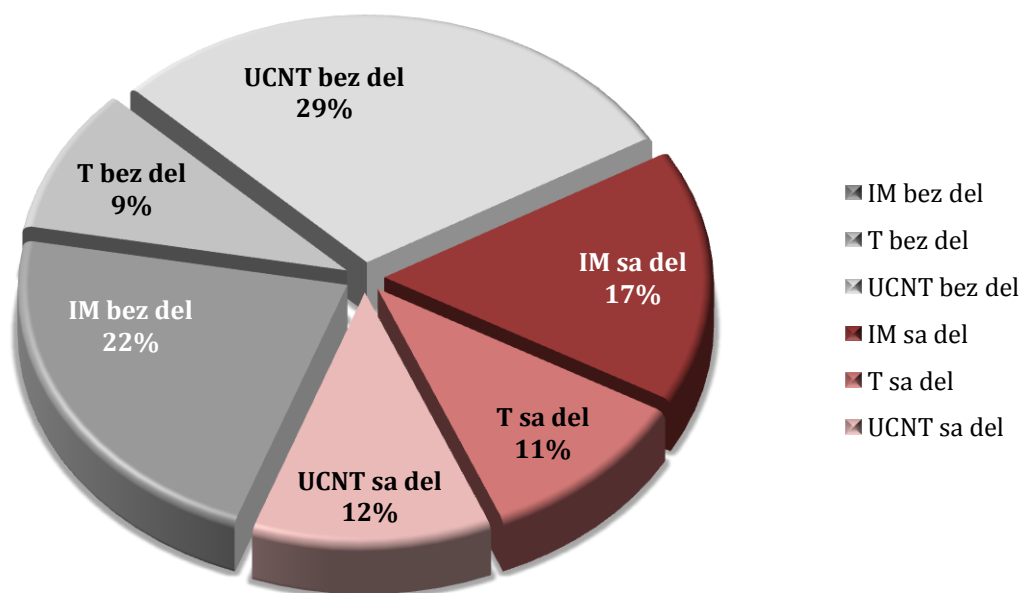
Grafikon 5. Dendrogram konstruisan na osnovu 506-bp sekvence LMP-1 gena 85 izolata ovog istraživanja i sekvenci preuzetih iz GenBank baze podataka. Identifikovane poznate varijante: B95-8, Med-Mediteran, Kina 1, SK-Severna Karolina. Novoidentifikovane varijante UCNT izolata: Srb 1 i Srb 2 (Srbija 1 i 2).

4.3.2. Analiza mutacija u okviru LMP-1 gena

Osim identifikacije varijanti, karakteristična varijabilnost LMP-1 gena obuhvata i prisustvo/odsustvo delecije, dužinu, tj. tip prisutne delecije, broj ponovaka od 33-bp (33-bp pon) kao i mutacije koje dovode do supstitucija ak izvan definisanih 7 lokusa. Ispitivanje ovih osobina C-terminalnog regiona LMP-1 gena, vršeno je poređenjem sekvenci dužine 506-bp sa prototipnom sekvencom B95-8 u BioEdit programu.

4.3.2.1. Ispitivanje delecija LMP-1 gena

Od 85 LMP-1 izolata ove studije, 33 (38,8%) je imalo prisustvo delecije u okviru C-terminalnog regiona. Bez delecije su bila preostala 52 izolata (61,2%) (Grafikon 6.).



Grafikon 6. Učestalost LMP-1 izolata sa i bez delecije po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima: IM-infektivna mononukleoza, T-transplantacija, UCNT-nediferentovani karcinom nazofaringealnog tipa

Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti prisustva delecije između izolata pacijenata sa različitim oboljenjima ($p=0,206$).

Identifikovane su 4 vrste delecija, pri čemu delecije od 27-bp i 147-bp ranije nisu opisivane:

- 27-bp delecija između nukleotida 168287 i 168259 ili 168284 i 168256,
- 30-bp delecija između nukleotida 168287 i 168256,
- 69-bp delecija između nukleotida 168326 i 168256,
- 147-bp delecija između nukleotida 168381 i 168233.

Najučestalija među delecijama, bila je 30-bp del (63,6%). Takođe, ona je jedina delecija identifikovana među svim grupama pacijenata. Ova delecija bila je najčešća u izolatima pacijenata sa IM i transplantacijom. Samo u grupi izolata porekla UCNT, dominantna delecija bila je 69-bp del, identifikovana kod 6 od 10 izolata sa delecijama (Tabela 12.).

Statističkom analizom dokazana je značajna razlika u distribuciji tipa delecije po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima ($p=0,005$). Pedesetsedam procenata identifikovanih izolata sa 30-bp del bilo je u grupi pacijenata sa IM, dok je čak 75% identifikovanih izolata sa 69-bp del bilo među pacijentima sa UCNT. Nijedna, od dve novoidentifikovane delecije (27-bp i 147-bp del) nije bila prisutna među UCNT izolatima.

U ovoj studiji, na osnovu prisustva delecije, definisano je 11 subvarijanti Med+ od 22 Med izolata. Među njima jedan izolat imao je 30-bp del, 7 izolata 69-bp del i 3 147-bp del.

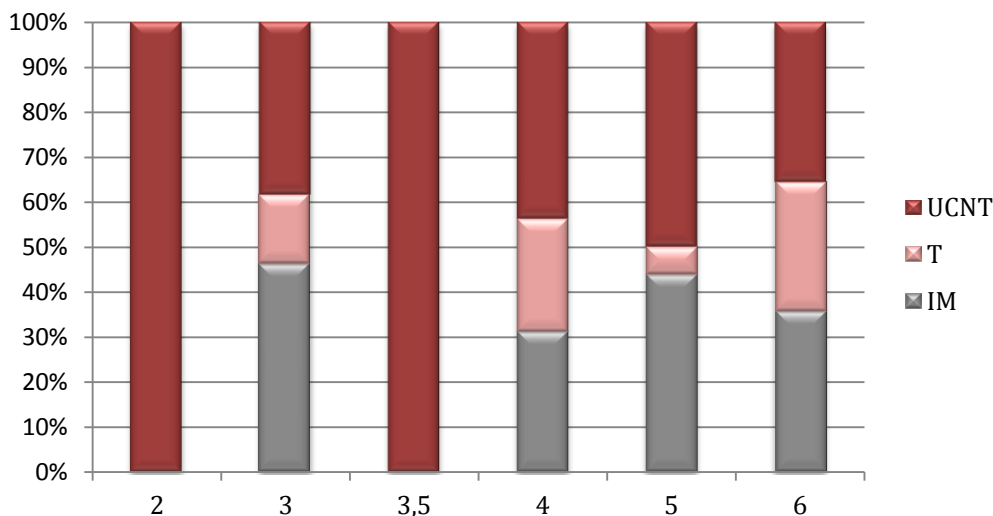
Tabela 12. Broj i učestalost izolata prema prisustvu i tipu delecije LMP-1 gena kod pacijenata sa različitim oboljenjima: IM-infektivna mononukleoza, T-transplantacija, UCNT-nediferentovani karcinom nazofaringealnog tipa

	Izolati bez delecije	Izolati sa delecijom					Ukupno broj izolata	p vrednost
		27-bp del	30-bp del	69-bp del	147-bp del	Ukupno sa del		
IM	19 (57,6%)	1 (3%)	12 (36,4%)	-	1 (3%)	14	33	P=0,005
T	8 (47%)	-	5 (29,4%)	2 (11,8%)	2 (11,8%)	9	17	
UCNT	25 (71,4%)	-	4 (11,4%)	6 (17,2%)	-	10	35	
		1 (3%)	21 (63,6%)	8 (24,3%)	3 (9,1%)	33		
ukupno	52		33				85	

4.3.2.2. Ispitivanje broja ponovaka od 33-bp u LMP-1 genu

Ispitivanjem sekvenci LMP-1 izolata ovog istraživanja, uočeno je prisustvo različitog broja ponovaka od 33-bp koji kodiraju 11-ak, između lokusa 250 i 308. Broj ponovaka iznosio je 2 do 6 (Grafikon 7.).

Najviše izolata (po 16) imalo je po 4, odnosno 5 33-bp ponovaka. Četrnaest izolata imalo je po 6 ponovaka, 13 po 3 ponovka, 2 izolata imala su 2 ponovka, dok je samo jedan UCNT izolat imao 3,5 ponovka. Takođe, jedino su u grupi UCNT izolata bili zastupljeni svi navedeni brojevi ponovaka (2-6).



Grafikon 7. Učestalost različitog broja 33-bp ponovaka (2-6) u gupama pacijenata sa različitim oboljenjima: IM-infektivna mononukleoza, T-transplantacija, UCNT- nediferentovani karcinom nazofaringealnog tipa

Prosečan broj ponovaka u grupama bio je vrlo blizak: IM $4,48 \pm 0,93$; T $4,59 \pm 0,96$; UCNT $4,34 \pm 1,07$. Nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti broja ponovaka po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima ($p=0,387$).

Prototipna sekvenca B95-8, sa kojom su poređene i sekvence ove studije, ima 4 ponovka sa prekidom, tj. insercijom od 5-ak (HPHDP) između drugog i trećeg ponovka (4,5 ponovka). Ovih 5 ak nalazi se i iza poslednjeg ponovka. Sve obrađene sekvence zbog toga su podeljene u dve kategorije: na one koje imaju 4,5 i manje ponovaka, odnosno one koje imaju više od 4,5 ponovka. Nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti broja ponovaka po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima ni kada su izolati podeljeni na ove dve kategorije ($p=0,849$).

4.3.2.3. Ispitivanje dodatnih mutacija LMP-1 gena

Sve LMP-1 sekvence ove studije poredile su se sa prototipnom sekvencom B95-8 i radi inspekcije pojedinačnih mutacija izvan onih koje kodiraju aminokiseline definisanih 7 lokusa (Tabela 13.). Izuzev jednog T izolata kod koga je na poziciji 229 umesto Ser pronađen Thr, svi preostali (25) LMP-1 izolati, identifikovani kao varijanta B95-8, imali su karakteristične aminokiseline na pozicijama: 229 (Ser), 306 (Leu), 312 (Asp), 322 (Gln), 334 (Gln), 338 (Leu) i 344 (Gly). Međutim, kod ovih izolata takođe je dokazano još 40 mutacija koje dovode do supstitucija ak na 32 lokusa. Od toga, svih 26 izolata imalo je izmene na pozicijama 212 (Gly→Ser ili Gly→Asn ili Gly→Val) i 328 (Glu→Gln). Pomenuta supstitucija na poziciji 328 bila je jedinstvena za sve isolate B95-8, odnosno nije se mogla naći u izolatima drugih varijanti. Takođe je i Ser na poziciji 309 bio jedinstven za sve isolate B95-8. Ova ak jedino je još pronađena u jednom UCNT izolatu identifikovanom kao varijanta SK. Iako varijantu B95-8 ne karakteriše prisustvo delecije, u slučaju izolata IM 96 delecija je identifikovana. To je bila jedina 27-bp del u ovoj studiji.

Tabela 13. Distribucija substitucija LMP-1 C terminalnog regiona prema LMP-1 varijantama i tipovima oboljenja (IM-infektivna mononukleoza, T-transplantacija, UCNT- nediferentovani karcinom nazofaringealnog tipa)

AK pozicija	208	208	209	209	210	211	211	211	212	212	212	212	212	212	213	213	214	214	214	214	214	215
Prototip B95-8	T	T	D	D	D	S	S	S	G	G	G	G	G	G	H	H	E	E	E	E	E	S
AK promena	A	I	H	G	A	A	F	C	S	R	N	T	V	A	Q	Y	K	Q	D	A	H	F
B95-8 (26)																						
IM (10)			1						9		1						1		1			
T (6)		1		1					6												1	
UCNT (10)					1		1		8		1	1					1					
Kina 1 (19)																						
IM (12)	1								11	1							1	3				
T (5)									5													
UCNT (2)									2													1
SK (15)																						
IM (6)									6													
T (1)									1													
UCNT (8)									8							1						
Med (22)																						
IM (5)						1			4			1										1
T (5)									3												1	
UCNT (12)									5					1							1	
Srb 1 (1)																						
UCNT (1)																					1	
Srb 2 (2)																						
UCNT (2)								1						1		1						

- Sedam karakterističnih lokusa za definisanje LMP-1 varijanti
- Substitucije izvan karakterističnih lokusa, a prisutne kod svih izolata određene varijante
- Substitucije izvan karakterističnih lokusa, a prisutne kod $\geq 50\%$ izolata određene varijante

Povezanost genetičke varijabilnosti Epstein-Barr virusa
i oboljenja udruženih sa Epstein-Barr virusnom infekcijom

AK pozicija	216	216	218	218	218	220	220	220	221	221	222	222	222	223	223	223	223	224	224	225	225	227
Prototip B95-8	D	D	N	N	N	N	N	N	E	E	G	G	G	R	R	R	R	H	H	H	H	L
AK promena	E	H	F	I	H	T	M	D	D	Q	A	R	D	I	K	S	G	L	N	R	D	V
B95-8 (26)																						
IM (10)		1									1											
T (6)					1																	
UCNT(10)							1											1			1	1
Kina 1(19)																						
IM (12)			1												1							
T (5)																				2		
UCNT (2)																						
SK (15)																						
IM (6)																						
T (1)		1																				
UCNT (8)				1		1			1	1		1						1				
Med (22)																						
IM (5)	1														1							
T (5)																						
UCNT(12)																			1			
Srb 1 (1)																						
UCNT(1)																						
Srb 2 (2)																						
UCNT(2)								1						1							1	

AK pozicija	228	229	232	232	233	234	239	240	240	244	245	250	252	255	260	262	262	263	263	266	270	272
Prototip B95-8	V	S	G	G	D	G	S	Q	Q	A	P	D	G	D	D	N	N	G	G	D	T	D
AK promena	L	T	N	D	E	R	F	K	R	P	L	N	A	G	N	S	T	A	R	G	M	G
B95-8 (26)																						
IM (10)																						
T (6)		1																				
UCNT (10)					1		1															
Kina 1 (19)																						
IM (12)						1																1
T (5)																						
UCNT (2)																						
SK (15)																						
IM (6)												6										
T (1)												1										
UCNT (8)								1	1			7			1		1		1			
Med (22)																						
IM (5)		4	1																			
T (5)		5		1									3								2	
UCNT (12)	1	12								1			6	1		1					7	
Srb 1 (1)																						
UCNT (1)																						
Srb 2 (2)																						
UCNT (2)	1	2				1					1		1							1	1	

- Sedam karakterističnih lokusa za definisanje LMP-1 varijanti
- Substitucije izvan karakterističnih lokusa, a prisutne kod svih izolata određene varijante
- Substitucije izvan karakterističnih lokusa, a prisutne kod $\geq 50\%$ izolata određene varijante

Povezanost genetičke varijabilnosti Epstein-Barr virusa
i oboljenja udruženih sa Epstein-Barr virusnom infekcijom

AK pozicija	280	282	284	285	292	293	298	300	302	304	306	306	308	309	311	311	312	312	313	314	314	316	
Prototip B95-8	P	D	D	N	Q	D	D	N	P	D	L	L	H	S	S	S	D	D	S	A	A	N	
AK promena	R	G	G	T	H	G	Y	T	A	G	Q	P	P	N	N	G	N	A	P	T	G	D	
B95-8 (26)																							
IM (10)				1																			
T (6)								2															
UCNT (10)	1	1																					
Kina 1 (19)																							
IM (12)										1			1	12		1	1					1	1
T (5)														5									
UCNT (2)														2									
SK (15)																							
IM (6)											6			6								6	
T (1)											1			1								1	
UCNT (8)					1				1		7			7								8	
Med (22)																							
IM (5)		2												5									1
T (5)		2												5									
UCNT (12)		7	1							1				12	1								
Srb 1 (1)																							
UCNT (1)														1									1
Srb 2 (2)																							
UCNT (2)		2						1	1			1		2								2	




AK pozicija	316	317	318	319	319	321	322	322	322	322	327	327	328	328	328	329	329	329	331	333	333	333	
Prototip B95-8	N	D	G	G	G	P	Q	Q	Q	Q	V	V	E	E	E	N	N	N	G	D	D	D	
AK promena	E	E	R	D	K	A	E	N	T	P	D	G	Q	D	A	I	S	T	Q	H	N	A	
B95-8 (26)																							
IM (10)														10									
T (6)														6									
UCNT (10)			1											10									
Kina 1 (19)																							
IM (12)						1				12					1						2	1	
T (5)										5													
UCNT (2)										2													
SK (15)																							
IM (6)										5	1											6	
T (1)										1												1	
UCNT (8)	1									8												8	
Med (22)																							
IM (5)							4									1							
T (5)							5																
UCNT (12)		5	1	1			11				2	1		1				1				1	
Srb 1 (1)																							
UCNT (1)																		1					
Srb 2 (2)																							
UCNT (2)	1				1					2												2	

- Sedam karakterističnih lokusa za definisanje LMP-1 varijanti
- Substitucije izvan karakterističnih lokusa, a prisutne kod svih izolata određene varijante
- Substitucije izvan karakterističnih lokusa, a prisutne kod $\geq 50\%$ izolata određene varijante

Povezanost genetičke varijabilnosti Epstein-Barr virusa i oboljenja udruženih sa Epstein-Barr virusnom infekcijom

AK pozicija	334	334	334	335	335	335	336	337	338	338	339	341	341	344	345	346	349	349	349	352	352	352
Prototip B95-8	Q	Q	Q	G	G	G	P	P	L	L	M	D	D	G	G	H	D	D	D	H	H	H
AK promena	R	E	P	D	S	V	R	R	S	P	K	H	E	S	A	Q	A	T	G	R	N	S
B95-8 (26)																						
IM (10)																						2
T (6)							1	1														
UCNT (10)																						1
Kina 1 (19)																						
IM (12)	11				1				11		1											
T (5)	4					1			4													
UCNT (2)	2								2													
SK (15)																						
IM (6)				3						6												6
T (1)										1												1
UCNT (8)				2					8			1				1						8
Med (22)																						
IM (5)	3	1							4						1		2				3	1
T (5)	1								1					1			1				1	
UCNT (12)	6								6					1			1	1	1	6		
Srb 1 (1)																						
UCNT (1)			1									1										
Srb 2 (2)																						
UCNT (2)									1													1

AK pozicija	355	356	356	356	357	358	359	359	361	361	361	362	365	366	366	366	366
Prototip B95-8	G	D	D	D	P	H	L	L	T	T	T	L	G	S	S	S	S
AK promena	D	S	N	A	S	P	H	F	M	P	A	V	R	T	L	F	P
B95-8 (26)																	
IM (10)						2						1		2			
T (6)		1			1				1		1			1		2	
UCNT (10)			1		2	1	1		2				1			1	
Kina 1 (19)																	
IM (12)								1									
T (5)															1		
UCNT (2)																	
SK (15)																	
IM (6)						6											
T (1)						1											
UCNT (8)						8									1	1	
Med (22)																	
IM (5)	1		2	1													
T (5)															2		
UCNT (12)					1				1						1	1	1
Srb 1 (1)																	
UCNT (1)																	
Srb 2 (2)																	
UCNT (2)						1											1

-  Sedam karakterističnih lokusa za definisanje LMP-1 varijanti
-  Substitucije izvan karakterističnih lokusa, a prisutne kod svih izolata određene varijante
-  Substitucije izvan karakterističnih lokusa, a prisutne kod ≥50% izolata određene varijante

Među 19 pripadnika Kina 1 varijante nije bilo izuzetaka u karakterističnim aminokiselinama na 2 od 3 opisane pozicije: 229 (Ser) i 344 (del). Međutim, na poziciji 334 dva izolata pokazala su izuzetak, jer supstitucije Gln→Arg nije bilo. Ipak, ova dva izolata su na osnovu drugih osobina u sekvenci identifikovani kao varijanta Kina 1 (IM 89 i T 623). Pored karakterističnih mutacija kod izolata ove varijante pronađeno je još 25 mutacija na 21 poziciji. Najvažnije bile su svakako one izmene koje su posedovali svi izolati: 212 (Gly→Ser ili Gly→R), 309 (Ser→Asn) i 322 (Gln→Asn). Sedamnaest od 19 izolata (89,5%) imalo je i izmenu na poziciji 338 (Leu→Ser). Zapaženo je da je pomenuta supstitucija na lokusu 322 bila jedinstvena za isolate Kina 1 jer ova ak promena nije pronađena među ostalim sekvencama.

Severna Karolina (SK) bila je varijanta kojoj je pripadalo 15 izolata ove studije (17,6%). Karakteristične aminokiseline Ser na 229, Asp na 312, Gln na 334 i Gly na 344 posedovalo je svih 15 izolata. Očekivane mutacije koje dovode do izmena u aminokiselinama na lokusima 306 (Leu→Gln) i 322 (Gln→Thr) identifikovane su, i u jednom i u drugom slučaju, kod 14 od 15 izolata. Izuzetak na poziciji 306 bio je UCNT izolat koji nije imao izmenu, dok je IM izuzetak na poziciji 322 imao drugačiju izmenu od očekivane (Gln→Pro). Takođe, svi SK izolati posedovali su dodatne supstitucije: 212 (Gly→Ser), 313 (Ser→Pro), 331 (Gly→Gln), 338 (Leu→Pro), 352 (His→Asn) i 358 (His→Pro), dok je po 14 od 15 izolata imalo promene i na 250 (Asp→Asn) i 309 (Ser→Asn). Jedinstvena mutacija koja dovodi do izmene ak na poziciji 250 pronađena je samo kod SK izolata, dok su one na 313, 331 i 338 bile jedinstvene samo za SK i Srb 2 isolate.

Nakon inspekcije 3 karakteristična lokusa za varijantu Med: 229 (Ser→Thr), 322 (Gln→Glu) i 344 (Gly ili del), njoj su pridružene 22 sekvence. Izostanak karakterističnih mutacija, kod jednog izolata dokazan je inspekcijom aminokiseline na poziciji 229 i kod 2 izolata na poziciji 322. Kod jednog T izolata odstupanje je predstavljeno neuobičajenom supstitucijom Gly→Ser na 344. Svi Med izolati takođe su posedovali Asn umesto Ser na lokusu 309. Pored ovih opisanih, pronađeno je još

52 mutacije koje kodiraju 39 aminokiselina. One koje su identifikovane kod bar 50% Med izolata, a da su se vrlo retko nalazile kod ostalih varijanti, bile su za ak na pozicijama 282 (Asp→Gly) kod 11/22 izolata i 293 (Asp→Gly) kod 17/22 izolata.

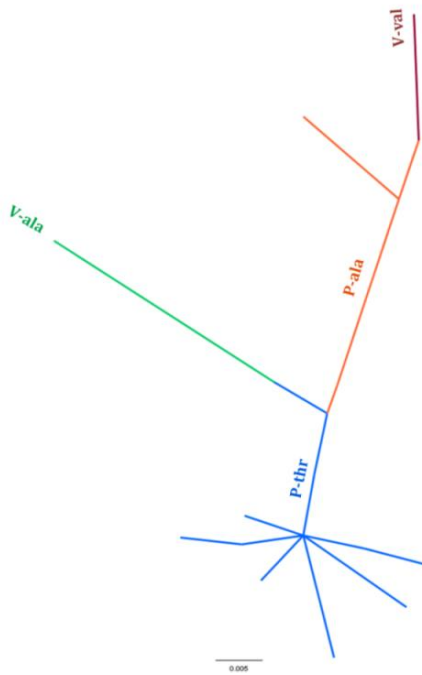
Jedan UCNT izolat (UCNT 344) nije se mogao svrstati ni u jednu poznatu varijantu, pa mu je dodeljeno ime Srb 1. Na karakterističnim lokusima kod njega su identifikovane sledeće aminokiseline: 229 (Ser), 306 (Leu), 312 (Asp→Ala), 322 (Gln), 334 (Gln→Pro), 338 (Leu) i 344 (del). Supstitucije na 312 i 334 identifikovane su samo kod ovog izolata, a osim na karakterističnim lokusima bilo je još 4 izmene aminokiselina.

Kod varijante kojoj je dodeljeno ime Srb 2, identifikovanoj kod 2 izolata (UCNT 1399 i UCNT 1621) nisu dokazane nove mutacije primarno analiziranih pozicija. Sa tih mesta, kod ovih izolata, kodirane su sledeće aminokiseline: 229 (Ser→Thr), 306 (Leu ili Leu→Pro), 312 (Asp), 322 (Gln→Thr), 334 (Gln), 338 (Leu→Pro ili del) i 344 (Gly ili del). Osim ovih, postojalo je još 23 mutacije sa kojih se kodiraju ak 23 lokusa. Među njima, izmene na 282 (Asp→Gly), 309 (Ser→Asn), 313 (Ser→Pro) i 331 (Gly→Gln) imala su oba Srb 2 izolata, pri čemu su ak na 313 i 331 lokusu bile jedinstvene samo za Srb 2 i SK izolate.

4.4. Određivanje subtipova i subvarijanti EBNA-1 gena

EBNA-1 pozitivni izolati (87) sekvencirani su u delu C-terminalnog regiona između nukleotida 109261-109590, a na osnovu supstitucija aminokiselina identifikovana su 4 subtipa: dva prototipna subtipa (P-thr i P-ala), i dve varijante (V-val i V-ala). Nisu pronađeni subtipovi V-pro i V-leu (Tabela 14.).

Konstruisanjem filogenetskog stabla izvršeno je grupisanje dobijenih 87 EBNA-1 sekvenci i referentne sekvence B95-8 izolata iz GenBank baze podataka (Grafikon 8.).



Grafikon 8. Dendrogram konstruisan na osnovu 329-bp sekvence EBNA-1 gena 87 izolata ovog istraživanja i referentne sekvence B95-8 preuzete iz GenBank baze podataka. Identifikovani su EBNA-1 subtipovi: 2 prototipna subtipa P-thr i P-ala i 2 varijante V-val i V-ala.

Konačna identifikacija subtipova obuhvatala je inspekciju ranije opisanih karakterističnih mutacija. I prema ovom kriterijumu, dokazana su 4 subtipa, sa najučestalijim P-thr, koji je pronađen kod 52 izolata (59,8%) (Tabela 14.).

Tabela 14. Distribucija EBNA-1 subtipova po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima: IM-infektivna mononukleoza, T-transplantacija, UCNT-nediferentovani karcinom nazofaringealnog tipa

		Grupe pacijenata prema oboljenju			
		IM	T	UCNT	ukupno
EBNA-1 subtip	P-thr	19 (61,3%)	10 (62,5%)	23 (57,5%)	52 (59,8%)
	P-ala	12 (38,7%)	4 (25%)	16 (40%)	32 (36,8%)
	V-val	-	1 (6,25%)	-	1 (1,1%)
	V-ala	-	1 (6,25%)	1 (2,5%)	2 (2,3%)
Broj testiranih uzoraka		31	16	40	87

Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti EBNA-1 subtipova po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima ($p=0,339$). Međutim, zapaženo je da je subtip P-thr bio dominantan u svakoj grupi pacijenata, pa je njemu pripadalo skoro 60% svih izolata.

Inspekcijom opisanih, ali i dodatnih mutacija, izvršena je i dalja klasifikacija na subvarijante. Naime, sojevi čije su izmene aminokiselina van lokusa 487 odstupale od uobičajenih, identifikovani su kao subvarijante, a njihove mutacije prikazane su u tabeli 15. Takođe, izolati istih subvarijanti jasno su se izdvajali i u filogenetskom stablu.

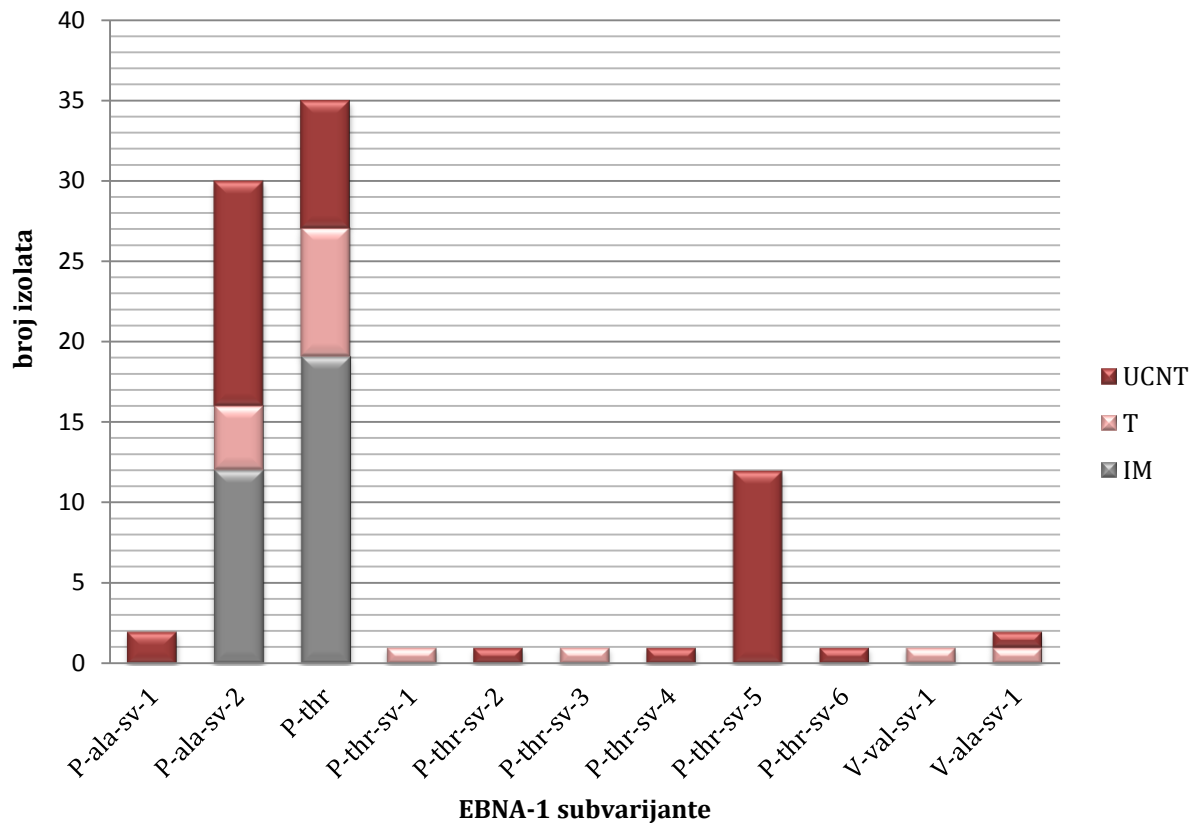
Nijedan izolat subtipa P-ala, V-val i V-ala nije u potpunosti sadržao mutacije karakteristične za ove subtipove, pa je među njima izvršena klasifikacija na subvarijante: P-ala-sv-1, P-ala-sv-2, V-val-sv-1 i V-ala-sv-1. Kao poznati subtip P-thr identifikovano je 35 izolata, dok je njih 17 klasifikovano u subvarijante P-thr-sv-1 do P-thr-sv-6 (Grafikon 9.).

Tabela 15. Izmene aminokiselina C-terminalnog domena EBNA-1 gena kod subvarijanti koje su identifikovane u izolatima ove studije

	B95-8* P-ala	P-ala- sv-1	P-ala- sv-2	P-thr	P-thr- sv-1	P-thr- sv-2	P-thr- sv-3	P-thr- sv-4	P-thr- sv-5	P-thr- sv-6	V-val- sv-1	V-ala- sv-1
Lokus												
471	CAA Gln				CAT His							
476	CCG Pro			CAG Gln	CAG Gln		CAG Gln		CAG Gln	CAG Gln		
483	GAA Glu							GAC Asp	GAC Asp	GAC Asp	GTT Val	GAC Asp
487	GCT Ala			ACT Thr	ACT Thr	ACT Thr	ACT Thr	ACT Thr	ACT Thr	ACT Thr	GTT Val	
492	AGT Ser			TGT Cys	TGT Cys	TGT Cys			TGT Cys	TGT Cys		
499	GAC Asp	GAA Glu	GAA Glu	GAT Asp	GAT Asp	GAT Asp	GAT Asp	GAT Asp	GAT Asp	GAT Asp	GAA Glu	GAG Glu
502	ACT Thr									ATT Ile		AAT Asn
520	CTA Leu			CTC Leu	CTC Leu	CTC Leu	CTC Leu		CTC Leu	CTC Leu	CTC Leu	CTC Leu
524	ACT Thr	ATT Ile	GTT Val	ATT Ile	ATT Ile	ATT Ile	ATT Ile		ATT Ile	ATT Ile	GTT Val	ATT Ile
529	CCA Pro											CAA Gln
533	CTT Leu										GTT Val	

* prototipna sekvenca koja predstavlja subtip P-ala

Novoidentifikovane subvarijante: P-thr-sv-2, P-thr-sv-4, P-thr-sv-5, P-thr-sv-6 i V-val-sv-1.



Grafikon 9 Distribucija EBNA-1 subvarijanti po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima: IM-infektivna mononukleoz, T-transplantacija, UCNT- nediferentovani karcinom nazofaringealnog tipa ($p < 0,001$).

Statističkom analizom dokazana je značajna razlika u učestalosti P-thr subvarijanti po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima ($p < 0,001$), pa je tako najučestalija P-thr-sv-5 bila prisutna samo u grupi pacijenata sa UCNT. Radi utvrđivanja da li dokazana razlika postoji između svake grupe pacijenata ili je ta razlika zasnovana na odstupanju samo jedne grupe, analizirane su i razlike u učestalosti u tri kombinacije parova oboljenja: IM/T, IM/UCNT i T/UCNT. Tako je dokazana razlika između IM/UCNT ($p < 0,001$) i T/UCNT ($p = 0,013$).

Za razliku od P-thr, značajna razlika u učestalosti subvarijanti P-ala po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima, nije dokazana ($p=0,336$).

4.5. Filogenetska analiza izolata

Filogenetsku analizu za LMP-1 i EBNA-1 izolate, činilo je izračunavanje nukleotidnih distanci i konstruisanje filogenetskih stabala.

4.5.1. Filogenetska analiza LMP-1 izolata

Najadekvatniji model evolucije za konstruisanje filogenetskog stabla C-terminalnog regiona LMP-1 gena, dobijen korišćenjem programa jModelTest 2.1.4., bio je F81+I+G (Grafikon 10).

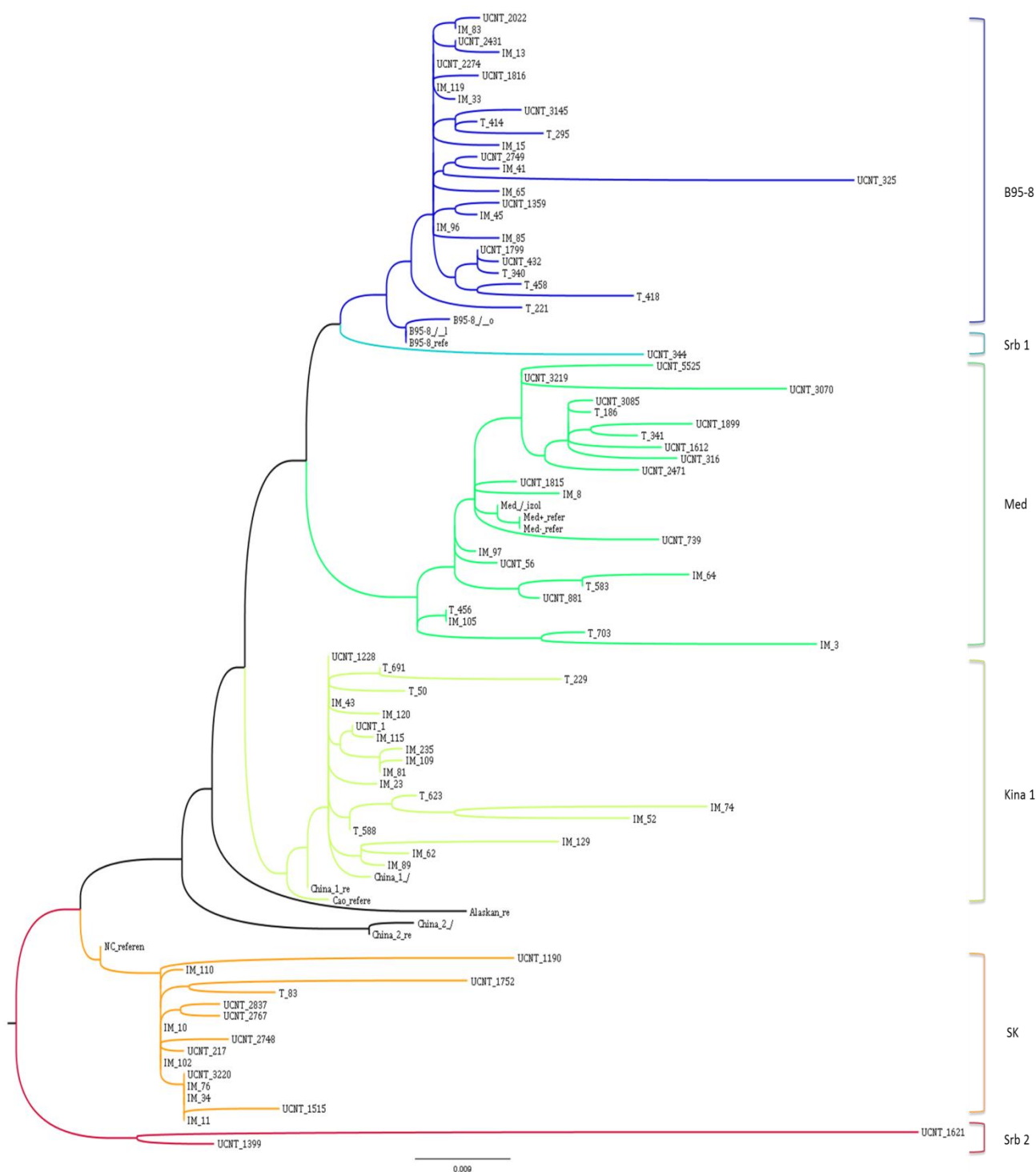
Srednja vrednost nukleotidne (evolutivne) udaljenosti između 85 LMP-1 sekvenci ovog istraživanja iznosila je 3,5%. Udaljenosti unutar pojedinačnih LMP-1 varijanti, kao i između različitih varijanti prikazana su u tabeli 16.

Tabela 16. Nukleotidne udaljenosti (%) unutar i između različitih LMP-1 varijanti

	Med	SK	B95-8	Kina 1	Srb 1	Srb 2
Med	2,2					
SK	5	2,2				
B95-8	2,9	4,5	1,6			
Kina 1	3,7	4,5	3,2	2,2		
Srb 1	4,1	6	3,9	3,6	*	
Srb 2	4,6	6,8	5,6	6,5	6,4	6,3

* prisustvo jednog izolata u varijanti

Povezanost genetičke varijabilnosti Epstein-Barr virusa i oboljenja udruženih sa Epstein-Barr virusnom infekcijom



Grafikon 10. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu 506 bp duge sekvence dela C terminalnog regiona LMP-1 gena 85 izolata i 13 sekvenci preuzetih iz GenBank baze podataka (53 sekvence ove studije dostupne su u GenBank/EMBL/DDBJ bazi podataka pod pristupnim brojevima JF901761-JF901803 i JN971082-JN971091).

4.5.2. Filogenetska analiza EBNA-1 izolata

Najadekvatniji model evolucije za konstruisanje filogenetskog stabla C-terminalnog regiona EBNA-1 gena, dobijen korišćenjem programa jModelTest 2.1.4., bio je F81+I+G (Grafikon 11).

Srednja vrednost nukleotidnog (evolutivnog) odstupanja, tj. udaljenosti između 87 EBNA-1 sekvenci ove studije iznosila je 1,4%. Odstupanja unutar i između subtipova, odnosno subvarijanti prikazane su u tabelama 17 i 18.

Tabela 17. Nukleotidne udaljenosti (%) unutar i između različitih EBNA-1 subtipova

	P-thr	P-ala	V-ala	V-val
P-thr	0,5			
P-ala	2,3	0,1		
V-ala	2,7	2,3	0	
V-val	3,2	0,9	3,1	*

* prisustvo jednog izolata u subtipu

Tabela 18. Nukleotidne udaljenosti (%) unutar i između različitih EBNA-1 subvarijanti

	P-thr	P-thr-sv-1	P-thr-sv-2	P-thr-sv-3	P-thr-sv-4	P-thr-sv-5	P-thr-sv-6	P-ala-sv-1	P-ala-sv-2	V-ala-sv-1	V-val-sv-1
P-thr	0,3										
P-thr-sv-1	0,9	*									
P-thr-sv-2	0,5	1,2	*								
P-thr-sv-3	0,5	1,2	0,8	*							
P-thr-sv-4	1,3	1,9	0,8	0,8	*						
P-thr-sv-5	0,7	1,3	0,9	0,9	0,9	0,4					
P-thr-sv-6	0,9	1,5	1,2	1,2	1,2	0,6	*				
P-ala-sv-1	2	2,7	1,5	1,5	1,5	2,2	2,7	0			
P-ala-sv-2	2,3	3	1,9	1,9	1,9	2,4	3	0,4	0,2		
V-ala-sv-1	2,8	3,5	2,3	2,3	1,5	2,3	2,3	1,9	2,3	0	
V-val-sv-1	3,2	3,9	2,7	2,7	2,7	3,3	3,9	1,2	0,9	3,1	*

* prisustvo jednog izolata u grupi

4.6. Utvrđivanje međusobnih povezanosti genetičkih markera virusa i poređenje sa karakteristikama oboljenja

Statistička obrada obuhvatila je sve pacijente ove studije. Analizirani su rezultati dobijeni ispitivanjem EBNA-2, LMP-1 i EBNA-1 izolata sa dostupnim anamnestičkim i kliničkim podacima. Radi utvrđivanja povezanosti, formirano je 10 različitih EBV polimorfizama (pol 1-10) u zavisnosti od karakteristika dva, odnosno tri gena koji su obuhvaćeni određenim polimorfizmom (Tabela 19.).

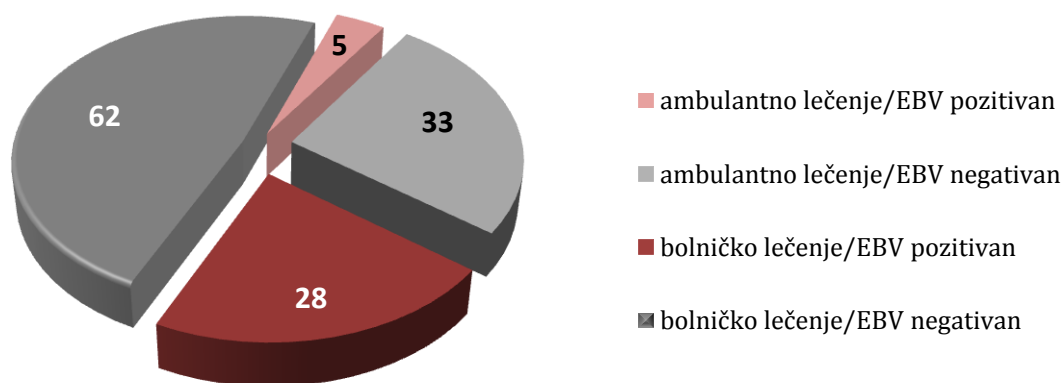
Tabela 19. Formiranje 10 EBV polimorfizama

POLIMORFIZMI 1-10	
1	EBNA-2 genotip / LMP-1 varijanta / EBNA-1 subtip
2	EBNA-2 genotip / LMP-1 varijanta
3	EBNA-2 genotip / EBNA-1 subtip
4	LMP-1 varijanta / EBNA-1 subtip
5	EBNA-2 genotip / prisustvo ili odsustvo LMP-1 delecije / EBNA-1 subtip
6	EBNA-2 genotip / prisustvo ili odsustvo LMP-1 delecije
7	prisustvo ili odsustvo LMP-1 delecije / EBNA-1 subtip
8	EBNA-2 genotip / ≤4,5 ili >4,5 33-bp ponovaka u LMP-1 / EBNA-1 subtip
9	EBNA-2 genotip/ ≤4,5 ili >4,5 33-bp ponovaka u LMP-1
10	≤4,5 ili >4,5 33-bp ponovaka u LMP-1 / EBNA-1 subtip

4.6.1. Povezanost EBV genetičke varijabilnosti i laboratorijskih i kliničkih parametara pacijenata sa infektivnom mononukleozom

Tridesettri od 128 pacijenata sa IM (25,78%) imalo je pozitivan nalaz na prisustvo EBV DNK, pri čemu nije utvrđena značajna razlika u učestalosti prisustva EBV DNK između muškog (73,2%) i ženskog (75,4%) pola ($p=0,777$).

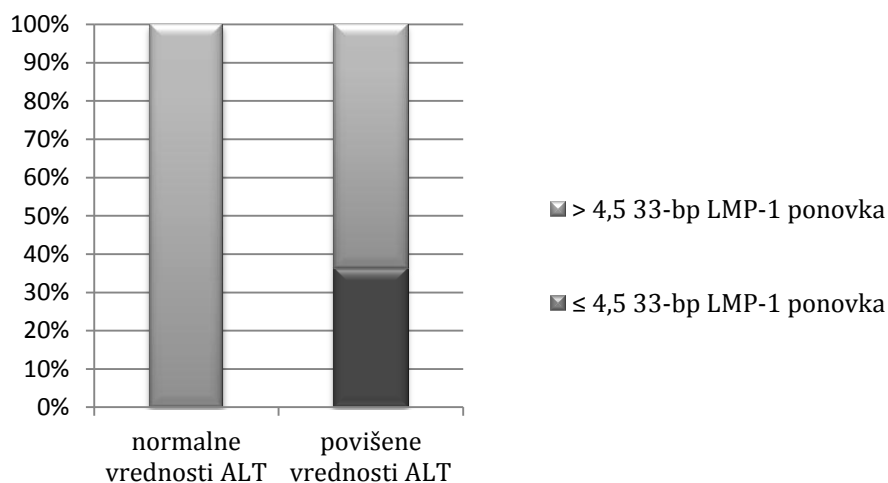
EBV DNK prisustvo bilo je povezano sa pacijentima kojima je neophodno bolničko lečenje, u odnosu na pacijente sa lakšom kliničkom slikom koji se leče ambulantno ($p=0,034$) (Grafikon 12.).



Grafikon 12. Distribucija prisustva EBV DNK u uzorcima krvi pacijenata na ambulantnom i bolničkom lečenju ($p=0,034$).

Utvrđivanje povezanosti prisustva EBV DNK sa povišenim nivoom transaminaza AST (preko 34) i ALT (preko 40) ili laktatdehidrogenaze (LDH) (preko 333), nije dalo statističku značajnost ($p=1$, $p=0,746$, $p=0,360$). Takođe, nije utvrđena povezanost sa hepatomegalijom ($p=0,065$) ili splenomegalijom ($p=0,573$).

Ispitivana je povezanost varijabilnosti EBV gena sa povišenim nivoom transaminaza AST (preko 34 U/L) i ALT (preko 40 U/L) ili laktatdehidrogenaze (LDH) (preko 333 U/L). Ova povezanost je dokazana samo između izolata sa $\leq 4,5$ broja 33-bp LMP-1 ponovaka i povišenih vrednosti ALT ($p=0,022$) (Grafikon 13.).

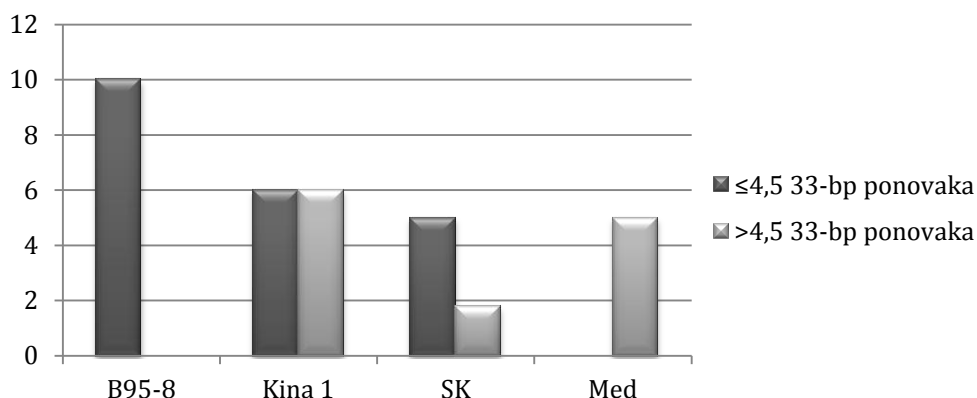


Grafikon 13. Distribucija broja 33-bp LMP-1 ponovaka ($\leq 4,5$ ili $>4,5$) kod pacijenata sa normalnim ili povišenim nivoom ALT ($p=0,022$).

Analizom međusobnih karakteristika LMP-1 sekvenci IM izolata, dokazana je razlika u distribuciji broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $>4,5$) između različitih LMP-1 varijanti ($p<0,001$) (Grafikon 14.). Tako su izolati B95-8 varijante imali uvek $\leq 4,5$ broja 33-bp pon, dok su izolati Med varijante imali uvek $>4,5$ broja 33-bp pon. Takođe, nije utvrđena značajna razlika u distribuciji broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $>4,5$) između izolata sa i bez delecije ($p=0,273$), kao ni između različitih tipova, tj. dužina delecije ($p=1$).

Pri poređenju karakteristika LMP-1 sekvenci sa EBNA-2 genotipovima, nisu utvrđene međusobne povezanosti:

- ∴ LMP-1 varijanta / EBNA-2 genotip, $p=0,640$;
- ∴ Prisustvo LMP-1 delecije / EBNA-2 genotip, $p=1$;
- ∴ Broj 33-bp ponovaka $\leq 4,5$ ili $>4,5$ / EBNA-2 genotip, $p=1$.



Grafikon 14. Distribucija broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $>4,5$) između različitih LMP-1 varijanti IM izolata ($p<0,001$).

Kada su se karakteristike LMP-1 sekvenci poredile sa EBNA-1 subtipovima, takođe nisu utvrđene međusobne povezanosti:

- ∴ LMP-1 varijanta / EBNA-1 subtip, $p=0,058$;
- ∴ Prisustvo LMP-1 delecije / EBNA-1 subtip, $p=0,332$;
- ∴ Tip LMP-1 delecije / EBNA-1 subtip, $p=0,511$;
- ∴ Broj 33-bp ponovaka $\leq 4,5$ ili $>4,5$ / EBNA-1 subtip, $p=1$.

Ispitivanje povezanosti EBV polimorfizama 1-10 sa: polom, načinom lečenja (ambulantno/hospitalizacija) i povišenim nivoom LDH, nije dokazalo povezanost.

Dokazana je granična razlika u distribuciji polimorfizma 7 između pacijenata sa normalnim i povišenim nivoom i AST ($p=0,053$), i ALT ($p=0,053$). Tako su polimorfizmi "sa del/P-thr" i "bez del/P-ala" bili prisutni samo u slučajevim povišenih

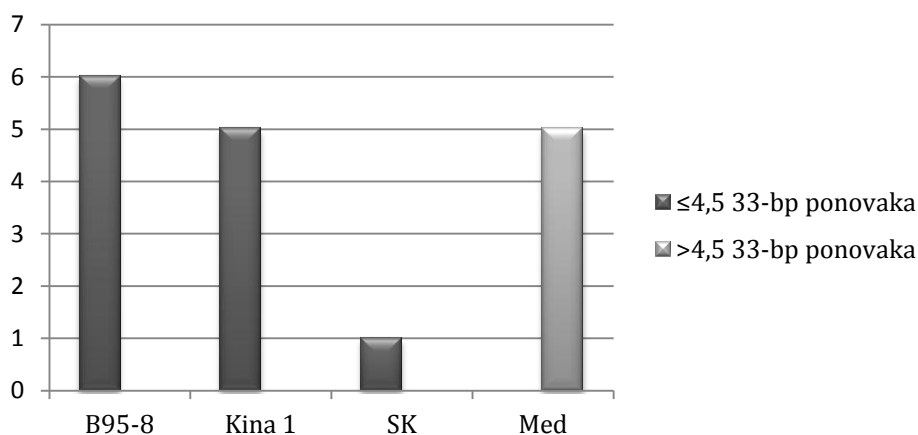
vrednosti AST. I kod povišenih vrednosti ALT, dokazan je samo polimorfizam “bez del/P-ala”.

Granična razlika u distribuciji polimorfizama, utvrđena je i kod pol 9 između pacijenata sa normalnim i povišenim nivoom ALT ($p=0,053$), jer su se polimorfizmi “genotip 1/ $\leq 4,5$ 33-bp ponovaka” i “genotip 2/ $\leq 4,5$ 33-bp ponovaka”, javljali samo u izolatima pacijenata sa povišenim vrednostima ALT.

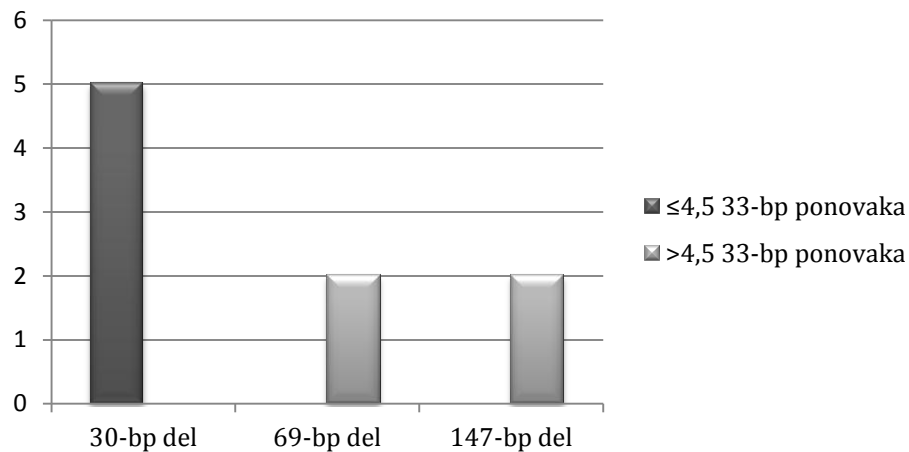
4.6.2. Povezanost EBV genetičke varijabilnosti i podataka pacijenata sa transplantiranim organom

Prisustvo EBV DNK nije bilo povezano sa polom pacijenta ($p=0,827$).

Statističkom analizom međusobnih karakteristika LMP-1 sekvenci izolata pacijenata nakon transplantacije (T), dokazana je razlika u distribuciji broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $>4,5$) između različitih LMP-1 varijanti ($p=0,001$) (Grafikon 15.). Kod ovih izolata postojao je uniforman broj 33-bp ponovaka u svakoj od varijanti.



Grafikon 15. Distribucija broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $>4,5$) između različitih LMP-1 varijanti T izolata ($p=0,001$).



Grafikon 16. Distribucija broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $> 4,5$) između T izolata sa različitim LMP-1 delecijama ($p=0,01$).

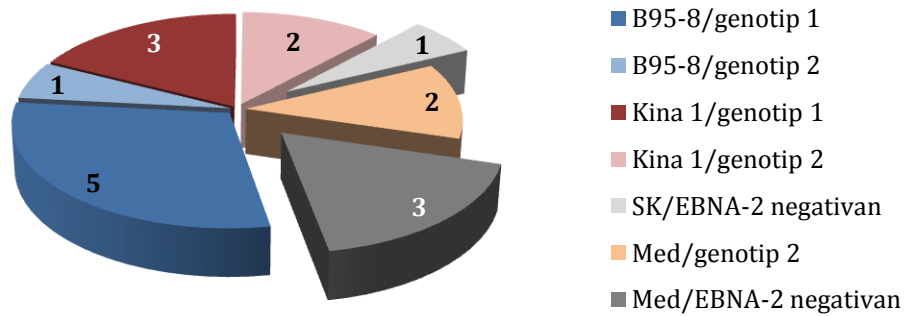
Nije utvrđena značajna razlika u distribuciji broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $> 4,5$) između izolata sa i bez delecije ($p=0,294$), ali je ona utvrđena između različitih tipova delecije ($p=0,01$) (Grafikon 16.).

Ispitivanjem povezanosti karakteristika LMP-1 sekvenci sa EBNA-2 genotipovima, utvrđene su sledeće 2 povezanosti:

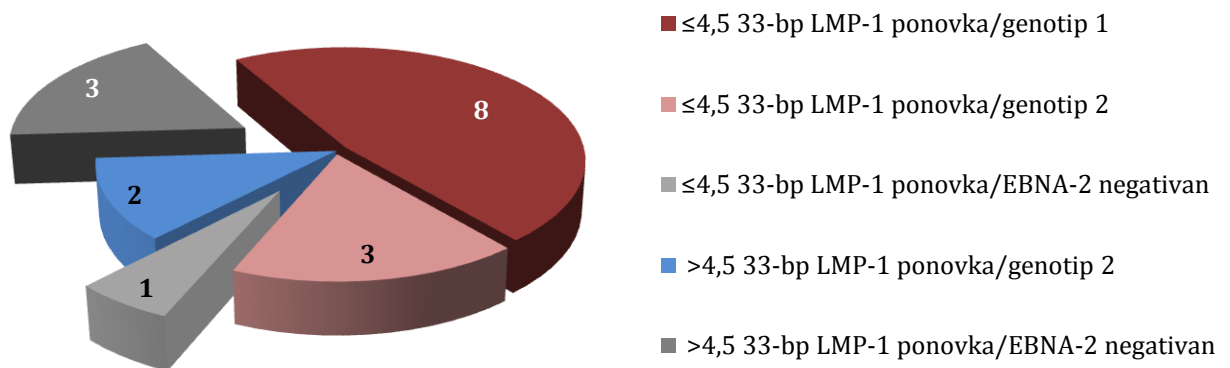
- ∴ LMP-1 varijanta / EBNA-2 genotip, $p=0,021$ (Grafikon 17.);
- ∴ Broj 33-bp ponovaka $\leq 4,5$ ili $> 4,5$ / EBNA-2 genotip, $p=0,011$ (Grafikon 18.).

Ipak, povezanosti nisu dokazane između:

- ∴ LMP-1 delecija / EBNA-2 genotip, $p=0,557$;
- ∴ Tip LMP-1 delecije / EBNA-2 genotip, $p=0,207$.



Grafikon 17. Distribucija LMP-1 varijanti između T izolata sa EBNA-2 genotipom 1 i 2 ($p=0,021$).



Grafikon 18. Distribucija broja 33-bp LMP-1 ponovaka ($\leq 4,5$ ili $> 4,5$) između T izolata sa EBNA-2 genotipom 1 i 2 ($p=0,011$).

Karakteristike LMP-1 sekvenci poredile su se i sa EBNA-1 subtipovima. Nisu utvrđene međusobne povezanosti:

- ∴ LMP-1 varijanta / EBNA-1 subtip, $p=0,259$;
- ∴ Prisustvo LMP-1 delecije / EBNA-1 subtip, $p=0,1$;
- ∴ Tip LMP-1 delecije / EBNA-1 subtip, $p=0,358$;
- ∴ Broj 33-bp ponovaka $\leq 4,5$ ili $>4,5$ / EBNA-1 subtip, $p=0,057$.

Analizom distribucije EBV polimorfizama 1-10 između pacijenata muškog i ženskog pola dokazana je značajna razlika za polimorfizme 1-2 i 4-7: pol 1/pol ($p=0,027$); pol 2/pol ($p=0,021$); pol 4/pol ($p=0,037$); pol 5/pol ($p=0,047$); pol 6/pol ($p=0,028$); pol 7/pol ($p=0,006$) (Tabela 20.).

Tabela 20. Distribucija polimorfizama 1-2 i 4-7 prema polu pacijenata sa transplantiranim organom: pol 1/pol (p=0,027); pol 2/pol (p=0,021); pol 4/pol (p=0,037); pol 5/pol (p=0,047); pol 6/pol (p=0,028); pol 7/pol (p=0,006).

Polimorfizmi	Muški pol	Ženski pol	ukupno	
Pol 1	Genotip 1/B95-8/P-thr	4	-	4
	Genotip 1/B95-8/P-ala	1	-	1
	Genotip 1/Kina 1/P-thr	-	3	3
	Genotip 2/B95-8/P-thr	-	1	1
	Genotip 2/Med/V-ala	-	1	1
	Genotip 2/Med/V-val	-	1	1
	Genotip 2/Kina 1/P-thr	1	-	1
	Genotip 2/Kina 1/P-ala	1	-	1
Pol 2	Genotip 1/B95-8	4	-	4
	Genotip 1/Kina 1	-	3	3
	Genotip 2/Med	-	1	1
	Genotip 2/Kina 1	1	-	1
Pol 4	B95-8/P-thr	3	-	3
	B95-8/P-ala	1	-	1
	Med/P-ala	1	-	1
	Med/V-ala	-	1	1
	Kina 1/P-thr	-	3	3
	Kina 1/P-ala	1	-	1
	SK/P-ala	1	-	1
Pol 5	Genotip 1/bez del/P-thr	3	-	3
	Genotip 1/bez del/P-ala	1	-	1
	Genotip 1/sa del/P-thr	-	3	3
	Genotip 2/bez del/V-ala	-	1	1
	Genotip 2/sa del/P-ala	1	-	1
Pol 6	Genotip 1/bez del	4	-	4
	Genotip 1/sa del	-	3	3
	Genotip 2/bez del	-	1	1
	Genotip 2/sa del	1	-	1
Pol 7	sa del/P-thr	-	3	3
	sa del/P-ala	2	-	2
	bez del/P-thr	3	-	3
	bez del/P-ala	2	-	2
	bez del/V-ala	-	1	1

4.6.3. Povezanost EBV genetičke varijabilnosti i kliničkih parametara pacijenata sa UCNT

Analizom dostupnih anamnestičkih i kliničkih podataka UCNT pacijenata nisu dokazane povezanosti između (Tabela 21.):

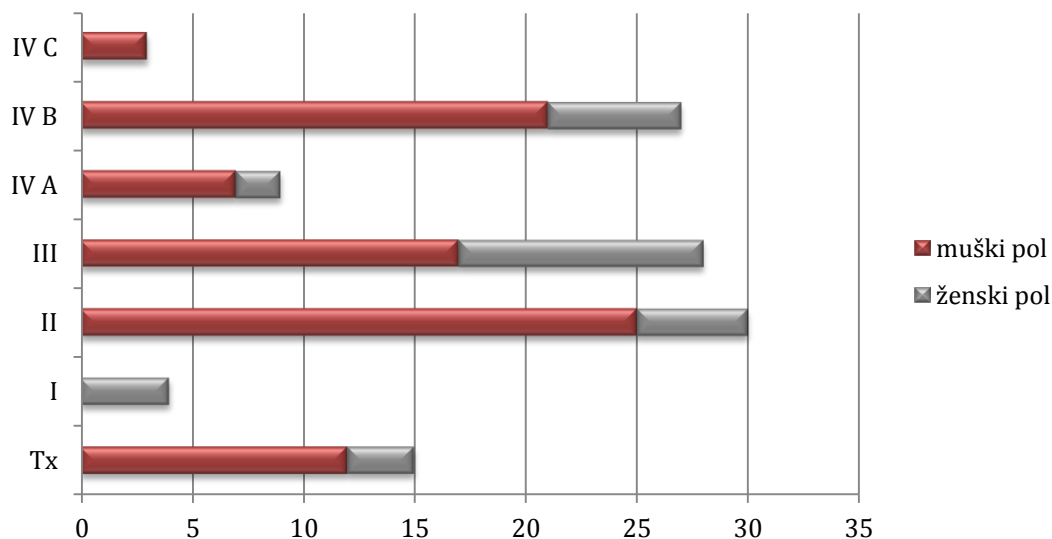
- ∴ Starost/pol, $p=0,669$;
- ∴ Pušenje/pol, $p=0,177$;
- ∴ Prisustvo prethodnog oboljenja/pol, $p=0,897$.

Tabela 21. Distribucija pacijenata na osnovu 6 različitih kriterijuma

Kategorija	Broj i učestalost pacijenata (%)						Bez podataka	
	Muško		Žensko					
Pol	85 (73,3%)		31 (26,7%)				0	
Region prebivališta	Vojvodina 7 (6,1%)	Beograd 47 (40,9%)	Centralna i Zapadna Srbija 32 (27,8%)	Južna i Istočna Srbija 25 (21,7%)	Kosovo i Metohija 4 (3,5%)			1
Pušenje	Pušači 57 (66,3%)		Nepušači 24 (33,7%)				30	
Prisustvo prethodnog oboljenja	Ima 65 (59,6%)		Nema 44 (40,4%)				7	
TNM klasifikacija	Tx 15 (12,9%)	I 4(3,4%)	II 30(25,9%)	III 28(24,1%)	IVA 9(7,8%)	IVB 27(23,3%)	IVC 3(2,6%)	0
Poslednji poznati ishod bolesti	Ter 4 (6,6%)	KR 12 (19,7%)	PR 7 (11,5%)	S 6 (9,8%)	P 32 (52,5%)			55

Ter-terapija u toku, KR-kompletna regresija, PR-parcijalna regresija, S-stabilizacija, P-progresija i/ili prisustvo metastaza

Međutim, stadijumi karcinoma, prema TNM klasifikaciji, bili su značajno različito zastupljeni između pacijenata muškog, odnosno ženskog pola ($p=0,027$) (Grafikon 19.). Stadijum I postojao je samo kod žena, dok je stadijum IV C postojao samo kod muškaraca.

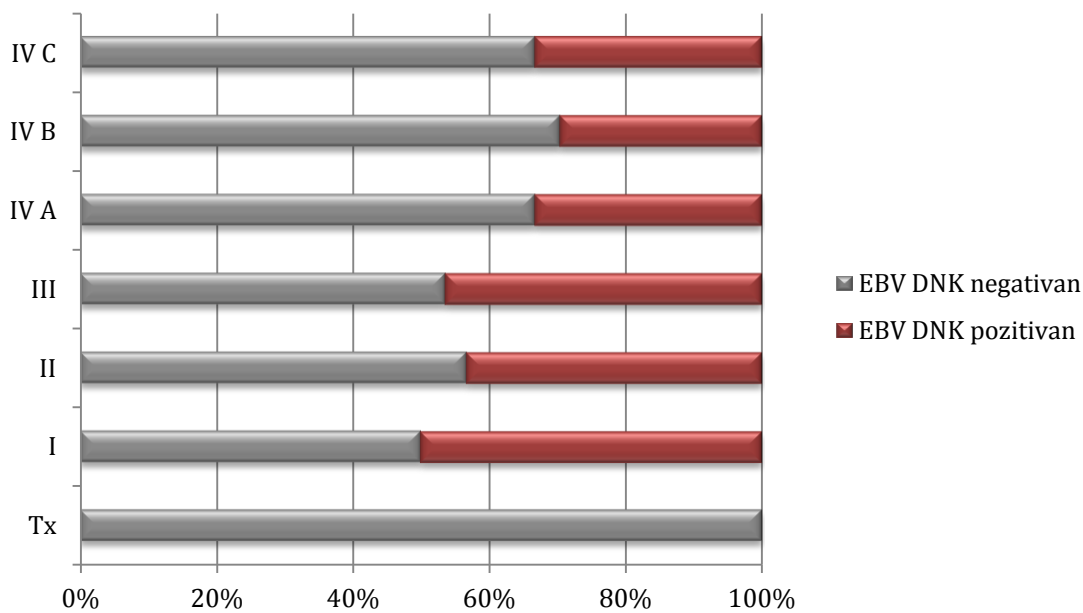


Grafikon 19. Distribucija pola UCNT pacijenata među različitim TNM stadijumima ($p=0,027$).

Prisustvo EBV DNK nije bilo povezano sa:

- ∴ polom pacijenta ($p=0,761$);
- ∴ starošću pacijenata ($p=0,239$);
- ∴ prebivalištem pacijenta ($p=0,106$);
- ∴ pušenjem pacijenata ($p=0,593$);
- ∴ prisustvom prethodnog oboljenja pacijenta ($p=0,276$);
- ∴ poslednjim poznatim ishodom bolesti pacijenta (0,178), čak ni kada su ishodi bili grupisani – bez progresije (Ter, KR, PR, S)/sa progresijom (P) ($p=0,898$) i sa regresijom (Ter, KR, PR)/bez regresije (S, P) ($p=0,695$).

Statistički značajna razlika dokazana je u distribuciji prisustva EBV DNK među različitim TNM stadijumima ($p=0,029$) (Grafikon 20.). Kod karcinoma bez lokalizacije primarnog tumora (Tx), EBV DNK nije dokazana.



Grafikon 20. Distribucija prisustva EBV DNK među različitim TNM stadijumima ($p=0,029$).

Kako bi se utvrdili eventualni prediktori/faktori rizika za patogenezu karcinoma, identifikovani su ishodi na osnovu progresije/regresije i TNM stadijuma tumora:

1. Ishodi "progresija/regresija" UCNT pacijenata grupisani su na dva načina: ISHOD1=bez progresije (Ter, KR, PR, S)/sa progresijom (P) i ISHOD2=sa regresijom (Ter, KR, PR)/bez regresije (S, P). Statističkom identifikacijom verovatnih prediktora ni u univarijantnom (EBV DNK, EBNA-2 genotip, LMP-1 varijanta, LMP-1 delecija, EBNA-1 subtip), ni u multivarijantnom modelu (prisustvo EBV DNK i pol, uzrast, mesto prebivališta,

pušenje ili prisustvo prethodnog oboljenja UCNT pacijenata) nisu dokazani faktori rizika ni za progresiju, ni za regresiju karcinoma.

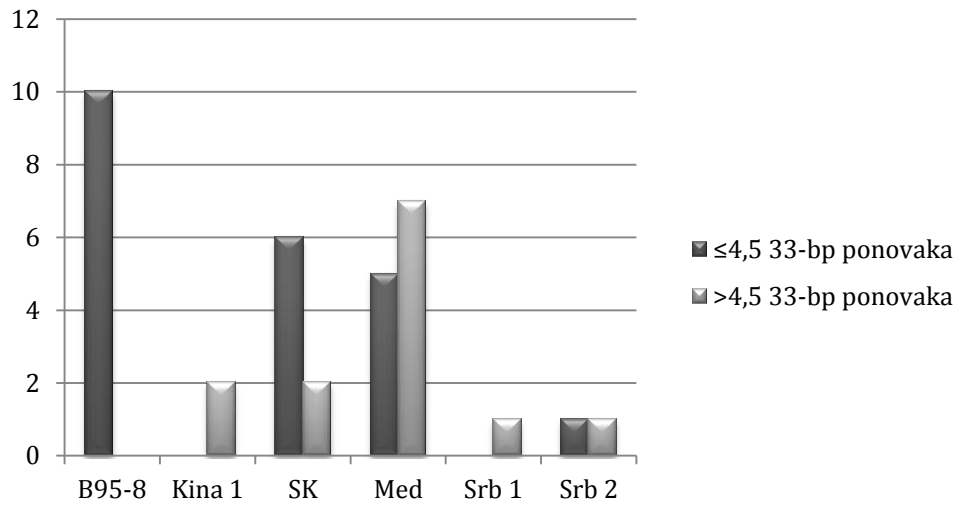
2. Ni u ispitivanju TNM stadijuma nisu dokazani faktori rizika. Ipak, kada su analizirane pojedinačne karakteristike EBV, TNM su grupisani u dve kategorije, I - IVA i IVB, pri čemu je IVB izdvojen kao najlošiji stadijum EBV pozitivnih karcinoma. Na taj način je, kao verovatni prediktor TNM IVB, dokazano prisustvo LMP-1 delecije ($p=0,012$) (Tabela 22.).

Tabela 22. Distribucija LMP-1 delecije u TNM stadijumima bez/sa metastaziranjem tumora u udaljene (>6cm) limfne noduse i/ili supraklavikularne jame (N3).

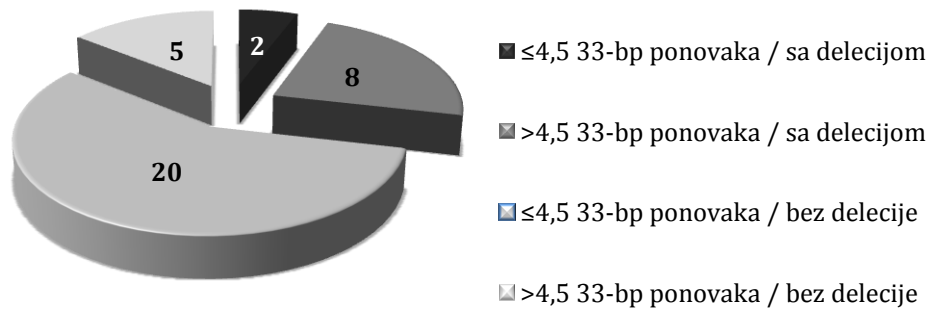
	TNM I - IVA	TNM IVB	ukupno	p vrednost
Odsustvo LMP-1 delecije	23	2	25	p=0,012
Prisustvo LMP-1 delecije	5	5	10	
ukupno	28	7	35	

Ispitivanjem međusobnih karakteristika LMP-1 sekvenci UCNT izolata, dokazana je razlika u distribuciji broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $> 4,5$) između različitih LMP-1 varijanti ($p=0,004$), kao i između izolata sa i bez delecije ($p=0,002$) (Grafikoni 21. i 22.).

Ipak, nije utvrđena značajna razlika u distribuciji broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $> 4,5$) između različitih tipova delecije ($p=1$).



Grafikon 21. Distribucija broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $>4,5$) između različitih LMP-1 varijanti UCNT izolata ($p=0,004$).



Grafikon 22. Distribucija broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $>4,5$) između UCNT izolata sa i bez LMP-1 delecija ($p=0,002$).

Distribucija LMP-1 sekvenci ispitivana je i među EBNA-2 genotipovima. Nisu utvrđene međusobne povezanosti:

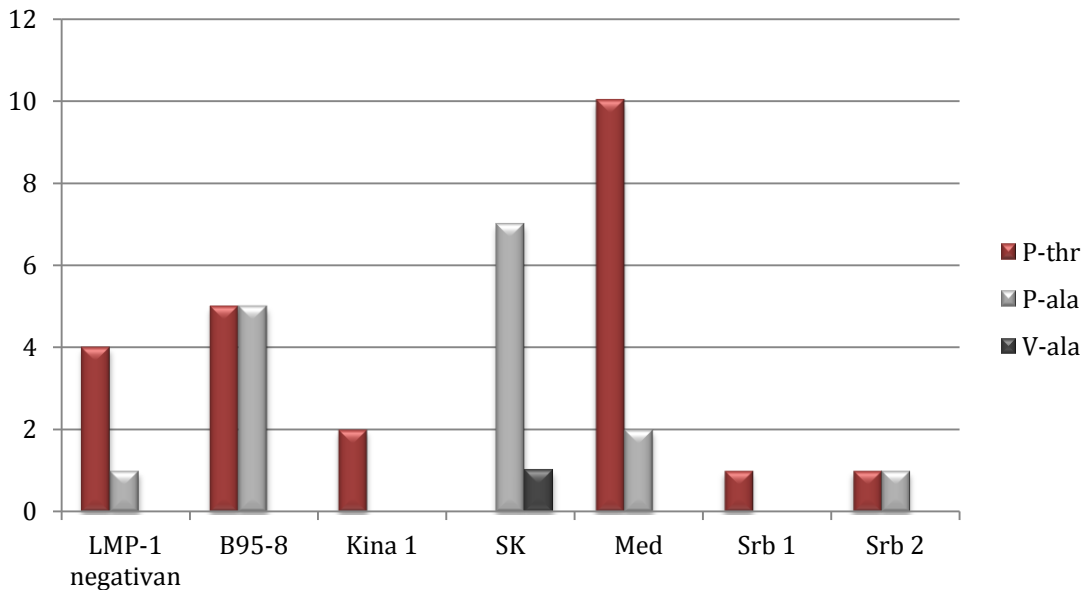
- ∴ LMP-1 varijanta / EBNA-2 genotip, $p=0,187$;
- ∴ Prisustvo LMP-1 delecije / EBNA-2 genotip, $p=1$;
- ∴ Tip LMP-1 delecije / EBNA-2 genotip, $p=0,133$;
- ∴ Broj 33-bp ponovaka $\leq 4,5$ ili $>4,5$ / EBNA-2 genotip, $p=0,833$.

Kada su se karakteristike LMP-1 sekvenci poredile sa EBNA-1 subtipovima, utvrđene su 2 međusobne povezanosti:

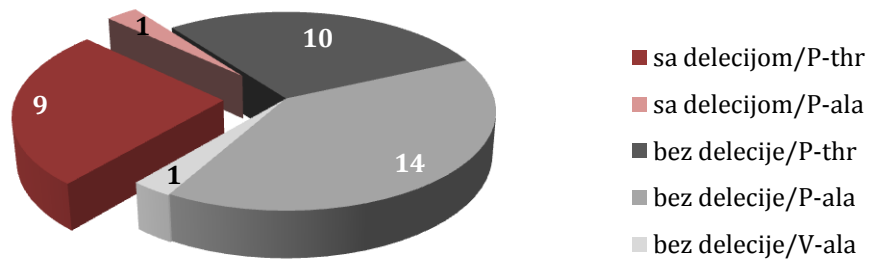
- ∴ LMP-1 varijanta / EBNA-1 subtip, $p=0,003$ (Grafikon 23.);
- ∴ Prisustvo LMP-1 delecije / EBNA-1 subtip, $p=0,024$ (Grafikon 24.).

Značajne razlike u distribuciji nije bilo između:

- ∴ Tip LMP-1 delecija / EBNA-1 subtip, $p=1$;
- ∴ Broj 33-bp ponovaka $\leq 4,5$ ili $>4,5$ / EBNA-1 subtip, $p=0,371$.



Grafikon 23. Distribucija LMP-1 varijanti UCNT izolata između različitih EBNA-1 subtipova ($p=0,003$).



Grafikon 24. Distribucija prisustva LMP-1 delecije između UCNT izolata sa različitim EBNA-1 subtipovima 2 ($p=0,024$).

Ispitivanje značajne razlike u distribuciji EBV polimorfizama 1-10 među dostupnim anamnestičkim i kliničkim podacima UCNT pacijenata nije pokazalo značajnost u odnosu na: muški i ženski pol, prebivalište, pušače i nepušače. Razlika je utvrđena među TNM stadijumima bez (I-IVA)/sa metastaziranjem tumora u udaljene (>6cm) limfne noduse i/ili supraklavikularne jame (N3, TNM IVB) (Tabela 23.):

- \therefore pol 2/TNM(I-IVA i IVB), $p=0,016$;
- \therefore pol 4/TNM(I-IVA i IVB), $p=0,042$;
- \therefore pol 7/TNM(I-IVA i IVB), $p=0,049$.

Tabela 23. Distribucija polimorfizama 2, 4 i 7 prema TNM stadijumima (sa ili bez N3):
pol 2/TNM(I-IVA i IVB), p=0,016; pol 4/TNM(I-IVA i IVB), p=0,042; pol 7/TNM(I-IVA i
IVB), p=0,049.

Polimorfizmi	TNM I-IVA	TNM IVB	ukupno	
Pol 2	Genotip 1/B95-8	7	-	7
	Genotip 1/Srb 1	-	1	1
	Genotip 1/Med	4	4	8
	Genotip 1/SK	7	-	7
	Genotip 1/Srb 2	1	1	2
	Genotip 2/Med	1	-	1
	Genotip 2/SK	1	-	1
Pol 4	B95-8/P-thr	5	-	5
	B95-8/P-ala	5	-	5
	Srb 1/P-thr	-	1	1
	Med/P-thr	6	4	10
	Med/P-ala	2	-	2
	Kina 1/P-thr	1	1	2
	SK/P-ala	7	-	7
	SK/V-ala	1	-	1
	Srb 2/P-thr	1	-	1
	Srb 2/P-ala	-	1	1
Pol 7	sa del/P-thr	4	5	9
	sa del/P-ala	1	-	1
	bez del/P-thr	10	1	11
	bez del/P-ala	12	1	13
	bez del/V-ala	1	-	1

Kada je izdvojen najčešći polimorfizam 1: genotip 1/Med/P-thr, analiza je pokazala da je on verovatni prediktor lošijeg TNM gradusa, tj. TNM IVB (metastaziranje tumora u udaljene (>6cm) limfne noduse i/ili supraklavikularne jame (N3)) (p=0,013) (Tabela 24.). I u multivarijantnom modelu, bez obzira na pol i starost pacijenta, opisani polimorfizam 1 (genotip 1/Med/P-thr) dokazan je kao nezavisni prediktor lošijeg TNM-a (p=0,013).

Tabela 24. Distribucija genotip 1/Med/P-thr i ostalih kombinacija u okviru polimorfizma 1 u TNM stadijumima bez/sa metastaziranjem tumora u udaljene (>6cm) limfne noduse i/ili supraklavikularne jame (N3).

	TNM I - IVA	TNM IVB	ukupno	P vrednost
genotip 1/Med/P-thr	3	4	7	p=0,013
Ostale kombinacije u okviru polimorfizma 1	18	1	19	
ukupno	21	5	26	

Jedino je kod polimorfizma 8 utvrđena značajna razlika u učestalosti između pacijenata čiji je ishod oboljenja bio bez, odnosno sa progresijom (p=0,053) (Tabela 25.).

Tabela 25. Distribucija polimorfizma 8 prema ishodu (bez ili sa progresijom) (p=0,053).

Polimorfizmi	Bez progresije	Sa progresijom	ukupno	
Pol 8	Genotip 1/≤4,5 33-bp pon/P-thr	2	-	2
	Genotip 1/≤4,5 33-bp pon/P-ala	-	3	3
	Genotip 1/≤4,5 33-bp pon/V-ala	1	-	1
	Genotip 1/>4,5 33-bp pon/P-thr	1	4	5
	Genotip 1/>4,5 33-bp pon/P-ala	1	-	1
	Genotip 2/≤4,5 33-bp pon/P-ala	1	-	1
	Genotip 2/>4,5 33-bp pon/P-ala	-	1	1
Ukupno	6	8	14	

4.6.4. Povezanost genetičkih markera virusa svih pacijenata u istraživanju

Ispitivanjem međusobnih karakteristika sekvenci svih LMP-1 izolata ovog istraživanja, dokazana je razlika u (Tabela 26.):

- ∴ distribuciji broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $> 4,5$) između različitih LMP-1 varijanti ($p < 0,001$);
- ∴ distribuciji broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $> 4,5$) između izolata sa i bez delecije ($p = 0,001$);
- ∴ distribuciji broja 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $> 4,5$) između različitih tipova delecije ($p = 0,021$).

Pri ispitivanju razlike u distribuciji karakteristika LMP-1 sekvenci sa EBNA-2 genotipovima, nisu utvrđene međusobne povezanosti:

- ∴ LMP-1 varijanta / EBNA-2 genotip, $p = 0,862$;
- ∴ Prisustvo LMP-1 delecije / EBNA-2 genotip, $p = 1$;
- ∴ Tip LMP-1 delecije / EBNA-2 genotip, $p = 0,328$;
- ∴ Broj 33-bp ponovaka $\leq 4,5$ ili $> 4,5$ / EBNA-2 genotip, $p = 0,926$.

Međutim, kada su se karakteristike LMP-1 sekvenci poredile sa EBNA-1 subtipovima, dokazana je razlika u distribuciji (Tabela 27.):

- ∴ LMP-1 varijante među EBNA-1 subtipovima, $p = 0,001$;
- ∴ Prisustvo LMP-1 delecije / EBNA-1 subtip, $p = 0,007$;

Razlika nije dokazana u dva slučaja:

- ∴ Tip LMP-1 delecije / EBNA-1 subtip, $p = 0,328$;
- ∴ Broj 33-bp ponovaka $\leq 4,5$ ili $> 4,5$ / EBNA-1 subtip, $p = 0,506$.

Tabela 26. Distribucija 33-bp ponovaka prema oboljenju, deleciji i LMP-1 varijanti

oboljenje			Broj 33-bp ponovaka	
			2-4,5	5-6
IM	Tip del/ bez del	27-bp-del	1	-
		30-bp-del	5	6
		147-bp-del	-	1
		Bez del	14	5
	LMP-1 varijanta	B95-8	10	-
		Kina 1	6	6
		SK	5	1
		Med	-	5
T	Tip del/ bez del	30-bp-del	5	-
		69-bp-del	-	2
		147-bp-del	-	2
		Bez del	7	1
	LMP-1 varijanta	B95-8	6	-
		Kina 1	5	-
		SK	1	-
		Med	-	5
UCNT	Tip del/ bez del	30-bp-del	1	3
		69-bp-del	1	5
		Bez del	20	5
	LMP-1 varijanta	B95-8	10	-
		Kina 1	-	2
		SK	6	2
		Med	4	8
		Srb 1	-	1
Srb 2	1	-		

Tabela 27. Distribucija LMP-1 varijanti i delecija među EBNA-1 subtipovima

LMP-1 varijanta	LMP- delecija	EBNA-1 subtip				ukupno
		P-thr	P-ala	V-ala	V-val	
B95-8	27-bp-del	1	-	-	-	1
	Bez del	17	8	-	-	25
Kina 1	30-bp-del	15	3			18
Severna Karolina	Bez del	1	13	1		15
Mediteran	30-bp-del	1	-	-	-	1
	69-bp-del	4	2	-	-	6
	147-bp-del	1	1	-	1	3
	Bez del	7	3	1	-	11
Srbija 1	30-bp-del	1	-	-	-	1
Srbija 2	69-bp-del	1	-	-	-	1
	Bez del	-	1	-	-	1

Statistička analiza distribucije EBV polimorfizama 1-10 pokazala je značajnu razliku u učestalosti polimorfizama 1 i 2 među grupama pacijenata sa različitim oboljenjima ($p=0,002$ i $p=0,001$) (Tabela 26.). U poređenju sa polom i starošću pacijenata nije bilo dokazane povezanosti sa EBV polimorfizmima.

Tabela 28. Distribucija polimorfizama 1 i 2 prema oboljenjima

Polimorfizmi	IM	T	UCNT	ukupno	
Pol 1	Genotip 1/B95-8/P-thr	7	4	5	16
	Genotip 1/B95-8/P-ala	1	1	2	4
	Genotip 1/Srb 1/P-thr	-	-	1	1
	Genotip 1/Med/P-thr	2	-	7	9
	Genotip 1/Med/P-ala	3	-	1	4
	Genotip 1/Kina 1/P-thr	9	3	-	12
	Genotip 1/Kina 1/P-ala	2	-	-	2
	Genotip 1/SK/P-thr	1	-	-	1
	Genotip 1/SK/P-ala	5	-	6	11
	Genotip 1/SK/V-ala	-	-	1	1
	Genotip 1/Srb 2/P-thr	-	-	1	1
	Genotip 1/Srb 2/P-ala	-	-	1	1
	Genotip 2/B95-8/P-thr	-	1	-	1
	Genotip 2/B95-8/P-ala	1	-	-	1
	Genotip 2/Med/P-ala	-	-	1	1
	Genotip 2/Med/V-ala	-	1	-	1
	Genotip 2/Med/V-val	-	1	-	1
	Genotip 2/Kina 1/P-thr	-	1	-	1
	Genotip 2/Kina 1/P-ala	-	1	-	1
	Genotip 2/SK/P-ala	-	-	1	1
Pol 2	Genotip 1/B95-8	8	4	7	19
	Genotip 1/Srb 1	-	-	1	1
	Genotip 1/Med	5	-	8	13
	Genotip 1/Kina 1	12	3	-	15
	Genotip 1/SK	6	-	7	13
	Genotip 1/Srb 2	-	-	2	2
	Genotip 2/B95-8	1	-	-	1
	Genotip 2/Med	-	1	1	2
	Genotip 2/Kina 1	-	1	-	1
	Genotip 2/SK	-	-	1	1

5. DISKUSIJA

Nakon 50 godina od otkrića Epstein-Barr virusa, i dalje je nepotpuno razumevanje specifične i složene komunikacije između virusa i domaćina. Brojna istraživanja danas, usmerena su na proučavanje polimorfizma virusnih gena, ali i gena domaćina. Pretpostavlja se da su upravo ovi faktori ključni za ishod infekcije. Iako su svakodnevno dostupna nova saznanja, ona istovremeno otvaraju teme budućim naučnim ispitivanjima.

U ovoj studiji analizirani su EBV izolati dobijeni od pacijenata sa tri različita oboljenja koja se povezuju sa EBV infekcijom. Prvu grupu činili su pacijenti sa infektivnom mononukleozom, kao primerom primarne infekcije. Drugu grupu predstavljali su pacijenti sa transplantiranim organom, kod kojih je zbog indukovane imunosupresije bila moguća reaktivacija latentne EBV infekcije. U poslednjoj, trećoj grupi, bili su pacijenti sa nazofaringealnim karcinomom, kao modelom maligne bolesti za koju je pokazana direktna povezanost sa EBV infekcijom. Cilj je bio da se analizom izolata na nivou tri EBV gena, pokažu najznačajniji polimorfizmi tih gena odgovornih za patogenezu pomenutih oboljenja.

Ovo je prva studija u našoj zemlji, ali i zemljama okruženja koja se bavi izučavanjem genetičke varijabilnosti EBV izolata.

Dokazivanje EBV DNK, kao prvi korak istraživanja, predstavljalo je način selekcije izolata koji su se dalje analizirali na genetičkom nivou. Kod pacijenata sa infektivnom mononukleozom, virusna nukleinska kiselina dokazuje se u epitelnim ćelijama orofaringealne regije, salivi i B limfocitima krvi. Potvrda viremije, koja je najveća u prvim danima infekcije, predstavlja najsenzitivniju metodu laboratorijske dijagnostike pre stvaranja prvih specifičnih antitela. Ipak, viremija traje kratko, sa različitim vremenskim intervalom među obolelima (Bauer, i sar., 2005). Dokazivanje EBV DNK u krvi na početku infekcije moguće je kod 52-100% pacijenata, da bi u poslednjim danima akutne faze bolesti ovaj procenat pao ispod 40% (Ai, et al. 2012), (Yamamoto, i sar., 1995), (Cheng, i sar., 2007). Zapravo, nakon 2-3 nedelje od pojave simptoma, virus je nedetektabilan u krvi (Bauer, i sar., 2005). U ovoj studiji pokazana je značajna razlika u distribuciji EBV DNK između pacijenata lečenih ambulantno i onih na bolničkom lečenju. Kod 92% pacijenata lečenih ambulantno, i tek njih 26% lečenih u bolnici dokazana je EBV DNK u krvi. Prvi razlog može biti niska vrednost viremije, ili njen rani pad (Cheng, i sar., 2007). Takođe, svi pacijenti prijavljivali su početak oboljenja 2-28 dana pre momenta uzimanja krvi za laboratorijsku dijagnostiku, što je, kod jednog broja obolelih, bilo prekasno za otkrivanje EBV DNK. Razlog za nepravovremeno javljanje u tercijarnu zdravstvenu ustanovu najčešće je neprepoznavanje oboljenja usled nespecifične kliničke slike, i retko, lečenje antibioticima zbog sumnje na bakterijsku infekciju ždrela. Prema podacima iz literature, kod samo 2,6% slučajeva stare infekcije, EBV DNK može biti dokazana u krvi (Bauer, i sar., 2005). I konačno, sindrom koji su pokazivali pacijenti, iz čijih uzoraka nije dokazana EBV DNK, mogao je biti izazvan i drugim mikroorganizmima.

Prema protokolu laboratorijskih testova kod pacijenata nakon transplantacije, skrining i monitoring virusnih infekcija obuhvata periodično testiranje krvi, pre svega na prisustvo DNK herpesvirusa. Za predstavnike ove porodice postoji velika verovatnoća reaktivacije u stanju imunosupresije. Kod seronegativnih može se javiti primoinfekcija. Za bubrežne recipijente bez PTLD simptoma, skrining krvi na prisustvo EBV DNK podrazumeva mesečno testiranje u prva 4 meseca, a tromesečno

nakon tog perioda. Na taj način, korekcija terapije moguća je pre pojave komplikacije infekcije. Kod recipijenata koji su bili uključeni u istraživanje, 15% imalo je dokazanu viremiju u trenutku redovnog testiranja. Sličan rezultat opisali su i Niesters i saradnici, koji su EBV DNK dokazali kod 19,2% recipijenata solidnih organa (bubrega, srca i jetre) (Niesters, i sar., 2000).

Rutinsko testiranje pacijenata sa nazofaringealnim karcinomom na prisustvo EBV ne postoji van endemskih područja za ovaj malignitet. UCNT je dominantan tip NFK i u endemskim krajevima, ali i među pacijentima iz Srbije. Nezavisno od geografskog porekla, ovaj histopatološki tip NFK uglavnom je pozitivan na prisustvo EBV (Ozyar, i sar., 2004). Ipak, učestalost prirustva EBV manja je u neendemskih regionima kao što je SAD, u odnosu na Aziju (Gulley i Tang, 2008). U ovom istraživanju EBV je dokazan kod približno 35% uzoraka, što nije neobično. Naime, EBV je dokazivan otkrivanjem DNK, a ne pojedinačnih proteina, i to u trajnim parafinskim kalupima tkiva, čuvanim i nekoliko godina na sobnoj temperaturi. Za takav materijal poznata je smanjena mogućnost izolovanja virusne DNK usled degradacije DNK molekula (Jen, i sar., 2003), (D'Addario i Chauvin, 2000). Takođe, nije isključeno da UCNT ovog geografskog područja nije obavezno povezan sa EBV.

Prisustvo EBV DNK, dokazano u UCNT biopstatima, nije bilo povezano sa drugim anamnestičkim podacima pacijenata, kao ni progresijom ili regresijom tumora. Međutim, procenat EBV DNK pozitivnih biopsija opadao je sa rastom TNM gradusa, dok kod neidentifikovanih primarnih tumora (Tx) virusna nukleinska kiselina nije dokazana. Poznata je teorija prema kojoj aktivan EBV na različite načine utiče na onkogenezu u toku njenog trajanja. U ranim fazama, reaktivacija virusa u B limfocitima može pospešiti infekciju epitelnih ćelija nazofarinksa, međusobnim direktnim kontaktom između inficiranih ćelija. I drugi autori smatraju da je uloga EBV najznačajnija u ranim fazama onkogeneze (Perez-Ordóñez, 2007). U skladu sa navedenim, različita distribucija virusne DNK među TNM stadijumima naših

pacijenata može se tumačiti promenom aktivnosti i uloge EBV tokom malignog procesa.

Osnovna genotipizacija Epstein-Barr virusa, pre svega, podrazumeva definisane polimorfizme EBNA-2 gena. Dominantna učestalost genotipa 1, dokazanog kod 90% naših izolata, u korelaciji je sa do sada opisanom geografskom distribucijom. Naime, pretpostavlja se da rasprostranjenost EBV genotipova zavisi od genetske predispozicije ljudi istog geografskog područja (Ikegaya, i sar., 2007), (Klemenc, i sar., 2006). Zato je i interesantno da je učestalost genotipa 1 (90%) približna onoj koja je dokazana kod pacijenata iz Slovenije (86%) (Klemenc, i sar., 2006). U studije sa sličnim rezultatima spadaju i one iz Argentine i Brazila (80%), dok je najviša zastupljenost genotipa 1 dokazana u zemljama dalekog istoka kao što su Kina i Malezija, ali i u Turskoj i Poljskoj (98-100%) (Lorenzetti, Gantuz, i sar., 2011), (Hassan, i sar., 2006), (Ai, i sar., 2012), (Peh, i sar., 2003), (Tacyildiz, i sar., 1998), (Polz, i sar., 2014).

Povezanost između određenog genotipa i oboljenja nije mogla biti utvrđena. Ipak, postojala je značajna razlika u distribuciji EBNA-2 genotipova među izolatima pacijenata sa različitim oboljenjima. Tako je grupa pacijenata nakon transplantacije imala značajno veću učestalost genotipa 2 (38%) u odnosu na ostale grupe (ispod 7%). Naime, čest je nalaz genotipa 2 kod imunosuprimiranih, gde spadaju i primaoci organa (Borisch, i sar., 1992). Sličan rezultat (23% genotipa 2) imali su i istraživači iz Brazila, kada su uradili genotipizaciju kod imunosuprimiranih pacijenata sa različitim oboljenjima (Hassan, i sar., 2006).

Filogenetska analiza i inspekcija karakterističnih LMP-1 lokusa, veoma je značajna karika svetskih istraživanja najvažnijeg onkogenog EBV proteina. Rezultatima ove studije pokazano je prisustvo 4 od sedam poznatih LMP-1 varijanti: B95-8, Kina 1, SK i Med, što je u korelaciji sa objavljenim evropskim podacima (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999). Prema tim podacima, najzastupljenija varijanta je Kina 1 (45%), dok je u našoj studiji ona imala treću

zastupljenost. Zapravo, među izolatima iz Srbije dominirala je varijanta B95-8 (31%). Iako B95-8 nije najčešća varijanta drugih istraživanja interesantno je da trećina izolata pripada ovoj varijanti i u našoj, ali i u Edwards-ovoj evropskoj studiji (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999). Na osnovu toga, možemo zaključiti da je, bez obzira na raspored varijanti prema učestalosti, za Evropu, varijanta B95-8 karakteristika trećine izolata. Dalje, Med i SK u našim izolatima bili su skoro dvostruko češći nego što je prethodno objavljeno u Evropi (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999). Konačno, pronađene su i 2 varijante koje se nisu mogle grupisati sa već postojećim. Tako su Srb 1 i Srb 2 postale nove, do sada neopisane varijante, ne samo među evropskim nego i među ostalim izolatima.

Dokazana značajnost razlike u distribuciji LMP-1 varijanti među oboljenjima, utvrđena je i ranije, kod drugih autora. Ipak, njihova učestalost se u našoj studiji primetno razlikuje. LMP-1 dokazan u mononukleozu evropskih izolata, kao i izolata iz Srbije, obuhvatao je 4 varijante. Najmanje zastupljena bila je varijanta Med, sa 12% kod evropskih, i 15% kod naših izolata (Chang, i sar., 2009). Dok su ostale varijante u Evropi bile jednako raspoređene, među izolatima ovog istraživanja najčešće je dokazana Kina 1 (36%). Dominacija Kine 1 opisana je i kod argentinskih IM pacijenata (Lorenzetti, Gantuz, i sar., 2012).

Iz krvi pacijenata sa transplantiranim organima takođe su izolovane 4 varijante. Najučestalija bila je B95-8 (35%), dok je samo 1 izolat predstavljao SK (6%). Ovakvi rezultati su između evropske i severnoameričke distribucije LMP-1 varijanti kod nemalignih bolesti (Chang, i sar., 2009).

Najzastupljenija varijanta kod UCNT izolata bio je Med (34%), dok je B95-8 (29%) bio na drugom mestu. Upravo ovakav redosled učestalosti već je opisan u Evropi i na severu Afrike (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999), (Dardari, i sar., 2005). Međutim, varijante SK (8 izolata) i Kina 1 (2 izolata), koje su identifikovane u srpskim izolatima, dokazane su samo u Rusiji (Senyuta, i sar., 2014). Ove varijante nikada do sada nisu opisane kod evropskih, kao ni endemskih

nazofaringealnih karcinoma (Chang, i sar., 2009). Na kraju, nove varijante Srb 1 i Srb 2 pronađene su samo u grupi pacijenata sa UCNT. Konzistentnost LMP-1 varijabilnosti u slučaju NFK, može da korelira sa transformacijom epitelnih ćelija, redukcijom imunskog prepoznavanja i drugim, do sada neidentifikovanim mehanizmima (Edwards, Sitki-Green, i sar., 2004). Pokazano je da specifične izmene virusnog HLA epitopa na LMP-1, a koje su karakteristika pojedinih varijanti, mogu onemogućiti prepoznavanje od strane citotoksičnih T limfocita, i tako obezbediti preživljavanje virusa u tumorskim ćelijama (Edwards, Sitki-Green, i sar., 2004).

U okviru C-terminalnog regiona LMP-1 gena, a pre svega CTAR-2 domena (ak 332-386) odgovornog za aktivaciju NFK, mogu se naći LMP-1 karakteristične delecije od kojih je najčešća 30-bp del (ak 346-355). U zavisnosti od prisustva, tj. odsustva tih delecija, u ovoj studiji definisano je 5 kategorija izolata: bez delecije, sa do sada nepoznatom delecijom od 27-bp, sa 30-bp del, sa retkom 69-bp del i sa još jednom, do sada nepoznatom, 147-bp delecijom. Kod većine autora, LMP-1 delecija predstavlja karakteristiku geografskog i etničkog EBV polimorfizma (D'Addario i Chauvin, 2000), (Hahn, i sar., 2001), (Zhang, i sar., 2002). Na primer, kod izolata nazofaringealnih karcinoma u endemskim regionima Azije, delecija je dokazana u 84-100% slučajeva, dok je kod zdravih nosilaca imala znatno nižu učestalost (0-59%) (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999), (Zhang, i sar., 2002), (Tan, Peh i Sam, 2003). Sa druge strane, u neendemskim regionima za nazofaringealni karcinom, kao što su Evropa, Severna Amerika i Severna Afrika, delecija se može dokazati kod 55-71% obolelih od NFK ali i 52-75% zdravih pacijenata (Berger, i sar., 1997), (Ai, i sar., 2012). I konačno, u Rusiji, delecija je pronađena jedino kod zdravih nosilaca, dok kod NFK nije bila prisutna (Hahn i sar., 2001). U ovom istraživanju, nešto više od trećine izolata (39%), bilo da su poreklom iz benignog ili malignog oboljenja, ima jednu od 4 identifikovane delecije, što je slično objavljenim rezultatima iz Danske (Sandvej, Peh, i sar., 1994). Prisustvo delecije nije bilo povezano sa određenim oboljenjem, ali je zanimljivo da je delecija jedino u grupi pacijenata sa transplaniranim organom identifikovana kod više od polovine izolata (53%).

Dominacija izolata sa delecijom u odnosu na izolate bez delecije opisana je i kod drugih imunosuprimiranih pacijenata (Vallat-Decouvelaere, i sar., 2002). Ona je objašnjena slabošću imunskog sistema da eliminiše EBV inficirane ćelije. Pošto je poznato da delecija produžava poluživot LMP-1 molekula, vremenom dolazi do prevladavanja virusa sa LMP-1 delecijom (Vallat-Decouvelaere, i sar., 2002). Najmanja zastupljenost delecije bila je u grupi izolata nazofaringealnog karcinoma. Prema ranije opisanim podacima, a na osnovu rezultata ovog istraživanja, Srbija ne odstupa od ostalih NFK neendemskih regiona.

Iako za LMP-1 delecije postoji dokazana geografski specifična distribucija, prema literaturnim podacima one mogu biti povezane sa EBV malignitetima, prvenstveno agresivnog toka (Li, Chang i Liu, 1996). Ovakvu teoriju podržava rezultat identifikacije delecija kod NFK sa prostora Srbije. Tako je LMP-1 najlošijeg TNM gradusa EBV pozitivnih bioptata uglavnom bio sa delecijom (71%). Učestalost delecije u ostalim TNM gradusima bila je samo 18%. Uočena razlika potvrđena je statističkom značajnošću. Dakle, u ovom slučaju, agresivnost tumora, koja se manifestuje metastaziranjem u udaljene (>6cm) limfne noduse i/ili supraklavikularne jame (N3), može biti posledica prisustva delecije. Do istog zaključka došli su i istraživači sa Tajlanda, kod kojih je učestalost delecije 21 put bila veća kod III i IV gradusa u odnosu na I i II (Tiwawech, i sar., 2008). Mehanizami koji objašnjavaju uticaj LMP-1 na pojavljivanje metastaziranja opisao je Dawson sa saradnicima (Dawson, Port i Young, 2012). Tako, LMP-1 indukuje matriksne metaloproteinaze (MMP) i suprimira različite inhibitore metastaziranja, kao što je RECK1 (Liu, i sar., 2003). Takođe, povećava ekspresiju ezrina, koji je srodan proteinima ćelijskog citoskeleta, a učestvuje u invaziji tumorskih ćelija i stvaranju metastaza. Sa druge strane među izolatima NFK iz Malezije, korelacija prisustva LMP-1 delecije i učestalosti metastaziranja nije dokazana (Tan, Peh i Sam, 2003).

Kao važan, izdvaja se i rezultat prema kome se tipovi delecije značajno razlikuju među oboljenjima ove studije. Takva razlika, na primer, nije pronađena u

studijama koje su poredile učestalosti 30-bp i 69-bp delecije među NFK u odnosu na druge tumore (Senyuta, i sar., 2014). Ni u jednoj našoj grupi nisu identifikovana sva 4 tipa delecija. Najučestalija, i prisutna u svakoj grupi obolelih, bila je 30-bp del (63%). Njen nastanak tokom replikacije događa se usled pogrešnog sparivanja lanaca (Sandvej, Peh, i sar., 1994). Naime, na nukleotidnim pozicijama 168227–168235 i 168257–168265 nalaze se dva identična ponovka veličine 9 nukleotida koji kodiraju dva Gly tripleta (GGCGGCGGT). Zbog toga dolazi do proklizavanja lanaca tokom sparivanja i nastanka delecije. Kao ishod, delecija sadrži jedan od ovih ponovaka. Međutim, kako su ponovci sastavljeni samo od Gly, nemoguće je odrediti da li prvi ponovak predstavlja prvih 9 nukleotida delecije, ili drugi ponovak predstavlja poslednjih 9 nukleotida delecije.

Interesantno je da je jedan IM izolat pokazao do sada nepoznatu, 27-bp deleciju koja uključuje ak 344-352 ili 346-354. Kako ova delecija pokriva region opisan i kod 30-bp del, ali sa jednim tripletom manje, verovatno je da su mehanizmi nastanka obe delecije isti.

Među našim izolatima, kod njih 8 identifikovana je 69-bp delecija. Za razliku od česte 30-bp delecije, pronađene u većini studija iz različitih geografskih područja, del od 69-bp između ak 333 i 355 veoma je retka. Nakon prvog otkrića ove delecije kod pacijenta sa Hodgkin limfomom, ona je opisana je i kod drugih pacijenata sa istim oboljenjem, ali i različitim limfoproliferativnim poremećajima (Knecht, Bachmann, i sar., 1993), (Barozzi, i sar., 1999), (Trimeche, i sar., 2005), (Klein, i sar., 1995), (Knecht, Raphael, i sar., 1996), (Larcher, McQuain, i sar., 1997), (Tacyildiz, i sar., 1998). Mehanizam pogrešnog sparivanja i ovde može objašnjavati nastanak delecije, jer dva kratka ponovka sa istim kodirajućim značenjem ograničavaju deleciju: GGAGGTGA (nukleotidi 168225-168232) i GGCGGTGA (nukleotidi 168255-168262) (Hadhri-Guiga, i sar., 2006), (Sandvej, Peh, i sar., 1994). Pri tome, prvih 6 nukleotida drugog ponovka ulazi u sastav delecije. Najveća učestalost 69-bp delecije od 50%, zabeležena je u BL izolatima u Turskoj (Tacyildiz, i sar., 1998). Međutim,

postoji samo nekoliko izveštaja o 69-bp deleciji u biptatima NFK, što naš rezultat čini značajnim (Grunewald, i sar., 1998), (Hadhri-Guiga, i sar., 2006), (Senyuta, i sar., 2014).

U poređenju sa prethodno objavljenim podacima u Evropi, Severnoj Americi i Tunisu, gde 69-bp delecija među NFK izolatima ima prevalenciju između 4 i 5%, u Srbiji je prevalencija značajno viša (17%) (Grunewald, i sar., 1998), (Hadhri-Guiga, i sar., 2006). Čak 6 od ukupno 8 dokazanih 69-bp delecija, nađeno je kod UCNT bioptata, što je najsličnije rezultatima iz Rusije (Senyuta, i sar., 2014). Kod njih je 6/7 ovakvih delecija takođe dokazano kod NFK, sa udelom od 27%. Ovo bi moglo da korelira sa podacima o značajnom imortalizirajućem i onkogenom potencijalu delecije, pri čemu je kapacitet transformacije ćelija u *in vitro* uslovima veći kod izolata sa 69-bp delecijom u odnosu na one sa 30-bp delecijom (Larcher, Bernhard, i sar., 2003), (Sandvej, Munch i Hamilton-Dutoit, 1996). Na ovaj način, nalaz 69-bp delecije mogao bi predstavljati prediktivni marker za početak maligne transformacije u neendemskim regionima.

Još jedna, potpuno nova delecija od 147-bp (168381 i 168233), identifikovana je kod 3 izolata nemalignog porekla. Kako je ova delecija najveća od do sada opisanih, a nema je kod izolata nazofaringealnih karcinoma, može se pretpostaviti da ona pokriva neke od važnih "onkogenih" lokusa.

I drugi autori opisivali su neuobičajene delecije LMP-1 gena (12-, 24-, 63-, 81-bp) (Sandvej, Peh, i sar., 1994), (Dolcetti, i sar., 1997), (D'Addario i Chauvin, 2000), (Ayadi, i sar., 2007). Takođe, opisan je i mogući mehanizam nastanka za delecije koje još uvek nisu izolovane (33-, 51-, 124-bp) (Hadhri-Guiga, i sar., 2006).

Ponovci od 33-bp nalaze se u okviru CTAR-3 regiona LMP-1 gena, odgovornog za vezivanje za JAK-3. Ovi ponovci predstavljaju značajno rekombinantno mesto, ali i geografsku specifičnost strukture EBV genoma (Miller, i sar., 1994), (Senyuta, i sar., 2014). Među našim izolatima, broj ponovaka varirao je od 2 do 6, pri čemu je jedino

kod UCNT izolata dokazano prisustvo svih 6 kombinacija broja ponovaka ove studije. Prema literaturnim podacima iz Rusije, Afrike, Japana, Kine, Aljaske i Argentine, broj identifikovanih ponovaka kreće se od 3-7, pa su dva UCNT izolata sa po 2 ponovka, do sada, neopisan slučaj (Senyuta, i sar., 2014), (Kanai, i sar., 2007), (Miller, i sar., 1994), (Lorenzetti, Gantuz, i sar., 2011). Kod nas, međutim, nije dokazan broj od 7 ponovaka.

U okviru dela LMP-1 koji obuhvata 33-bp ponovke, nalaze se i dve insercije dužine 5 ak: HDPLP (lokusi 276-280 i 303-307). Poznato je da prva od dve insercije, između 2. i 3. ponovka, predstavlja ključno mesto aktivacije JAK-3/STAT signalnog puta (Miller, i sar., 1994), (Li i Chang, 2003). Ipak, ovaj motiv nije neophodan u biološkoj funkciji LMP-1, pa nije neuobičajen njegov izostanak, koji se u literaturi navodi kao delecija (Walling i Raab-Traub, 1994). Ona se sreće kod 72% izolata naše studije.

Do sada nije pokazano da broj ponovaka ili delecija HDPLP motiva ima uticaj na transformacione sposobnosti LMP-1 (Li, Chang i Liu, 1996). U ispitivanju povezanosti broja ponovaka i određenog oboljenja, ni u ovom istraživanju nije bilo pozitivnih rezultata. Takođe, delecija od 5 ak nije imala različitu distribuciju između 3 grupe obolelih. Međutim, kod IM grupe, pacijenti sa normalnim vrednostima ALT uvek su imali više od 4,5 33-bp ponovka. Kako do sada nema jasnih podataka o efektu broja ponovaka na funkciju LMP-1, ali i na metaboličke funkcije ćelije domaćina, teško je predvideti mehanizam na osnovu koga je došlo do regulacije nivoa ALT kod IM pacijenata. Sa druge strane, tumačenje otežava i podatak, da su svi ambulantno lečeni pacijenti imali $\leq 4,5$ 33-bp ponovaka. Za ostale biohemijske parametre nije utvrđena korelacija.

C terminalni region LMP-1 gena, a naročito njegov najvarijabilniji deo koji kodira aminokiseline 322 do 366, poznat je po brojnim tačkastim mutacijama. Kao najčešće dve izmene aminokiselina izvan karakterističnih 7 lokusa, definisanih od strane Edwards-a i sar., kod izolata iz Srbije bile su na lokusima 212 (89%) i 309

(68%) (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999). Mutacija koja dovodi do izmene Gly→Ser na lokusu 212 opisivana je među izolatima Argentine, Japana i Kine, ali ona u Evropi i Rusiji nije dokazana (Lorenzetti, Gantuz, i sar., 2012), (Nagamine, i sar., 2007), (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999), (Hahn, i sar., 2001), (Senyuta, i sar., 2014). Interesantno je, da je izostanak ove supstitucije (identično B95-8 prototipu) kod srpskih izolata uglavnom bio vezan za 69-bp deleciju. Naime, 7 od 8 izolata sa 69-bp del bio je bez pomenute izmene dok je jedan umesto Gly imao Ala. Ovde treba napomenuti da je 7/8 izolata sa 69-bp del imalo još jednu specifičnu mutaciju koja je dovela do izmene Asp→Glu na poziciji 317. Ne samo da nema literaturnih podataka koji opisuju specifične mutacije za 69-bp deleciju, već je i sama Asp→Glu supstitucija (na 317) do sada bila nepoznata.

Mutacija koja dovodi do izmene aminokiseline na lokusu 309, bila je prisutna kod čak 98% svih izolata, izuzimajući one koji su pripadali varijanti B95-8. Ovakva karakteristika opisana je i kod limfoma u Japanu, kod nazofaringealnih karcinoma Vijetnama, kao i kod NFK i drugih tumora usne duplje u Rusiji (Nagamine, i sar., 2007), (Nguyen-Van, i sar., 2008), (Senyuta, i sar., 2014), (Hahn, i sar., 2001). Kod manje od 50% izolata dokazane su mutacije koje su dovele do izmena aminokiselina na mestima: 293 (20%), 313 (20%), 328 (33%), 331 (20%), 352 (35%) i 358 (22%). Prema literaturnim podacima, za dve od pomenutih 6 pozicija (313, 358) nije uobičajena visoka učestalost supstitucija ak, čak ni u poređenju samo sa evropskim izolatima (Vallat-Decouvelaere, i sar., 2002). Za supstituciju na poziciji 352 postoji podatak o specifičnosti za turske isolate (Tacyildiz, i sar., 1998). Zbog toga je interesantno da je u istom procentu (približno 37%) ova supstitucija postojala i među izolatima iz Srbije. Sa druge strane, druga turska specifična supstitucija na poziciji 326 nije dokazana ni kod jednog izolata naše studije. Konačno, ostale brojne mutacije LMP-1 gena nalazile su se sporadično, kod manje od 20% izolata.

Izmena Ser na poziciji 366 bila je retka (17,6%). Međutim mutacija koja dovodi do ove izmene prisutna je bez izuzetaka kod NFK izolata endemskih regiona i Rusije,

ali se spominje i kao česta u različitim izolatima iz Evrope (Vallat-Decouvelaere, i sar., 2002), (Senyuta, i sar., 2014), (Hahn, i sar., 2001). Iako izmena Ser izostaje kod izolata zdrave populacije endemskih krajeva za NFK, i kod npr. HL izolata Južne Amerike, dokazivanje Ser na lokusu 366 mogao bi da predstavlja specifičnu osobenost nazofaringealnih LMP-1 izolata pacijenata iz Srbije (Guiretti, i sar., 2007).

Razmatrajući potencijalni značaj fosforilacije Ser na pozicijama 309, 311, 313 i 324, ukazano je na mogućnost promene funkcionalnosti ili sazrevanja LMP-1 molekula (Moorthy i Thorley-Lawson, 1993), (Miller, i sar., 1994). Izolatima naše studije, zbog mutacija, nedostaje mogućnost fosforilacije na mestima 309 i 313. Na osnovu rezultata objavljenih eksperimenata, zaključeno je da fosforilacije ovih mesta nisu kritične za funkciju LMP-1 u malignitetima vezanim za EBV infekciju, kao i da je aktivan LMP-1 molekul zapravo nefosforilisan (Moorthy i Thorley-Lawson, 1993), (Miller, i sar., 1994).

Analizom sekvenci izolata iz Srbije, identifikovane su i mutacije koje dovode do supstitucije aminokiselina izvan karakterističnih 7 lokusa. Neke supstitucije bile su prisutne u svakom izolatu jedne varijante, pa su predstavljale obaveznu karakteristiku ovih varijanti. Sa druge strane, neke supstitucije pokazivale su jedinstvenost za pojedinačne varijante, i nisu se mogle naći u drugim izolatima. Tako su, svi B95-8 izolati imali mutacije koje dovode do supstitucije na lokusima 212 (Gly→Ser/Asn/Val) i 328 (Glu→Gln), pri čemu se supstitucija na lokusu 328 nije mogla naći među drugim izolatima. Ova izmena ne spominje se u literaturi kao jedinstvena za B95-8, zbog čega može predstavljati "geografsko" obeležje naših B95-8 izolata (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub., 1999). Izolati varijante B95-8 imali su još jednu svojstvenost. Naime, na poziciji 309 Ser nije bio izmenjen, što je za naše izolate takođe bio izuzetak. Što se tiče Kine 1, supstitucije ak na 212 (Gly→Ser/Arg), 309 (Ser→Asn), i 322 (Gln→Asn) bile su prisutne kod svih izolata, dok je supstitucija na 338 (Leu→Ser) pronađena kod skoro 90%. Iako je Asn na lokusu 322 bio jedinstven za Kinu 1, kao što je to bio slučaj i u ranijim istraživanjima,

ova izmena ak nije jedna od kritičnih za definisanje Kine 1 (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999), (Wang, Kanai, i sar., 2007). Sa druge strane, izmena u Ser na 338, u našem istraživanju, nije jedinstvena za Kinu 1, ali ni za oboljenje, iako je opisana kao karakteristična supstitucija ove varijante u NFK u Kini i Vijetnamu (Sung, i sar., 1998), (Nguyen-Van, i sar., 2008). Interesantno je da je u originalnoj klasifikaciji mutacija koja dovodi do ove supstitucije kritična za definisanje varijante Kina 3, ali ne i Kina 1 (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999). Među varijantama sa najbrojnijim dodatnim mutacijama bila je Severna Karolina, pa su se 8 dodatnih supstitucija mogle naći kod 93-100% SK izolata: 212 (Gly→Ser), 313 (Ser→Pro), 331 (Gly→Gln), 338 (Leu→Pro), 352 (His→Asn) i 358 (His→Pro) kod svih, i 250 (Asp→Asn) i 309 (Ser→Asn) kod 14/15. Od pomenutih, supstitucije ak na 313, 352 i 358, već su poznate karakteristike SK varijante (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch i Raab-Traub, 1999). Jedinstvena supstitucija bila je na poziciji 250, dok su one na 313, 331 i 338 postojale samo kod SK i Srb 2 varijante. Svi Med izolati imali su samo jednu dodatnu promenu (Ser→Asn) na poziciji 309. Sve navedene izmene najverovatnije su nastale nezavisno tokom evolucije pojedinih varijanti (Sandvej, Peh, i sar., 1994). Ovo istraživanje pokazuje da se mutacije sa kontinuiranim i jedinstvenim pojavljivanjem u određenim varijantama mogu, u budućnosti, upotrebiti kao nova mesta za definisanje poznatih varijanti.

Kod Srb 1 izolata pronađeno je 6 mutacija od kojih su 4 dovodile do izmena van karakterističnih 7 lokusa. Ala na 312 i Pro na 334 bile su izmene aminokiselina zbog kojih se ovaj izolat nije svrstao u poznate varijante. Takođe, na lokusu 212 nije bilo izmene Gly, iako su sve ostale varijante, u većini slučajeva, na tom mestu pokazivale supstituciju. Ipak, kako je u pitanju samo jedan izolat, teško je utvrditi koje su mutacije kritične za njegovo definisanje. Ispitivanjem nukleotidne udaljenosti Srb 1 izolata, pokazano je da je ona najveća u odnosu na SK izolate (6,8%), dok je najmanja bila u odnosu na izolate varijante Kina 1 (3,6%).

Sa druge strane, Srb 2 izolati imali su mnogo više mutacija, ukupno 27. Aminokiseline karakterističnih lokusa pokazale su delimičnu pripadnost SK, odnosno Med varijanti. Među preostalim mutacijama, 4 su bile prisutne kod oba izolata, ali nijedna nije bila jedinstvena samo za Srb 2 izolate. Stoga se može pretpostaviti, da je Srb 2 varijanta nastala rekombinacijom između SK i Med varijante. Filogenetskom analizom, pokazano je da je nukleotidna udaljenost između dva predstavnika ove varijante visoka (6,3%), ali ne postoje opisani kriterijumi za maksimalnu vrednost koja može postojati u okviru jedne LMP-1 varijante. Sa druge strane, nukleotidna udaljenost bila je visoka i u odnosu na izolate drugih varijanti, čak najviša u odnosu na SK (4,6-6,8%).

Nove LMP-1 varijante sporadično se otkrivaju, pa su do sada opisane: SEA 1 i 2 (engl. South East Asia). Kina 4, V2, OC (engl. out of classification) i K (Kenya) (Saechan, i sar., 2006), (Li, i sar., 2009), (Nguyen-Van, i sar., 2008), (Senyuta, i sar., 2014), (Wohlford, i sar., 2013). Nažalost, za neke od novoopisanih varijanti ne postoje podaci zašto se one nisu klasifikovale u uobičajene kategorije. Ipak, analizom mutacija onih izolata kojima je pristup bio omogućen, utvrđeno je da sekvence Srb 1 i Srb 2 izolata, sa novim varijantama drugih autora nemaju sličnosti.

Ispitivanjem povezanosti karakteristika sekvenci C-terminalnog regiona LMP-1 gena, pokazano je da se broj 33-bp ponovaka ($\leq 4,5$ ili $>4,5$) značajno razlikuje kada su u pitanju identifikovane varijante, ali i prisustvo delecije, kao i sam tip delecije. Naime, osim očekivane jedinstvenosti B95-8 izolata sa $\leq 4,5$ ponovka, bez izuzetka su bili i svi Med izolati sa 5-6 ponovaka. Prema podacima drugih studija, apsolutna povezanost Med varijante i velikog broja ponovaka nije dokazana, ali su Med izolati imali i preko 80% onih sa velikim brojem ponovaka (Senyuta, i sar., 2014). Analiza prema oboljenjima, pokazala je da je jedino u grupi pacijenata sa transplantacijom svaka varijanta imala uniforman broj ponovaka. U odnosu na prisustvo delecije, zapaženo je da je 79% izolata bez delecije u isto vreme imalo $\leq 4,5$ ponovka. Sa druge strane, većina izolata sa delecijom imala je $>4,5$ ponovka. Ovakav rezultat ne predstavlja

geografsku osobenost, jer su slični podaci objavljeni za IM i HL izolate u Argentini i Brazilu (Lorenzetti, Gantuz, i sar., 2012), (Guiretti, i sar., 2007). Interesantno je da što je izolat imao manju deleciju, veća je bila verovatnoća da ima i manji broj 33-bp ponovaka. Naime, $\leq 4,5$ ponovka imalo je 100% izolata sa 27-bp del, 55% sa 30-bp del, 12% sa 69-bp del i 0% sa 147-bp del. Kako je naše istraživanje jedinstveno prema različitosti pronađenih delecija, važno bi bilo u budućnosti ispitati mehanizme koji dovode do raspodele broja 33-bp ponovaka srazmerno veličini delecije. U osnovi su svakako intenzivne rekombinacije za vreme litičke replikacije, pa čak i klonalna ekspanzija u EBV maligno inficiranoj ćeliji (Raab-Traub i Flynn, 1986), (Miller, i sar., 1994).

C-terminalni region EBNA-1 gena takođe pokazuje varijabilnost. Od vremena kada su prvi put opisane mutacije ovog regiona, u mnogim studijama ispitivane su sekvence izolata različitih oboljenja povezanih sa EBV infekcijom. Uporedo postaje aktuelna i hipoteza o tzv. geografskom polimorfizmu, pa čak i o tropizmu samih EBNA-1 subtipova. Nepoznanica je kakav uticaj varijabilnost EBNA-1 gena ima na funkcionalnost samog proteina imajući u vidu da su domeni C-terminalnog regiona odgovorni za vezivanje (ak 459-487) i dimerizaciju DNK, (ak 501-532) kao i za transaktivacione procese (ak 450-641) (Wang, Chien, i sar., 2002), (Chen, i sar., 2012). Kontroverze i dalje postoje, a definitivnih zaključaka još uvek nema (Lorenzetti, Altcheh, i sar., 2010). Prva potencijalna veza sa tumorima opisana je kod izolata BL pacijenata Amerike i Afrike, u kojima je dominirao subtip V-leu. Ovaj subtip nije pronađen kod zdrave populacije (Bhatia, i sar., 1996). Istu vezu podržao je i rezultat objavljen godinu dana kasnije, gde se P-ala i P-thr subtipovi javljaju isključivo kod zdrave populacije Evrope i Severne Amerike (Gutierrez, i sar., 1997). Istovremeno, pojavljuje se ideja da V-val subtip ima tropizam vezan samo za oralnu regiju (Gutierrez, i sar., 1997). Ideja o tropizmu ubrzo je odbačena (Sandvej, Zhou i Hamilton-Dutoit, 2000). Upravo u našoj studiji jedini izolat sa V-val subtipom pronađen je u krvi pacijenta sa transplantiranim bubregom. Sa druge strane, pokazana je i geografski specifična distribucija, poređenjem izolata gastričnog karcinoma i EBV

reaktivne folikularne hiperplazije pacijenata dva različita kontinenta. U Japanu je među ovim oboljenjima identifikovan V-val subtip, dok su u Severnoj Americi to bili P-ala, P-thr i V-leu subtipovi (Chen, i sar., 1998). Tzv. geografski polimorfizam podržavaju i kasnija istraživanja (Habeshaw, i sar., 1999), (MacKenzie, i sar., 1999), (Fassone, i sar., 2000), (Wang, Liu, i sar., 2010).

Na osnovu literaturnih podataka, pre svega onih koji su sumirani od strane Chang-a i saradnika, V-val je dominantni subtip u Kini, odnosno Aziji (Chang, i sar., 2009). U isto vreme on je jedini subtip koji se identifikuje među NFK i HL. U ovom regionu dokazani su i P-ala i P-thr subtipovi. Sa druge strane, istraživanja iz Afrike pokazuju ravnomernu distribuciju subtipova između zdravih nosilaca virusa i pacijenata sa nemaligim oboljenjima sa jedne strane, i pacijenata sa Burkittovim limfomom sa druge strane. Tako je dominantan V-leu i P-thr, a retko se pojavljuju i P-ala i V-pro. U Južnoj Americi takođe se nezavisno od oboljenja najčešće javlja V-leu. Za njim slede P-thr i P-ala subtipovi. Prema severnoameričkim rezultatima, među limfomima dominantan subtip je P-thr, dok je kod zdravih, odnosno onih sa nemaligim oboljenjima, najčešće dokazivan P-ala. V-leu se takođe može dokazati, ali samo kod limfoma. Prema našim saznanjima, podaci za NFK sa ovog kontinenta ne postoje. Konačno, najčešće identifikovan EBNA-1 subtip u Evropi, kao i u Americi je P-thr. Za njim sledi P-ala, V-leu i vrlo retko V-val (samo kod limfoma udruženih sa AIDS-om). Jedino je u grupi pacijenata sa Hodgkin limfomom dominacija na strani subtipa P-ala.

EBNA-1 izolati naše studije klasifikovali su se na očekivan način, u odnosu na prethodno opisanu evropsku distribuciju (Chang, i sar., 2009). Identifikovani su P-thr, kao najčešći, zatim P-ala, V-val i V-ala subtipovi. Kao ni u prethodnim evropskim, američkim i azijskim studijama, nije identifikovan V-pro. Ipak, u srpskim izolatima nije dokazan ni V-leu. Ovaj subtip nije izolovan ni iz jednog izolata Severne Evrope, dok je na ostatku kontinenta dokazan sa vrlo niskom učestalošću od 2,5-8,2% među zdravim

pacijentima, i obolelim od limfoma i nemalighnih bolesti (Sandvej, Zhou i Hamilton-Dutoit, 2000), (Chang, i sar., 2009), (MacKenzie, i sar., 1999).

Statistička analiza utvrdila je da se učestalost EBNA-1 subtipova nije značajno razlikovala između 3 grupe pacijenata ove studije. Interesantno je da je najčešći subtip P-thr u svakoj od grupa bio podjednako zastupljen, sa približno 60%. Ni procenat P-ala među grupama nije značajno varirao (oko 35%). Iako su malobrojne studije koje opisuju EBNA-1 varijabilnost u Evropi, dominacija P-thr subtipa nezavisna od bolesti dokazana je i među danskim izolatima (Sandvej, Zhou i Hamilton-Dutoit, 2000). Međutim, postoji razlika u zastupljenosti P-thr. Naime, u drugim evropskim izolatima, pre svega iz nazofaringealnog karcinoma, ovaj subtip pronalazi se mnogo više nego kod nas, 72-80% (Chang, i sar., 2009). Istovremeno, dvostruko je veća učestalost subtipa P-ala kod srpskih izolata, u odnosu na ostatak Evrope u kojima se P-ala pronalazi kod <20% izolata.

Među izolatima najčešćeg subtipa ove studije, P-thr, 37 izolata (67%) sadržalo je sve subtip specifične mutacije. Ipak, 17 izolata koji su se u filogenetskom stablu grupisali sa P-thr subtipom, pokazivalo je dodatne mutacije ili su im neke od specifičnih mutacija nedostajale. Prema literaturnim podacima, vrlo je često odstupanje od apsolutnog poklapanja EBNA-1 sekvenci i opisanih subtip karakterističnih mutacija. Zbog toga se u istraživanjima opisuju brojne subvarijante. Na osnovu osobina sekvenci, naših 17 P-thr izolata dalje je klasifikovano u 6 subvarijanti (sv-1 do sv-6). Tako su P-thr-sv-1 i P-thr-sv-3 već opisane kod izolata NFK, limfoma i mononukleoze u nekoliko studija van Evrope (Lorenzetti, Altcheh, i sar., 2010), (Fassone, i sar., 2000), (Bhatia, i sar., 1996). Prema našim saznanjima, ove subvarijante nisu opisane kod evropskih izolata. Sa druge strane, subvarijante P-thr-sv-2, P-thr-sv-4, P-thr-sv-5 i P-thr-sv-6 prvi put su identifikovane u ovoj studiji. Pokazivale su 3-8 substitucija aminokiselina u odnosu na prototipnu sekvencu B95-8. Jedine dve zajedničke mutacije za sve subvarijante P-thr u našim izolatima dovode do substitucija na pozicijama 487 (Thr, kodon ACT) i 499 (Asp, kodon GAT). Statistički

je dokazana razlika u distribuciji subvarijanti P-thr prema oboljenjima ($p < 0,001$), i to UCNT u odnosu na IM ili T. Dok su sve "nove" subvarijante P-thr imale po jednog predstavnika među izolatima pacijenata sa transplantacijom ili nazofaringealnim karcinomom, P-thr-sv-5 identifikovan je kod čak 12 izolata ove studije. Interesantno je da je svih 12 bilo od pacijenata sa nazofaringealnim karcinomom. Prema literaturnim podacima, broj izolata iste bolesti kod kojih je utvrđena nova EBNA-1 subvarijanta najveći je u našoj studiji. Zbog toga se može pretpostaviti da postoji specifičnost P-thr-sv-5 za UCNT. Nažalost, do sada nema dokaza o funkcionalnoj povezanosti subtipova, odnosno subvarijanti sa određenim oboljenjima, iako sumnje u vezi sa tim postoje. Naročito je važna teorija o uzajamnom uticaju varijabilnosti EBV gena, faktorima sredine, ali i genetskoj predispoziciji domaćina (Chen, i sar., 2012).

P-ala predstavlja subtip prototipne sekvence B95-8. U ovoj studiji bio je drugi izolovani subtip po učestalosti sa 36,7%. Ipak, nijedan izolat nije pokazao apsolutno poklapanje sa prototipnom sekvencom, jer su postojale razlike u ak na pozicijama 499 i 524. Prema tome da li su P-ala izolati imali aminokiseline Ile (kodon: ATT) ili Val (kodon: GTT) na poziciji 524, oni su podeljeni na dve subvarijante: P-ala-sv-1 i P-ala-sv-2, gde je 94% izolata pripadalo P-ala-sv-2. Ove subvarijante takođe su opisane kao P-ala-v1 i P-ala-v2 od strane Sandveja i saradnika kod danskih izolata NFK-a, limfoma i zdrave populacije (Sandvej, Zhou i Hamilton-Dutoit, 2000). U istoj studiji, opovrgnuta je ranija teorija prema kojoj se P-ala nije mogao pronaći u tumorima, i to kod 18% NFK izolata. Među srpskim izolatima procenat je bio mnogo veći, čak 40%. Kako je ovaj procenat isti onom koji se za P-ala opisuje kod nekih drugih EBV bolesti, pa i zdravih nosilaca, nesumnjivo je da je u pitanju isključivo geografski polimorfizam karakterističan za Evropu (Chang, i sar., 2009).

V-val subtip identifikovan je samo kod jednog izolata sa transplantacijom. Ipak, na 4 pozicije aminokiselina razlikovao se od karakteristične sekvence V-val subtipa. Zato je imenovan kao V-val-sv-1. Na osnovu literaturnih podataka, ovo je novootkrivena subvarijanta sa Val (GTT) na poziciji 483, kao potpuno novom

izmenom ak u okviru C-terminalnog regiona EBNA-1 gena. Bez obzira na činjenicu da je V-val dominirajući subtip u Aziji, jedini dokaz ovog subtipa u Evropi bio je kod 2% limfoma povezanih sa AIDS-om (Chang, i sar., 2009). I pored malog broja izolata, na osnovu naše i pomenute evropske studije, uočava se povezanost. Naime, izolati V-val subtipa isključivo pripadaju imunosuprimiranoj populaciji, pa se nameće pitanje da li specifičnost imunskog statusa omogućava preživljavanje virusa sa "V-val strukturom" EBNA-1 gena.

Subtip V-ala, identifikovan kod dva pacijenta naše studije, vrlo se retko izoluje, i to isključivo na teritoriji Južne Amerike. Prvi put opisan je kod 6% izolata Hodgkin limfoma u Brazilu, a kasnije se opisuje kod 15% pedijatrijskih pacijenata sa IM ili limfomima u Argentini (MacKenzie, i sar., 1999), (Lorenzetti, Altchek, i sar., 2010). Uporednom analizom južnoameričkih V-ala sekvenci, ustanovljeno je apsolutno poklapanje naše dve V-ala sekvence sa samo jednom, sekvencom imenovanom kao subvarijanta V-ala-iii, pronađenom kod argentinskog pacijenta sa HL (Lorenzetti, Altchek, i sar., 2010). Bez obzira na nedostatak podatka o boravku pacijenata naše studije na južnoameričkom kontinentu, malo je verovatno ovakvo objašnjenje porekla njihove virusne infekcije. U prilog tome ide podatak da je ova subvarijanta izolovana kod 1 pacijenta sa transplantacijom, ali i jednog UCNT pacijenta, dok je u argentinskoj studiji ona opisana kod samo jednog pacijenta. Na osnovu svega navedenog, ostaje dilema u vezi sa geografskom specifičnošću subvarijanti V-ala subtipa.

Filogenetskom analizom nukleotidnih udaljenosti EBNA-1 gena među izolatima ove studije, dobijena je srednja vrednost od 1,4%, što je dvostruko manje od one vrednosti koja je dobijena za LMP-1 izolate (3,5%). Unutar subtipova najveću udaljenost imali su izolati P-thr subtipa (0,5%), što je demonstrirano klasifikacijom dobijenih izolata u dodatnih 6 subvarijanti. Između njih, najudaljenije bile su P-thr-sv-1 i P-thr-sv-4 (1,9%). Subvarijanta V-val-sv-1 se prema podacima nukleotidne udaljenosti najviše razlikovala u odnosu na sve preostale subvarijante (do 3,9%).

Sa stanovništva veličine i česte varijabilnosti EBV genoma, istraživanja bazirana na ispitivanju mutacija u okviru jednog gena nisu dovoljna za definisanje spektra raznolikosti koje ovaj genom može da pokaže. Brojne bolesti sa kojima se EBV infekcija dovodi u vezu, kao i različiti mehanizmi ostvarivanja latencije, dodatno otežavaju pokušaje da se patogenetski procesi povežu sa specifičnom genetičkom varijabilnošću. Zato se pretpostavlja, da bi kombinacija varijabilnosti više regiona mogla da ima veći značaj u definisanju određenih karakteristika oboljenja (Ai, i sar., 2012). Među retkim istraživanjima koji se bave definisanjem kombinacije varijabilnosti EBNA-2, LMP-1 i EBNA-1 gena, odnosno definisanjem tzv. EBV polimorfizama, je kineska studija Ai i saradnika (Ai, i sar., 2012). Do sada nije urađena analogna studija na evropskom kontinentu. Dakle, kineski IM, HL i HLH (hemofagocitna limfocitocitoza) izolati pokazuju dominaciju genotip 1/Kina 1/V-val polimorfizma (92%), što je u skladu sa pojedinačnim opisom učestalosti genotipova, varijanti, odnosno subtipova na ovom kontinentu (Ai, i sar., 2012). Najčešći polimorfizam između pomenuta tri gena u našem istraživanju je genotip 1/B95-8/P-thr (22,5%). Međutim, za razliku od rezultata iz Azije i Argentine, kod kojih nije pronađena veza između polimorfizama i oboljenja, ona je u našoj studiji dokazana (Ai, i sar., 2012), (Lorenzetti, Gantuz, i sar., 2011). Naime, bez obzira na raznolikost ovog polimorfizma koja je dobijena u ispitivanju, pokazano je da se izolati nazofaringealnog karcinoma značajno razlikuju od izolata pacijenata sa benignim oboljenjima. Tako, među NFK izolatima dominira genotip 1/Med/P-thr polimorfizam, dok je on kod infektivne mononukleoze i transplantacija pronađen kod samo 4,5% izolata. Sa druge strane, najučestaliji polimorfizam u grupi IM, genotip 1/Kina 1/P-thr, nije postojao u grupi NFK. Dokazana razlika u distribuciji polimorfizama kod oboljenja benignog i malignog porekla u ovoj studiji, veoma je značajan podatak. On ide u prilog hipotezi o udruženosti promena u sekvenci najvarijabilnijih EBV gena, kada je reč o posledicama koje one mogu da izazovu u specifičnom patogenetskom procesu.

Istraživanjem su takođe obuhvaćena i međusobna poređenja varijabilnosti sekvenci svakog para između tri ispitivana. Prvo je analizirana povezanost EBNA-2

genotipa i LMP-1 varijanti, i ona, kao ni u studiji Lorenzetti-ja i saradnika, nije dokazana (Lorenzetti, Gantuz, i sar., 2011). Sa druge strane, u vidu tzv. polimorfizma 2 (EBNA-2 genotip/LMP-1 varijanta) pokazano je da postoji značajna razlika u distribuciji između karcinoma i ostalih oboljenja. Tako je u grupi NFK najčeća kombinacija bila genotip 1/Med (29,6%), dok je u grupama IM i T to bila kombinacija genotip 1/Kina 1 (48,4%). Zapravo, kombinacija genotip 1/Kina 1 kod karcinoma uopšte nije dokazana. Poredeći genotip sa prisustvom delecije, kao najvažnijom kategorijom LMP-1 varijabilnosti, nismo utvrdili povezanost. Upravo ovakav rezultat imali su i Tiwawech i saradnici među NFK izolatima sa Tajlanda (Tiwawech, i sar., 2008). Međutim, dokazi o povezanosti genotipa i prisustva LMP-1 delecije u nekoliko studija potpuno se razlikuju. Dok je kod tajvanskih i kineskih izolata genotip 2 uvek udružen sa odsustvom 30-bp delecije, kod argentinskih je udružen sa prisustvom 30-bp delecije (Lin, i sar., 2004), (Lorenzetti, Gantuz, i sar., 2011). I konačno, u skladu sa objavljenim podacima o nepostojanju statističke povezanosti genotipa sa brojem 33-bp LMP-1 ponovaka, ni u ovoj studiji veza nije dokazana (Lorenzetti, Gantuz, i sar., 2011), (Lin, i sar., 2004). Ipak, za razliku od naših rezultata, zapaženo da je genotip 2 u većini argentinskih i kineskih izolata udružen sa većim brojem 33-bp ponovaka (Lin, i sar., 2004), (Lorenzetti, Gantuz, i sar., 2011).

Naša studija po prvi put pokazuje statističku povezanost LMP-1 varijanti sa EBNA-1 subtipovima, kao i prisustva LMP-1 delecija sa EBNA-1 subtipovima. Pre svega, varijante Kina 1, Severna Karolina i Srb 1 u većini slučajeva bile su povezane sa određenim EBNA-1 subtipom: Kina 1 sa P-thr (83%), SK sa P-ala (87%), dok je jedan Srb 1 izolat bio udružen sa P-thr. Novootkrivena LMP-1 varijanta Srb 2 nije pokazivala uniformnost EBNA-1 subtipova. Takođe, među našim izolatima V-ala subtip uvek je bio prisutan sa LMP-1 bez delecije, 81% izolata P-ala je bilo bez LMP-1 delecije, dok je jedini V-val imao LMP-1 deleciju. Interesantno je, međutim, da udruženost LMP-1 varijanti, odnosno prisustva LMP-1 delecije sa EBNA-1 subtipovima, ispitivana u okviru tzv. polimorfizama 4 (LMP-1 varijanta/EBNA-1 subtip) i 7 (prisustvo ili odsustvo LMP-1 delecije/EBNA-1 subtip), nije dokazala korelaciju sa određenim

oboljenjima. Ali, kada su grupe posmatrane pojedinačno, utvrđeno je da su sa specifičnim karakteristikama oboljenja udruženi i specifični polimorfizmi, što je statistički potvrđeno. Kod pacijenata sa infektivnom mononukleozom, polimorfizmi 7: "sa del/P-thr" i "bez del/P-ala" bili su prisutni samo u slučajevim povišenih vrednosti AST. Uz povišene vrednosti ALT, dokazan je samo polimorfizam "bez del/P-ala". Takođe, uz povišene vrednosti ALT udružene su i dve kombinacije polimorfizma 9 (EBNA-2 genotip/ $\leq 4,5$ ili $> 4,5$ 33-bp LMP-1 pon): genotip 1/ $\leq 4,5$ 33-bp pon i genotip 2/ $\leq 4,5$ 33-bp pon. U grupi pacijenata sa NFK, u okviru polimorfizma 7, izolati "sa del/P-thr" činili su 71% izolata pacijenata kod kojih je bilo prisutno metastaziranje, odnosno N3 gradus. Za sve ostale kombinacije polimorfizma 7, učestalost metastaziranja bila je ispod 8%. Posmatrano kroz tzv. polimorfizam 4, neke od najbrojnijih kombinacija: B95-8/P-thr, B95-8/P-ala, Med/P-ala i SK/P-ala nikada nisu udružene sa udaljenim metastaziranjem. Različitu distribuciju među TNM gradusima, pokazao je i polimorfizam 2 (EBNA-2 genotip/LMP-1 varijanta). Ustanovljeno je da kombinacije u kojima se nalaze bilo koji od dva EBNA-2 genotipa i neka od dve LMP-1 varijante: B95-8 i SK, ne metastaziraju. Očigledno je da delecija LMP-1 gena ima ključnu mesto i u polimorfizmu 4 i u polimorfizmu 7, te da su povezanosti sa prisustvom, tj. odsustvom gradusa N3 identične. Iz navedenog proizilazi da postoji međusobna veza genetičkih struktura LMP-1, pre svega delecije, i EBNA-1 gena odgovorna za preživljavanje i funkcionisanje njihovih proteina, da udruženo delovanje LMP-1 i EBNA-1 ne uslovljava nastanak određenog oboljenja, ali da reguliše patogenetski proces.

Nije pokazana korelacija između EBNA-2 genotipova i EBNA-1 subtipova kako u našoj, tako ni u studijama drugih autora (MacKenzie, i sar., 1999), (Bhatia, i sar., 1996), (Habeshaw, i sar., 1999), (Lorenzetti, Altchek, i sar., 2010). Međutim, na nivou EBNA-1 subvarijanti postoje opisane udruženosti, i to između genotipa 2 i P-thr-v u Severnoj Kini, zatim genotipa 2 i V-leu subvarijanti u Africi i genotipa 2 sa P-ala subvarijantama u Evropi (Wang, Liu, i sar., 2010), (Habeshaw, i sar., 1999). Od 5

genotip 2 izolata naše studije, 4 je pripadalo subtipu P-ala, ali su samo tri pripadala istoj P-ala-sv-2 subvarijantama.

Samo je u grupi pacijenata sa transplantiranim organom pokazana korelacija između EBV polimorfizama i pola. Tako je statističkom analizom povezanost sa polom pacijenta utvrđena kod polimorfizama 1, 2, 4 i 5. Zbirno, ustanovljeno je da se LMP-1 izolati sa delecijom javljaju samo kod žena. Zbog toga se kod izolata ovog pola javljala samo varijanta Kina-1. Dodatno, P-ala subtip EBNA-1 gena nikada nije dokazan kod osoba ženskog pola. Sa druge strane, LMP-1 izolati bez delecije bili su prisutni samo kod muškaraca. U isto vreme varijanta B95-8 mogla se takođe naći samo kod osoba muškog pola. Na osnovu literaturnih podataka, nisu nam poznati rezultati povezanosti EBV varijabilnosti i pola. Ipak, postoje rezultati koji sugerišu na postojanje razlika između polova u patogenezi određenih oboljenja povezanih sa EBV infekcijom (Jia i Qin, 2012). Podatak o korelaciji delecija sa polom svakako bi trebalo da se ispita daljim istraživanjima. Ni kod nas, kao ni u ranijim studijama ova korelacija nije dokazana kod drugih oboljenja, pre svega NFK (See, i sar., 2008). Ali kako je ovde u pitanju grupa imunosuprimiranih pacijenata, postoji mogućnost da imunomodulacija zavisna od pola, učestvuje u selekciji izolata sa/bez delecije.

Multifaktorska priroda inicijacije maligne transformacije specifična za nazofaringealni karcinom, interesantna je za brojna istraživanja. Dokazane su genetske predispozicije domaćina na lokusima hromozoma 4p, 5p13 i 3p21, kao i promene na genima HLA klase I, RAD51L1 genu za popravku DNK, MDM2 i TP53 genima za regulaciju ćelijskog ciklusa, i MMP2 genu za ćelijsku adheziju i migraciju (Busson, i sar., 2004), (Hildesheim i Wang, 2012). Razlike u stilu života i navikama u ishrani, a naročito u sprezi sa faktorima sredine, takođe mogu povećati rizik od nastanka ovog karcinoma. Tako se pušenje navodi kao jedan od najznačajnijih faktora rizika za NFK (Xu, i sar., 2012). Pušenjem cigareta produkuje se nekoliko reaktivnih jedinjenja koja mogu da oštete DNK molekul ćelije: policiklični aromatični ugljovodonici, aromatični amini i N-nitrozamini (Hecht, 2002), (Takahashi, i sar.,

2010). Ipak, pušenje kod NFK ima naročito značajnu ulogu, i to u mogućem okidanju reaktivacije Epstein-Barr virusne infekcije, povećanjem ekspresije transkripcionih faktora Zta i Rta, kao i transkripcije BFRF3 (kodira kapsidni protein p18) i gp350 (Xu, i sar., 2012). Ovakva teorija podstaknuta je i rezultatima značajno viših vrednosti anti-EBV antitela kod dugoročnih pušača u odnosu na nepušače i kratkoročne pušače (Hsu, i sar., 2009). Među izolatima pacijenata iz Srbije, pušači su činili 66,3% obolelih, što u potpunosti korelira sa prethodno objavljenim podacima u svetu (Anghel, i sar., 2012). U prethodnoj epidemiološkoj studiji iz Srbije navodi se čak da je NFK povezan sa "pasivnim" pušenjem dece roditelja pušača (Nesic, i sar., 2010). U istoj studiji, kao faktor rizika za našu populaciju spominje se i konzumacija industrijske hrane sa aditivima i belog hleba.

Analizom ostalih dostupnih anamnestičkih podataka pacijenata sa nazofaringealnim karcinomom, ustanovljeno je da starosna incidencija NFK, u našoj zemlji korelira sa podacima iz endemskih regiona i zemalja u okruženju (pik je između 50-59 godina), za razliku od SAD i drugih zapadnih zemalja čiji se pik incidencije nalazi u grupi starijoj za 5-10 godina (Jia i Qin, 2012), (Anghel, i sar., 2012), (Chang i Adami, 2006). Većinu pacijenata ove studije činili su muškarci (73%), što je u skladu sa ostatkom svetskih epidemioloških podataka vezanih za NFK (Jia i Qin, 2012), (Anghel, i sar., 2012). Razlika u distribuciji ove bolesti među polovima, objašnjava se drugačijim stilom života, što uključuje pušenje, ali i biološkim razlikama između muškaraca i žena (Jia i Qin, 2012). Tako, ova studija ne pokazuje povezanost između pola i pušenja, ali pokazuje da stadijumi karcinoma, prema TNM klasifikaciji, nisu bili podjednako distribuirani među polovima. Stadijum IVB, koji podrazumeva metastaziranje u udaljene (>6cm) limfne noduse i/ili supraklavikularne jame bio prisutan samo kod muškaraca, dok je samo kod žena postojao najniži gradus tumora. Ovo se može objasniti pretpostavkom da su žene savesniji pacijenti, te da su se lekaru javljale pri prvim simptomima i znacima bolesti. Sa druge strane, tzv. udaljeno metastaziranje samo kod muškog pola, može biti posledica različite patogeneze među polovima.

Ni sa jednim od navedenih anamnestičkih kriterijuma, Epstein-Barr virus nije mogao biti povezan, te stoga nije utvrđen par udruženih faktora rizika. Iako distribucija EBV DNK pozitivnih bioptata i regiona odakle su dolazili pacijenti nije statistički različita, pokazano je da postoje izvesne regionalne razlike EBV pozitivnih UCNT u Srbiji. Najmanje učestali nalazi EBV DNK u Beogradu, ali i Jugoistočnoj Srbiji (24-28%) navode na pretpostavku o dominantnosti geografski karakterističnih faktora rizika, pre svega industrije i smoga (Thompson i Grafstrom, 2009), (Hildesheim, Dosemeci, i sar., 2001). Zajedno sa EBV reaktivacijom, ovi kancerogeni mogu dramatično menjati stabilnost genoma (Fang, i sar., 2012). Nažalost, podaci o profesiji UCNT pacijenata nisu bili dostupni.

Sa druge strane, ovo istraživanje pokazuje brojne povezanosti ishoda i kliničkog stadijuma karcinoma sa različitim genetičkim karakteristikama 3 EBV gena. Pored prethodno navedenih prediktora najlošijih TNM gradusa, među polimorfizmima su dokazani i mogući prediktori ishoda bolesti. Tako je, kod tzv. polimorfizma 8 (EBNA-2 genotip/broj LMP-1 ponovaka od 33-bp/EBNA-1 subtip) ustanovljeno da su prediktori progresije 2 kombinacije: genotip 1/≤4,5 33-bp pon/P-ala i genotip 1/>4,5 33-bp pon/P-thr. Na taj način, pokazano je da veza u varijabilnosti sva tri gena utiče i na sam tok oboljenja. Zato bi buduće velike studije praćenja toka nazofaringealnog karcinoma, a naročito UCNT, mogle da definišu "EBV polimorfizam većeg, odnosno manjeg" rizika po progresiju NFK.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata ovog istraživanja, izvedeni su sledeći zaključci koji se odnose na:

1. Povezanost prisustva EBV DNK i karakteristika oboljenja:

- ∴ Među pacijentima sa infektivnom mononukleozom, prisustvo EBV DNK u krvi korelira sa težinom kliničke slike;
- ∴ Učestalost EBV DNK pozitivnih biopsija opada sa rastom TNM gradusa pacijenata sa UCNT. Kod neidentifikovanih primarnih tumora (Tx) virusna nukleinska kiselina nije prisutna.

2. EBNA-2 genotipizacija:

- ∴ U Srbiji dominira genotip 1 (90%), što je u korelaciji sa geografskom distribucijom;
- ∴ Povezanost genotipa sa oboljenjem nije utvrđena. Ipak, grupa pacijenata nakon transplantacije ima značajno veću učestalost genotipa 2 (38%) u odnosu na ostale grupe (ispod 7%).

3. Varijabilnost LMP-1 gena:

- ∴ Dokazano je prisustvo 4 od sedam poznatih LMP-1 varijanti: B95-8, Kina 1, NC i Med, sa dominacijom varijante B95-8 (31%);
- ∴ Identifikovane su i 2, do sada nepoznate varijante, Srb 1 i Srb 2. Srb 2 varijanta najverovatnije je nastala rekombinacijom između SK i Med varijante;
- ∴ Distribucija LMP-1 varijanti među oboljenjima statistički se značajno razlikuje: kod IM pacijenata dominira Kina 1 (36%); kod pacijenata nakon transplantacije B95-8 (35%); kod pacijenata sa UCNT Med (34%);
- ∴ Prvi put su identifikovane varijante SK i Kina 1 u tkivu NFK;
- ∴ LMP-1 delecije su otkrivene kod 39% izolata, i to: dve poznate delecije od 30-bp i 69-bp, i dve novoidentifikovane delecije od 27-bp i 147-bp. Najučestalija i prisutna u svakoj grupi obolelih je 30-bp del (63%);

- ∴ Prisustvo delecije nije povezano sa određenim oboljenjem, iako je među izolatima pacijenata sa transplaniranim organom zabeležena najveća učestalost delecija (53%). Kod UCNT izolata učestalost delecija je bila najmanja (29%), ali je dokazano da je najlošiji TNM gradus (N3) povezan sa prisustvom delecije (71%). Učestalost delecije u ostalim TNM gradusima je samo 18%;
- ∴ Broj ponovaka od 33-bp među izolatima varira od 2 do 6. Pokazana je statistički značajna korelacija između broja ponovaka IM izolata i vrednosti ALT, pa tako pacijenti sa normalnim vrednostima ALT uvek imaju više od 4,5 33-bp pon. Sa druge strane, ≤4,5 33-bp ponovaka bilo je povezano sa IM pacijentima koji su lečeni ambulantno;
- ∴ “Geografski specifične” aminokiseline LMP-1 izolata iz Srbije su: a) Gly na poziciji 212 i Glu na poziciji 317 povezane su sa 69-bp delecijom; b) Ser na poziciji 366 specifičan je za nazofaringealne izolate; c) Gln na poziciji 328 je karakteristika varijante B95-8;
- ∴ Neke LMP-1 varijante imale su i dodatne jedinstvene izmene aminokiselina, koje se mogu upotrebiti kao nova mesta za definisanje poznatih varijanti: Ser na poziciji 309 kod B95-8 izolata, Asn na poziciji 322 kod Kine 1, i Asn na poziciji 250 kod Severne Karoline;
- ∴ Veličina delecije u pozitivnoj je korelaciji sa brojem 33-bp ponovaka: ≤4,5 ponovka imalo je 100% izolata sa 27-bp del, a nijedan sa 147-bp del.

4. Varijabilnost EBNA-1 gena:

- ∴ Identifikovana su 4 EBNA-1 subtipa: P-thr, kao najčešći, zatim P-ala, V-val i V-ala. Distribucija subtipova ne razlikuje se među oboljenjima;
- ∴ Najčešći subtip P-thr (32%), dalje je klasifikovan u 6 subvarijanti (sv-1 do sv-6) pri čemu su P-thr-sv-2, P-thr-sv-4, P-thr-sv-5 i P-thr-sv-6 novoidentifikovane subvarijante. Različita distribucija subvarijanti P-thr

prema oboljenjima statistički je visoko značajna ($p < 0,001$), pa je P-thr-sv-5 dokazan kao specifičan samo za UCNT izolate;

- ∴ P-ala subvarijanta kod 40% izolata, dokazuje evropski specifičan polimorfizam. Identifikovane su P-ala poznate subvarijante: P-ala-sv-1 i P-ala-sv-2, a 94% izolata pripadalo je P-ala-sv-2;
- ∴ Novootkrivena mutacija u tripletu GTT, koji kodira Val na poziciji 483, karakteristika je novootkrivene subvarijante V-val-sv-1.

5. EBV polimorfizmi:

- ∴ Genotip 1/B95-8/P-thr je najčešći polimorfizam, karakterističan za 22,5% izolata;
- ∴ Genotip 1/Med/P-thr polimorfizam povezan je sa NFK, a genotip 1/Kina 1/P-thr sa IM;
- ∴ LMP-1 varijante Kina 1, Severna Karolina i Srb 1 u većini slučajeva povezane su sa određenim EBNA-1 subtipom: Kina 1 sa P-thr (83%), SK sa P-ala (87%), dok je jedan Srb 1 izolat bio udružen sa P-thr. Takođe, izolati V-ala subtipa, kao i 81% izolata P-ala subtipa bilo je udruženo sa LMP-1 bez delecije, dok je jedini V-val imao LMP-1 deleciju;
- ∴ Povišene vrednosti AST kod izolata pacijenata sa IM povezane su sa polimorfizmima: "sa LMP-1 del/P-thr" i "bez LMP-1 del/P-ala". Izolati pacijenata sa povišenim vrednostima ALT imaju samo polimorfizam "bez LMP-1 del/P-ala";
- ∴ Polimorfizmi NFK izolata sa LMP-1 delecijom bili su povezani sa najlošijim TNM gradusom. Tako su izolati "sa del/P-thr" činili 71% izolata pacijenata sa udaljenim metastaziranjem (N3), a B95-8/P-thr, B95-8/P-ala, Med/P-ala i SK/P-ala nikada nisu udruženi sa udaljenim metastaziranjem;
- ∴ Samo je u grupi pacijenata sa transplantiranim organom pokazana korelacija između EBV polimorfizama i pola. LMP-1 izolati sa delecijom, kao i varijanta Kina 1, javljaju se samo kod osoba ženskog pola. Takođe,

kod žena nikada nema subtip P-ala EBNA-1 gena. Sa druge strane, LMP-1 izolati bez delecije, kao i varijanta B95-8 bili su prisutni samo kod muškaraca.

6. Karakteristike polimorfizama u kliničkom toku nazofaringealnog karcinoma:

∴ Mogući prediktori progresije NFK su polimorfizmi: genotip $1/\leq 4,5$ 33-bp pon/P-ala i genotip $1/ > 4,5$ 33-bp pon/P-thr.

7. LITERATURA



Literatura

- Ai, J, Z Xie, C Liu, Z Huang, i J Xu. "Analysis of EBNA-1 and LMP-1 variants in diseases associated with EBV infection in Chinese children." *Virology* 9 (2012): doi: 10.1186/1743-422X-9-13.
- Anghel, I, A G Anghel, M Dimitru, i C C Soreanu. "Nasopharyngeal carcinoma – analysis of risk factors and immunological markers." *Chirurgia* 107 (2012): 640-645.
- Ayadi, W, i sar. "Polymorphism analysis of Epstein-Barr virus isolates from nasopharyngeal carcinoma biopsies from Tunisian patients." *Virus Genes* 34 (2007): 137-145.
- Baer, R, i sar. "DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome." *Nature* 310 (1984): 207-211.
- Barozzi, P, i sar. "The oncogenic 30 and 69 bp deletion variants of the EBV LMP-1 gene are common in HIV-negative lymphoproliferations, both malignant and benign." *Ann Oncol* 10 (1999): 467-469.
- Bauer, C C, S W Aberie, T Popow-Kraupp, M Kapitan, H Hofmann, i E Puchhammer-Stockl. "Serum Epstein-Barr virus DNA load in primary Epstein-Barr virus infection." *J Clin Microbiol* 75 (2005): 54-58.
- Baumann, M, R Feederle, E Kremmer, i W Hammerschmidt. "Cellular transcription factors recruit viral replication proteins to activate the Epstein-Barr virus origin of lytic DNA replication, oriLyt." *EMBO J* 18 (2000): 6095-6105.
- Berger, C, C McQuain, J L Sullivan, D Nadal, P J Quesenberry, i H Knecht. "The 30-bp deletion variant of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 prevails in acute infectious mononucleosis." *J Infect Dis* 176 (1997): 1370-1373.
- Bhatia, K, i sar. "Variation in the sequence of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in normal peripheral blood lymphocytes and in Burkitt's lymphomas." *Oncogene* 13 (1996): 177-181.
- Bollard, C M, C M Rooney, i H E Heslop. "T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease." *Nat Rev Clin Oncol* 9 (2012): 510-519.
- Borisch, B, i sar. "Distribution and localization of Epstein-Barr virus subtypes A and B in AIDS-related lymphomas and lymphatic tissue HIV-positive patients." *J Pathol* 168 (1992): 229-236.
- Buisson, M, P Morand, O Genoulaz, M J Bourgeat, M Micoud, i J M Seigneurin. "Changes in the dominant Epstein-Barr virus type during human immunodeficiency virus infection." *J Gen Virol* 75 (1994): 431-437.
- Busson, P, C Keryer, T Ooka, i M Corbex. "EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: from epidemiology to virus-targeting strategies." *Trends Microbiol.* 12 (2004): 356-360.
- Chang, C M, K J Yu, S M Mbulaiteye, A Hildesheim, i K Bhatia. "The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal." *Virus Res* 143 (2009): 209-221.
- Chang, E T, i H O Adami. "The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma." *Biomarkers Prev* 15 (2006): 1765-1777.

Chen, J N, i sar. "Variations of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas from Guangzhou, Southern China." *PLOS ONE* 7 (2012): e50084.

Chen, Y Y, K L Chang, W G Chen, D Shibada, K Hayashi, i L M Weiss. "Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen-1 carboxy-terminal gene sequences in Japanese and American patients with gastric carcinoma." *Lab Invest* 78 (1998): 877-882.

Cheng, C C, i sar. "Clinical manifestations and quantitative analysis of virus load in Taiwanese children with Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis." *J Microbiol Immunol Infect* 40 (2007): 216-221.

Chien, Y C, i sar. "Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men." *N Engl J Med* 354 (2001): 1877-1882.

Cohen, J I, E S Mocarski, N Raab-Traub, L Corey, i G J Nabel. "The need and challenges for development of an Epstein-Barr virus vaccine." *Vaccine* 31 (2013): B194-196.

D'Addario, M, i P Chauvin. "Ethnic differences in the expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 mutations in nasopharyngeal carcinoma." *Mutat Res* 457 (2000): 69-78.

Dardari, R, i sar. "High frequency of latent membrane protein-1 30-bp deletion variant with specific single mutations in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma in Moroccan patients." *Int J Cancer* 118 (2005): 1977-1983.

Darriba, D, G L Taboada, R Doallo, i D Posada. "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing." *Nat Methods* 9 (2012): 772.

Dawson, C W, G Tramountanis, A G Eliopoulos, i L S Young. "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the PI3-K/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodelling." *J Biol Chem* 278 (2003): 3694-3704.

Dawson, C W, R J Port, i L S Young. "The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC)." *Semin Cancer Biol* 22 (2012): 144-153.

Do, N V, i sar. "A major EBNA1 variant from Asian EBV isolates shows enhanced transcriptional activity compared to prototype B95.8." *Virus Res* 132 (2008): 15-24.

Dolcetti, R, i sar. "Epstein-Barr virus strains with latent membrane protein-1 deletions: prevalence in the Italian population and high association with human immunodeficiency virus-related Hodgkin's disease." *Blood* 81 (1997): 1723-1731.

Edwards, R H, D Sitki-Green, D T Moore, i N Raab-Traub. "Potential selection of LMP1 variants in nasopharyngeal carcinoma." *J Virol* 78 (2004): 868-881.

Edwards, R H, F Seillier-Moiseiwitsch, i N Raab-Traub. "Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains." *Virology* 261 (1999): 79-95.

Egan, J J, J P Stewart, P S Hasleton, J R Arrand, K B Carroll, i A A Woodcock. "Epstein-Barr virus replication within pulmonary epithelial cells in cryptogenic fibrosing alveolitis." *Thorax* 50 (1995): 1234-1239.

Eliopoulos, A G, i sar. "Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF- κ B pathway involving TNF receptor-associated factors." *Oncogene* 14 (1997): 2899-2916.

Eliopoulos, A G, N J Gallagher, S M Blake, C W Dawson, i L S Young. "Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production." *J Biol Chem* 274 (1999): 16085-16096.

Epstein, M A, G Henle, B G Achong i Y M Barr. "Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma." *J Exp Med* 121 (1965) 761-770.

Fang, C Y, i sar. "The synergistic." *Plos One* 7 (2012): e44810.

Fassone, L, i sar. "Molecular profile of Epstein-Barr virus infection in HHV-8-positive primary effusion lymphoma." *Leukemia* 14 (2000): 271-277.

Fingeroth, J D, J J Weis, T H Tedder, J L Strominger, P A Biro, i D T Fearon. "Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2." *Proc Natl Acad Sci USA* 81 (1984): 4510-4514.

Fujii, K, i sar. "The Epstein-Barr virus pol catalytic subunit physically interacts with the BBLF4-BSLF1-BBLF2/3 complex." *J Virol* 74 (2000): 2550-2557.

Grunewald, V, i sar. "Amino-acid change in the Epstein-Barr-virus ZEBRA protein in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas from Europe and North Africa." *Int J Cancer* 75 (1998): 497-503.

Guindon, S, i O Gascuel. "A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." *Syst Biol* 52 (2003): 696-704.

Guiretti, M D, i sar. "Structural variability of the carboxy-terminus of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 gene in Hodgkin's lymphomas." *J Med Virol* 79 (2007): 1730-1732.

Gulley, M L, i W Tang. "Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease." *JMD* 10 (2008): 279-292.

Gutierrez, M I, i sar. "Sequence variations in EBNA-1 may dictate restriction of tissue distribution of Epstein-Barr virus in normal and tumour cells." *J Gen Virol* 78 (1997): 1663-1670.

Habeshaw, G, Q Y Yao, A I Bell, D Morton, i A B Rickinson. "Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 sequences in endemic and sporadic Burkitt's lymphoma reflect virus strains prevalent in different geographic areas." *J Virol* 73 (1999): 965-975.

Hadhri-Guiga, B, i sar. "Various 30 and 69 bp deletion variants of the Epstein-Barr virus LMP1 may arise by homologous recombination in nasopharyngeal carcinoma of Tunisian patients." *Virus Res* 115 (2006): 24-30.

Hahn, P, et al. "The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion." *Int J Cancer* 91 (2001): 815-821.

Hall, T A. "BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95, 98, NT, 2000, XP." *Nucl Acids Symp* 41 (1999): 95-98.

- Hannigan, A, i J B Wilson. "Evaluation of LMP1 of Epstein-Barr virus as a therapeutic target by its inhibition." *Mol Cancer* 9 (2010): 184-193.
- Hassan, R, i sar. "Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma." *Diagn Pathol* 7 (2006): 17.
- Hatzivassiliou, E, i G Mosialos. "Cellular signaling pathways engaged by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1." *Front Biosci* 7 (2002): d319-d329.
- Hecht, S S. "Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention." *Lancet Oncol.* 3 (2002): 461-469.
- Hildesheim, A, i C P Wang. "Genetic predisposition factors and nasopharyngeal carcinoma risk: a review of epidemiological association studies, 2000-2011." *Semin Cancer Biol* 22 (2012): 107-116.
- Hildesheim, A, i sar. "Occupational exposure to wood, formaldehyde, and solvents and risk of nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Epidemiol Bio-markers Prev* 10 (2001): 1145-1153.
- Hochberg, D, J M Middeldorp, M Catalina, J L Sullivan, K Luzuriaga, i D A Thorley-Lawson. "Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. ." *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004): 239-244.
- Hofelmayr, H, L J Strobl, G Marchall, G W Bornkamm, i U Zimmer-Strobl. "Activated Notch1 can transiently substitute for EBNA2 in the maintenance of proliferation of LMP1-expressing immortalized B cells." 2001.
- Hsu, W L, i sar. "Independent effect of EBV and cigarette smoking on nasopharyngeal carcinoma: a 20-year follow-up study on 9,622 males without family history in Taiwan." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18 (2009): 1218-1226.
- Hutt-Fletcher, L M, i C M Lake. "Two Epstein-Barr virus glycoprotein complexes." *Curr Top Microbiol Immunol* 258 (2001): 51-64.
- Ikegaya, H, H Motani, K Sakurada, K Sato, T Akutsu, i M Yoshino. "Forensic application of Epstein-Barr virus genotype: Correlation between viral genotype and geographical area." *J Virol Methods* 147 (2007): 78-85.
- Janz, A, i sar. "Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands." *J Virol* 74 (2000): 10142-10152.
- Jemal, A, F Bray, M M Center, J Ferlay, E Ward, i D Forman. "Global cancer statistics." *CA Cancer J Clin* 61 (2011): 69-90.
- Jen, K Y, i sar. "Mutational events in LMP1 gene of Epstein-Barr virus in salivary gland lymphoepithelial carcinomas." *Int J Cancer* 105 (2003): 654-660.
- Jia, W H, i H D Qin. "Non-viral environmental risk factors for nasopharyngeal carcinoma: A systematic review." *Semin Cancer Biol* 22 (2012): 117-126.
- Kanai, K, Y Satoh, Y Saiki, H Ohtani, i T Sairenji. "Difference of Epstein-Barr virus isolates from Japanese patients and African Burkitt's lymphoma cell lines based on the sequence of latent membrane protein 1." *Virus Genes* 34 (2007): 55-61.

- Kennedy, G, J Komano, i B Sugden. "Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas." *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003): 14269-14274.
- Khanim, F, Q Y Yao, G Niedobitek, S Sihota, A B Rickinson, i L S Young. "Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumours from different geographic locations." *Blood* 88 (1996): 3491-3501.
- King, A M, M J Adams, E B Carstens, i E J Lefkowitz. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012.
- Kingma, D W, W B Weiss, E S Jaffe, S Kumar, K Frekko, i M Raffeld. "Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene deletions: Correlations with malignancy in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders and malignant lymphomas." *Blood* 88 (1996): 242-251.
- Klein, C, i sar. "EBV-associated lymphoproliferative syndrome with a distinct 69 base-pair deletion in the LMP-1 oncogene." *Br J Haematol* 91 (1995): 938-940.
- Klemenc, P, J Marin, E Soba, N Gale, S Koren, i P Strojjan. "Distribution of Epstein-Barr virus genotypes in throat washings, sera, peripheral blood lymphocytes and in EBV positive tumor biopsies from Slovenian patients with nasopharyngeal carcinoma." *J Med Virol* 78 (2006): 1083-1090.
- Knecht, H, i sar. "Deletion variants within the NF-kappa B activation domain of the LMP1 oncogene prevail in acquired immunodeficiency syndrome-related large cell lymphomas and human immunodeficiency virus-negative atypical lymphoproliferations." *Blood* 87 (1996): 876-881.
- Knecht, H, i sar. "Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma." *Blood* 82 (1993): 2937-2942.
- Kulwichit, W, R H Edwards, E M Davenport, I F Baskar, V Godfrey, i N Raab-Traub. "Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998): 11963-11968.
- Kutok, J L, i F Wang. "Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases." *Annu Rev Pathol Mech Dis* 1 (2006): 375-404.
- Laichalk, L L, i D A Thorley-Lawson. "Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr Virus in vivo." *J Virol* 79 (2005): 1296-1307.
- Laichalk, L L, D Hochberg, G J Babcock, R B Freeman, i D A Thorley-Lawson. "The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection." *Immunity* 16 (2002): 745-754.
- Larcher, C, i sar. "Epstein-Barr virus-associated persistent polyclonal B-cell lymphocytosis with a distinct 69-base pair deletion in the LMP1 oncogene." *Ann Hematol* 74 (1997): 23-28.
- Larcher, C, i sar. "Functional analysis of the mutated Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1(69del): Implications for a new role of naturally occurring LMP1 variants." *Haematologica* 88 (2003): 1324-1335.
- Lawrence, S, L S Young, J R Arrand, i P G Murray. "EBV gene expression and regulation." Chap. 27 in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, by A Arvin, et al., Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47431/>. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

- Li, D J, i sar. "The dominance of China 1 in the spectrum of Epstein-Barr virus strains from Cantonese patients with nasopharyngeal carcinoma." *J Med Virol* 81 (2009): 1253-1260.
- Li, H P, i Y S Chang. "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions." *J Biomed Sci* 10 (2003): 490-504.
- Li, S N, Y S Chang, i S T Liu. "Effect of a 10-amino acid deletion on the oncogenic activity of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus." *Oncogene* 12 (1996): 2129-2135.
- Lin, J C, J M Cherng, H J Lin, C W Tsang, Y X Liu, i S P Lee. "Aminoacid changes in functional domains of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma of southern China and Taiwan: prevalence of an HLA A2-restricted 'epitope-loss variant'." *J Gen Virol* 85 (2004): 2023-2034.
- Lindsey, H-F M. "Epstein-Barr virus entry." *J Virol* 81 (2007): 7825-7832.
- Liu, L T, J P Peng, H C Chang, i W C Hung. "RECK is a target of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1." *Oncogene* 22 (2003): 8263-8270.
- Lo, K W, i D P Huang. "Genetic and epigenetic changes in nasopharyngeal carcinoma." *Semin Cancer Biol* 12 (2002): 451-462.
- Longnecker, R. "Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence?" *Adv Cancer Res* 79 (2000): 175-200.
- Lorenzetti, M A, J Altchek, S Moroni, G Moscatelli, P A Chabay, i M V Preciado. "EBNA1 sequences in Argentinean pediatric acute and latent Epstein-Barr virus infection reflect circulation of novel South American variants." *J Med Virol* 82 (2010): 1730-1738.
- Lorenzetti, M A, M Gantuz, J Altchek, E De Matteo, P A Chabay, i M V Preciado. "Distinctive Epstein-Barr virus variants associated with benign and malignant pediatric pathologies: LMP1 sequence characterization and linkage with other viral gene polymorphisms." *J Clin Microbiol* 50 (2012): 609-618.
- Lyons, S F, i D N Liebowitz. "The roles of humanviruses in the pathogenesis of lymphoma." *Semin Oncol* 25 (1998): 461-475.
- MacKenzie, J, i sar. "Analysis of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 subtypes in EBV-associated lymphomas from Brasil and the United Kingdom." *J Gen Virol* 80 (1999): 2741-2745.
- Mendes, T M, L C Oliveira, L Yamamoto, G M Del Negro, i T S Okay. "Epstein-Barr virus nuclear antigen-2 detection and typing in immunocompromised children correlated with lymphoproliferative disorder biopsy findings." *Braz J Infect Dis* 12 (2008): 186-191.
- Miller, W E, R H Edwards, D M Walling, i N Raab-Traub. "Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1." *J Gen Virol* 75 (1994): 2729-2740.
- Moorthy, R K, i D A Thorley-Lawson. "All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts." *J Virol* 67 (1993): 1638-1646.

Moorthy, R, i D Thorley-Lawson. "Bioshematic, genetic, and functional analyses of the phosphorylation sites on the Epstein-Barr virus-encoded oncogenic latent membrane protein LMP-1." *J Virol* 67 (1993): 2637-2645.

Nagamine, M, i sar. "Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/T-cell lymphoma." *Virus Genes* 34 (2007): 47-54.

Neel, H B, G R Pearson, i W F Taylor. "Antibodies to Epstein-Barr virus in patients with nasopharyngeal carcinoma and in comparison groups." *Ann Otol Rhinol Laryngol* 93 (1984): 477-482.

Nesic, V, S Sipetic, H Vlajinac, S Stosic-Divjak, i S Jesic. "Risk factors for the occurrence of undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type: a case-control study." *Srp Arh Celok Lek* 138 (2010): 6-10.

Nguyen-Van, D, I Enrberg, P PT Phi, C Tran-Thi, i L F Hu. "Epstein-Barr virus genetic variation in Vietnamese patients with nasopharyngeal carcinoma: full-length analysis of LMP1 ." *Virus Genes* 37 (2008): 273-281.

Niesters, H G, J van Esser, E Fries, K C Wolthers, J Cornelissen, i A D M E Osterhaus. "Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus." *J Clin Microbiol* 38 (2000): 712-715.

Ogembo, J G, i sar. "Human Complement Receptor Type 1/CD35 is an Epstein-Barr." *Cell Rep* 3 (2013): 371-385.

Okano, M, i sar. "Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection." *Am J Hematol* 80 (2005): 64-69.

Ozyar, E, A Ayhan, A F Korcum, i I L Atahan. "Prognostic role of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and interleukin-10 expression in patients with nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Invest* 22 (2004): 483-491.

Parker, B D, A Bankier, S Satchwell, B Barrell, i P J Farrell. "Sequence and transcription of Raji Epstein-Barr virus DNA spanning the B95-8 deletion region." *Virology* 179 (1990): 339-346.

Parker, G A, R Touitou, i M J Allday. "Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis." *Oncogene* 19 (2000): 700-709.

Pathmanathan, R, U Prasad, R Sadler, K Flynn, i N Raab-Traub. "Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma." *N Engl J Med* 333 (1995): 693-698.

Peh, S C, L H Kim, K S Mun, E L Tan, C K Sam, i S Poppema. "Epstein-Barr virus (EBV) subtypes and variants in malignant tissue from Malaysian patients." *J Clin Exp Hematopathol* 43 (2003): 61-69.

Perez-Ordóñez, B. "An update on Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinogenesis." *Head and neck pathology* 1 (2007): 141-145.

Polz, D, L Podsiadlo, A Stec, i M Polz-Dacewicz. "Prevalence of EBV genotypes in Polish, Taiwanese and Arabic healthy students and association between genotypes and 30-bp deletion in the LMP-1 gene phylogenetic analysis." *Pol J Microbiol* 63 (2014): 105-109.

Puchhammer-Stockl, E, i I Gorzer. "Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus subtypes-The search for clinical significance." *J Clin Virol* 36 (2006): 239-248.

Raab-Traub, N, i K Flynn. "The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation." *Cell* 47 (1986): 883-889.

Rambaut, A. "<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>." <http://tree.bio.ed.ac.uk/>. 05 12, 2012.
<http://tree.bio.ed.ac.uk/download.html?name=figtree&id=89&num=2> (accessed 06 06, 2014).

Rickinson, A B, i E D Kieff. *Epstein-Barr virus and its replication*. Vol. 2, in *Fields virology*, by D M Knipe, et al., 2603-2654. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

Rowe, M, i sar. "Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers." *J Virol* 68 (1994): 5602-5612.

Saechan, V, A Mori, W Mitarnun, W Settheetham-Ishida, i T Ishida. "Analysis of LMP1 variants of EBV in Southern Thailand: Evidence for strain-associated T-cell tropism and pathogenicity." *J Clin Virol* 36 (2006): 119-125.

Sample, J, L Young, B Martin, T Chatman, E Kieff, i A Rickinson. "Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes." *J Virol* 64 (1990): 4084-4092.

Sandvej, K, M Munch, i S Hamilton-Dutoit. "Mutations in the Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (BNLF-1) gene in spontaneous lymphoblastoid cell lines: effect on in vitro transformation associated parameters and tumorigenicity in SCID and nude mice." *Clin Mol Pathol* 49 (1996): 290-297.

Sandvej, K, S C Peh, B S Andresen, i G Pallesen. "Identification of potential hot spots in the carboxy-terminal part of the Epstein-Barr virus (EBV) BNLF-1 gene in both malignant and benign EBV-associated diseases: high frequency of a 30-bp deletion in Malaysian and Danish peripheral T-cell lymphomas." *Blood* 84 (1994): 4053-4060.

Sandvej, K, X G Zhou, i S Hamilton-Dutoit. "EBNA-1 sequence variation in Danish and Chinese EBV-associated tumors: evidence for geographical polymorphism but not for tumor-specific subtype restriction." *J Pathol* 191 (2000): 127-131.

Sanger, F, S Nichlen, i A R Coulson. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (1977): 5463-5467.

See, H S, Y Y Yap, W K Yip, i H F Seow. "Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) 30-bp deletion and Xho I-loss is associated with type III nasopharyngeal carcinoma in Malaysia." *World J Surg Oncol* 6 (2008): 18.

Senyuta, N, i sar. "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia." *J Med Virol* 86 (2014): 290-300.

Shanmugaratnam, K S, i L H Sobin. *Histological typing of upper respiratory tract tumours*. Geneva: World Health Organization, 1978.

- Siegler, G, i sar. "Expression of tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 in nasopharyngeal carcinoma: possible upregulation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1." *Int J Cancer* 112 (2004): 265-272.
- Sixbey, J W, S M Lemon, i J S Pagano. "A second site for Epstein-Barr virus shedding: the uterine cervix." *Lancet* 2 (1986): 1122-1124.
- Snudden, D K, P R Smith, D Lai, M H Ng, i B E Griffin. "Alterations in the structure of the EBV nuclear antigen, EBNA1, in epithelial cell tumours." *Oncogene* 10 (1995): 1545-1552.
- Sung, N S, R H Edwards, F Seillier-Moiseiwitsch, A G Perkins, Y Zeng, i N Raab-Traub. "Epstein-Barr virus strain variation in nasopharyngeal carcinoma from the endemic and non-endemic regions in China." *Int J Cancer* 76 (1998): 207-215.
- Tacyildiz, N, i sar. "Unusually high frequency of a 69-bp deletion within the carboxy terminus of the LMP-1 oncogene of Epstein-Barr virus detected in Burkitt's lymphoma of Turkish children." *Leukemia* 12 (1998): 1796-1805.
- Takahashi, H, H Ogata, R Nishigaki, D H Broide, i M Karin. "Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis IKKbeta-and JNK1-dependent inflammation." *Cancer Cell* 17 (2010): 89-97.
- Tamura, K, G Stecher, D Peterson, A Filipinski, i S Kumar. "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0." *Molecular Biology and Evolution* 30 (2013): 2725-2729.
- Tamura, K, M Nei, i S Kumar. "Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)." *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004): 11030-11035.
- Tan, E L, S C Peh, i C K Sam. "Analyses of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in Malaysian nasopharyngeal carcinoma: High prevalence of 30-bp deletion, Xho1 polymorphism and evidence of dual infections." *J Med Virol* 69 (2003): 251-257.
- Thompson, C M, i R C Grafstrom. "Commentary: mechanistic considerations for associations between formaldehyde exposure and nasopharyngeal carcinoma." *Environ Health* 8 (2009): 53.
- Thomson, M P, i R Kurzrock. "Epstein-Barr virus and cancer." *Clin Cancer Res* 10 (2004): 803-821.
- Thorley-Lawson, D A, i C A Poodry. "Identification and isolation of the main component (gp350-gp220) of Epstein-Barr virus responsible for generating neutralising antibodies in vivo." *J Virol* 43 (1982): 730-736.
- Tiwawech, D, P Srivatanakul, A Karalak, i T Ishida. "Association between EBNA2 and LMP1 subtypes of Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma in Thais." *J Clin Virol* 42 (2008): 1-6.
- Trimeche, M, S Korbi, S Ziadi, K Amara, J Boniver, i L de Leval. "Molecular characterization of Epstein-Barr virus associated with classical Hodgkin's lymphoma in Tunisia: prevalence of the LMP1 oncogene deletions and A and B viruses strains." *Ann Biol Clin (Paris)* 63 (2005): 193-199.
- Tugizov, S M, J W Berline, i J M Palefsky. "Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells." *Nat Med* 9 (2003): 307-314.

- Vallat-Decouvelaere, A V, i sar. "High frequency of a 30-bp deletion of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in primary HIV non-Hodgkin's brain lymphomas." *Neuropathol Appl Neurobiol* 28 (2002): 471-479.
- Walling, D M, i N Raab-Traub. "Epstein-Barr virus intrastrain recombination in oral hairy leukoplakia." *J Virol* 68 (1994): 7090-7017.
- Wang, D, D Liebowitz, i E Kieff. "An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells." *Cell* 43 (1985): 831-840.
- Wang, J T, T S Sheeng, I J Su, J Y Chen, i M R Chen. "EBNA-1 sequence variations reflect active EBV replication and disease status or quiescent latency in lymphocytes." *J Med Virol* 69 (2003): 417-425.
- Wang, W Y, i sar. "Plasma EBV DNA clearance rate as a novel prognostic marker for metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma." *Clin Cancer Res* 16 (2010): 1016-1024.
- Wang, W Y, Y C Chien, J S Jan, C M Chueh, i J C Lin. "Consistent sequence variation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in primary tumor and peripheral blood cells of patients with nasopharyngeal carcinoma." *Clin Cancer Res* 8 (2002): 2586-2590.
- Wang, Y, K Kanai, Y Satoh, B Luo, i T Sairenji. "Carboxy-terminal sequence variation of latent membrane protein 1 gene in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas from eastern China and Japan." *Intervirology* 50 (2007): 229-236.
- Wang, Y, X Liu, X Xing, Y Cui, C Zhao, i B Luo. "Variations of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 gene in gastric carcinomas and nasopharyngeal carcinomas from Northern China." *Virus Res* 147 (2010): 258-264.
- Wohlford, E M, i sar "Identification of novel variant of LMP-1 of EBV in patients with endemic Burkitt lymphoma in western Kenya." *Infect Agent Cancer* 8 (2013): 34.
- Xu, F H, i sar. "An epidemiological and molecular study of the relationship between smoking, risk of nasopharyngeal carcinoma, and Epstein-Barr virus activation." *Natl Cancer Inst* 104 (2012): 1396-1410.
- Yamamoto, M, i sar. "Detection and quantitation of virus DNA in plasma of patients with Epstein-Barr virus-associated diseases." *J Clin Microbiol* 33 (1995): 1765-1768.
- Young, L S, i A B Rickinson. "Epstein-Barr virus: 40 years on." *Nat Rev Cancer* 4 (2004): 757-768.
- Zeng, Y X, i W H Jia. "Familiar nasopharyngeal carcinoma." *Semin Cancer Biol* 12 (2002): 443-450.
- Zhang, X S, i sar. "The 30-bp deletion variant: A polymorphism of latent membrane protein 1 prevalent in endemic and non-endemic areas of nasopharyngeal carcinomas in China." *Cancer Lett* 176 (2002): 65-73.

Spisak skraćenica korišćenih u tekstu

- AIDS – engl. acquired immunodeficiency syndrome
- AJCC - engl. The American Joint on Cancer
- ak – aminokiselina
- ALT - alanin aminotransferaza
- AST – aspartat aminotransferaza
- BL - Burkitt limfom
- bp – bazni par
- CTAR - engl. carboxy-terminal activating region
- C-terminalni – karboksi-terminalni
- del – delecija
- EA – rani antigen
- EBER – EBV male nekodirajuće RNK
- EBNA – EBV nuklearni antigen
- EBV – Epstein-Barr virus
- EDTA- Etilen-diamino-tetrahlorna kiselina
- GenBank/EMBL/DDBJ - genska internet baza podataka
- HL – Hodgkin limfom
- HLA - engl. human leukocyte antigen
- HT – hemioterapija
- IARC - engl. International Agency for Research and Cancer
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses
- IL – interleukin
- IM – infektivna mononukleoza
- Kd – kilodalton
- KR - kompletna remisija
- LCL - limfoblastoidne ćelijske linije
- LDH – laktatdehidrogenaza

- LMP – latentni membranski protein
- MA – membranski antigen
- Med – Mediteran varijanta LMP-1
- MHC – glavni kompleks gena tkivne podudarnosti, engl. major histocompatibility complex
- ML - Maximum-likelihood filogenetsko stablo
- NF – nuklearni faktor
- NFK - nazofaringealni karcinom
- NHL - non-Hodgkin limfom
- NKL – limfom NK
- nt – nukleotid
- N-terminalni – amino-terminalni
- P - progresija i/ili prisustvo metastaza
- pol - polimorfizam
- pon - ponovak
- PR - parcijalna regresija
- PTLD - posttransplantacioni limfoproliferativni poremećaj
- RHT - radio-hemioterapija
- RT – radioterapija
- S – stabilizacija
- SK – Severna Karolina varijanta LMP-1
- SPSS – Programski paket, engl. Statistical Package for Social Sciences
- T – pacijenti sa transplantiranim organom
- Ter - terapija u toku
- TL - T-ćelijski limfom
- TNF – engl. tumor necrosis factor
- TNM – klasifikacija prema Američkom udruženju za karcinome (AJCC): T, primarni tumor; N, zahvaćenost limfnih nodusa; M, metastaze
- TP – terminalni ponovak

- UCNT - engl. undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type
- UP – unutrašnji ponovak
- VCA - Virusni kapsidni antigen
- Zta – “najraniji” protein
- Spisak skraćenica naziva aminokiselina:

Aminokiselina	Skraćenica (1 slovo)	Skraćenica (3 slova)
Glicin	G	Gly
Alanin	A	Ala
Serin	S	Ser
Prolin	P	Pro
Valin	V	Val
Treonin	T	Thr
Cistein	C	Cys
Leucin	L	Leu
Izoleucin	I	Ile
Asparagin	N	Asn
Asparatinska kiselina	D	Asp
Glutamin	Q	Gln
Lizin	K	Lys
Glutaminska kiselina	E	Glu
Metionin	M	Met
Histidin	H	His
Fenilalanin	F	Phe
Arginin	R	Arg
Tirozin	Y	Tyr
Triptofan	W	Trp

BIOGRAFIJA

Ana V. Banko rođena je 03.03.1982. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2001/02. godine, a diplomirala juna 2007. sa prosečnom ocenom 9,57. Marta 2008. godine izabrana je za stručnog saradnika u nastavi na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, a 2009. u asistenta na istoj katedri. Specijalistički ispit iz Mikrobiologije sa parazitologijom položila je januara 2013. godine sa odličnim uspehom pred komisijom Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Doktorske studije studijskog programa Molekularna medicina upisala je oktobra 2007. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Kao istraživač, učestvovala je na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije: „Biološke posledice genetičke varijabilnosti virusa”, dok trenutno učestvuje na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: „Medicinski značaj biološke varijabilnosti virusa”.

Autor je 26 stručnih radova iz virusologije i mikrobiologije, i to 13 *in extenso* i 13 u vidu izvoda sa međunarodnih i domaćih stručnih sastanaka.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana **Ana Banko**

broj upisa 07-DS-MM-01

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

"Povezanost genetičke varijabilnosti Epštajn-Bar virusa i oboljenja udruženih sa
Epštajn-Bar virusnom infekcijom"

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 07.10.2014.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Ana Banko

Broj upisa: 07-DS-MM-01

Studijski program: molekularna medicina

Naslov rada: "Povezanost genetičke varijabilnosti Epštajn-Bar virusa i oboljenja udruženih sa Epštajn-Bar virusnom infekcijom"

Mentor: Prof.dr Tanja Jovanović

Potpisani: Ana Banko

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 07.10.2014.

Potpis doktoranta



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**"Povezanost genetičke varijabilnosti Epštajn-Bar virusa i oboljenja
udruženih sa Epštajn-Bar virusnom infekcijom"**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranta

U Beogradu, 07.10.2014.

