

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Danijela Z. Karalić

**Uticaj infekcije virusom humane
imunodeficijencije na genetičku varijabilnost
kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE**

Danijela Z. Karalić

**The influence of human immunodeficiency
viral infection on the genetic variability of
clinical isolates of BK and JC polyomaviruses**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

PODACI O MENTORU I KOMISIJI

Mentor:

Doc. Dr Ivana Lazarević – Institut za mikrobiologiju i imunologiju,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komisija:

1. Prof. dr Tanja Jovanović, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Maja Ćupić, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dobrila Stanković Đorđević, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Datum odbrane: _____

"Hey Brother"

Hey brother, there's an endless road to re-discover.

Hey brother, know the water's sweet but blood is thicker.

*Oh, if the sky comes falling down for you,
There's nothing in this world I wouldn't do.*

Hey brother, do you still believe in one another?

Hey sister, do you still believe in love, I wonder?

***Oh, if the sky comes falling down for you,
There's nothing in this world I wouldn't do***

What if I'm far from home?

Oh, brother I will hear you call.

What if I lose it all?

Oh, sister I will help you out!

***Oh, if the sky comes falling down for you,
There's nothing in this world I wouldn't do.***

Hey brother, there's an endless road to re-discover.

Hey sister, do you still believe in love, I wonder?

***Oh, if the sky comes falling down for you,
There's nothing in this world I wouldn't do.***

What if I'm far from home?

Oh, brother I will hear you call.

What if I lose it all?

Oh, sister I will help you out!

***Oh, if the sky comes falling down for you,
There's nothing in this world I wouldn't do.***

Avicii

Posvećeno mom bratu,

Dragiši

Prvo i najvažnije želim da se zahvalim svom mentoru i učitelju Doc. dr Ivani Lazarević. Bila je čast biti Vas prvi doktorand. Hvala na uloženom vremenu, idejama, entuzijazmu i stalnom ohrabrivanju koji su učinili da moje iskustvo sa doktoratom bude produktivno i stimulativno, čak i u teškim vremenima tokom doktorskih studija. Zahvalana sam Vam i što ste mi dopustili da se razvijam i oblikujem kao naučnik bez sputavanja već konstantnim podsticajem. Takođe sam Vam zahvalana na odličnom primeru kako uspešan naučnik i profesor treba da izgleda.

Takođe bih želela da se zahvalim članovima svoje Komisije: Prof. dr Tanji Jovanović i Prof. dr Maji Ćupić na uloženom vremenu, interesovanju, sjajnim savetima i predlozima koji su učinili da ova doktorska disertacija bude kruna višegodišnjeg rada.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim najmlađim kolegama dr Ani Banko, Marini Šiljić i Valentini Nikolić pre svega na kolegijalnosti i uzajamnoj pomoći koje smo pružale jedne drugoj tokom rada na našim doktoratima. Hvala Vam na pomoći i društvu tokom brojnih vikenda, praznika i kasno večernjih sati provedenih na Institutu tokom izrade ovo doktorske disertacije.

Iskrenu zahvalnost dugujem i Prof. dr Aleksandri Knežević koja je uvek bila voljna i spremna da odgovori na svaku moju nedoumicu i nesebično mi pružala pomoć tokom celokupnog rada na doktorskoj tezi. Takođe bih se zahvalila i laboratorijskim tehničarima Gabrijeli Pavlović i Mariji Životić što su me tehnički obučile kako se radi u jednoj molekularnoj laboratoriji.

I na kraju najveću i najdublju zahvalnost dugujem svojoj porodici. Reči ne mogu izraziti koliko sam zahvalna svojim roditeljima. Mama i tata hvala vam sto ste od mene napravili poštenu, vrednu i radnu osobu i što ste mi omogućili i uvek me podržavali u želji za stalnim školovanjem i usavršavanjem. A najviše Vam hvala na mom bratu, mom najboljem prijatelju i najvećem osloncu u životu kome ovu disertaciju i posvećujem. I na kraju, najnovijem članu naše porodice Jovani hvala sto si uvek bila tu da me podržiš, pomogneš i ohrabriš u svakodnevnim životnim situacijama.

Hvala Vam puno svima!

Dr Danijela Karalić

REZIME

Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa

Uvod

Seroepidemiološke studije pokazuju da je između 27% i 80% humane populacije inficirano sa dva poliomavirusa BK virusom (BKV) i JC virusom (JCV). Posle primarne asimptomatske infekcije, koja se obično dešava u toku ranog detinjstva, oba virusa uspostavljaju latenciju u ćelijama bubrega i gornjih partija urinarnog trakta. Sporadična asimptomatska reaktivacija oba virusa se dešava kod 0.5-20% imunokompetentnih seropozitivnih osoba. Međutim, kod imunosuprimiranih osoba njihova reaktivacija može dovesti do nastanka životno ugrožavajućih oboljenja. Reaktivacija JCV, pre svega kod pacijenata sa T ćelijskom imunodeficijencijom, dovodi do litičke infekcije oligodendrocita u centralnom nervnom sistemu (CNS) i nastanka progresivne multifokalne leukoencefalopatije (PML), dok reaktivacija BKV dovodi do nastanka hemoragijskog cistitisa i poliomavirus-udružene nefropatije. Pre epidemije AIDS-a, limfoproliferativna oboljenja su bila vodeći uzrok reaktivacije JCV i BKV, dok danas HIV infekcija predstavlja najčešći uzrok reaktivacije JCV i nastanka PML. Očigledno je da imunosupresija predstavlja fundamentalni predisponirajući faktor za nastanak PML, poliomavirus-udružene nefropatije i hemoragijskog cistitisa. Ipak, ova oboljenja ne nastaju kod svih imunosuprimiranih osoba, tako da se smatra da i drugi faktori, poput genetičke varijabilnosti BK i JC virusa, mogu doprineti njihovom nastanku.

Ciljevi

Ciljevi ovog istraživanja bili su: da se odredi prevalenca izlučivanja BKV i JCV u urinu HIV-inficiranih pacijenata i pacijenata kontrolne grupe i ispita moguća povezanost virurije u grupi HIV-inficiranih sa demografskim, virusološkim i citološkim parametrima kao i sa stadijumima bolesti i vrstom primenjene terapije; da se utvrdi distribucija genotipova i subtipova, struktura nekodirajućeg

regulatornog regiona kao i prisustvo mutacija u VP1 regionu JCV i BKV u obe grupe ispitanika.

Metodologija

U istraživanje su uključeni uzorci urina 114 HIV-inficiranih pacijenta i 120 zdravih osoba. Semi-nested i nested-PCR metodom su umnoženi fragmenti VP1 gena i NCRR JCV i BKV, a PCR produkti su zatim direktno sekvencirani. Upotrebom odgovarajućih bioinformatičkih alata vršena je filogenetska analiza sekvenci. Za statističku obradu podataka korišćen je SPSS program ver. 20.

Rezultati

Učestalost BK virurije kod HIV-inficiranih pacijenata iznosila je 50,8%, dok je u kontrolnoj grupi ispitanika iznosila 7,5%. Utvrđena je visoko statistički značajna razlika u učestalosti BK virurije između dve ispitivane grupe ($p=0,0001$). JC virurija je češće otkrivana kod HIV-inficiranih pacijenata (43,8% kod HIV-inficiranih vs. 30,8% ispitanika kontrolne grupe; $p=0,039$). Utvrđena je statistički značajna razlika u stepenu BKV virurije među CDC kliničkim kategorijama ($p=0,019$) gde je BK virurija značajno češća među HIV-inficiranim pacijentima koji pripadaju C kliničkoj kategorije (64,4%) u odnosu na one koje pripadaju A+B kategoriji. U obe grupe ispitanika su otkrivena dva subtipa BKV: I i IV. S druge strane, distribucija JCV se razlikovala među ispitivanim grupama. U kontrolnoj grupi ispitanika najčešći genotipovi JCV su bili genotip 1, 2 i 4, dok je u grupi HIV-inficiranih dominantan genotip bio 2 praćen genotipovima 1 i 4. Kod HIV-inficiranih pacijenata, najveći broj nesinonimnih nukleotidnih izmena otkriven je u okviru BC receptorskog domena VP1 gena BKV, dok su kod ispitanika kontrolne grupe sve nesinonimne nukleotidne izmene otkrivene van receptorskih domena u okviru β -ploča. Statistički visoko značajna razlika je utvrđena u distribuciji mutacija u BC receptorskom domenu VP1 gena BKV između HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe ($p=0,0004$). Svi HIV-inficirani pacijenti koji su imali mutacije u VP1 genu BKV imali su broj CD4+ ćelija manji od 200 po ml krvi. Struktura NCRR svih izolata JCV i BKV odgovara arhetip varijanti NCRR JCV tj.

BKV. dN i dS vrednosti DE receptorskih domena JCV i BC receptorskog domena BKV kod HIV-inficiranih pacijenata su bile nekoliko puta više od dN i dS vrednosti za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona JCV tj. BKV, ukazujući da je ovaj deo genoma pod većim uticajem selekcionog pritiska imunskog odgovora.

Zaključak

Imunosupresija predstavlja jako bitan faktor za reaktivacija BKV i JCV i dovodi do povećanja nivoa virusne replikacije. Povećan nivo replikacije BKV je povezan sa češćom pojavom mutacija u okviru BC receptorskog domena, a mutacije u BC receptorskom domenu mogu dovesti do izmene tropizma i stvaranja novih agresivnijih varijanti BKV. Ova studija je pokazala da evropski, evroazijski i indijski tipovi JCV cirkulišu u Srbiji i takva distribucija je u skladu sa poreklom i istorijom srpskog naroda. Selektivni pritisak zbog imunosupresivnog stanja dovodi do promene u distribuciji JCV genotipova. Imajući na umu da je genotip 2 tzv., "nepovoljni" genotip najčešći genotip kod HIV-inficiranih pacijenata u ovom istraživanju, pacijenti koji imaju HIV/poliomavirus koinfekciju treba da budu pod češćim i redovnijim nadzorom kako bi se modulacijom imunosupresivne terapije smanjila mogućnost za reaktivaciju JCV i nastanak PML-a.

Ključne reči: BKV, JCV, HIV, mutacije, VP1, NCRR, genotipovi, subtipovi

Naučna oblast/uža naučna oblast: Molekularna medicina/Virusologija

SUMMARY

The influence of human immunodeficiency viral infection on the genetic variability of clinical isolates of BK and JC polyomaviruses

Introduction

Seroepidemiologic studies have shown that between 27% and 80% of human population is infected with two human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). After primary asymptomatic infection, which usually occurs during early childhood, both viruses establish latency in the cells of the kidney and upper parts of the urinary tract. Sporadic asymptomatic reactivations of both viruses occur in 0,5-20% of seropositive immunocompetent individuals. However, in immunosuppressed patients reactivation of the viruses can lead to the development of serious and life threatening diseases. Reactivation of JCV, primarily in patients with T cell immunodeficiency, leads to lytic infection of oligodendrocytes in the central nervous system (CNS) and the development of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), while reactivation of BKV is associated with hemorrhagic cystitis and polyomavirus-associated nephropathy. Before the AIDS epidemic, lymphoproliferative diseases were the leading cause for reactivation of JCV and BKV while nowadays HIV infection is the most common cause for reactivation of JCV and the development of PML. It is evident that immunosuppression is a fundamental predisposing factor for developing PML, polyomavirus-associated nephropathy and hemorrhagic cystitis. However, these diseases do not affect all immunosuppressed individuals, suggesting that other factors, such as genetic variability of BK and JC viruses, can contribute to their occurrence.

Objectives

The objectives of this research were to determine the prevalence of BKV and JCV viruria in HIV-infected patients and patients of the control group and critically evaluate the relationship between viruria and demographic, virological and cytological parameters as well as the stages of the disease and the applied therapy;

also, to determine the distribution of genotypes and subtypes, the structure of non-coding regulatory region and the presence of mutations in the VP1 region of JCV and BKV in both groups of patients.

Methodology

The survey included urine samples of 114 HIV-infected patients and 120 healthy donors. Semi-nested and nested-PCR methods were used for amplification of the VP1 gene and NCR of JCV and BKV. After visualisation of PCR products of appropriate length in 2% agarose gel under the UV light, all positive PCR products were directly sequenced. Phylogenetic analysis of sequences was performed by using appropriate bioinformatics tools. For statistical analysis SPSS program ver. 20 was used.

Results

The frequency of BK viruria in HIV-infected patients was 50.8%, while it was 7.5% in the control group subjects. There was high statistically significant difference in the frequency of BK viruria between two study groups ($p=0.0001$). JC viruria was also more often detected in HIV-infected patients (43.8% in HIV-infected vs. 30.8% in the control group; $p=0.039$). There was statistically significant difference in frequency of BKV viruria among HIV-infected patients belonging to different CDC clinical categories ($p=0.019$). BK viruria was more common among HIV-infected patients who belonged to the C clinical category (64.4%) compared to those belonging to category A+B. In both groups two subtypes of BKV were identified: I and IV. On the other hand, the distribution of JCV genotypes was different among studied groups. In the control group the most common genotypes of JCV were 1, 2 and 4, while among HIV-infected patients dominant genotype was 2 followed by genotypes 1 and 4. In HIV-infected patients, the majority of non-synonymous alterations were detected within the BC loop of the BKV VP1, while in the control group all non-synonymous alterations were detected outside of the receptor loops in the β -sheets that connect the loops. The higher frequency of mutations in the BC loop of VP1 protein was identified among the BKV isolates from HIV-infected patients and there was statistically significant difference between HIV-infected patients and healthy subjects ($p=0.0004$). All

mutations in the VP1 protein of BKV isolates from HIV-infected patients were detected among patients with CD4⁺ cell counts less than 200 cells/mm³. The structures of BKV and JCV NCCR found in the urine samples of patients infected with HIV and healthy donors showed a pattern identical to the archetype structure, except for some point mutations. dS and dN values of the DE and BC loop of JCV and BKV in HIV-infected patients were several times higher compared with the dS and dN values of the VP1 gene region, indicating that this part of the genome is under the more selective pressure.

Conclusion

Immunosuppression is a very important factor for the reactivation of BKV and JCV, and leads to increased levels of viral replication. Increased levels of replication of BKV are associated with a higher incidence of mutations in the BC loop, and mutations in the BC loop may lead to changed tropism and generation of new more aggressive variations of BKV. This study showed that European, Eurasian and Indian types of JCV circulate in Serbia and such distribution is in accordance with the origin and history of the Serbian people. The selective pressure due to the immunosuppressive state leads to changes in the distribution of JCV genotypes. Having in mind that “unfavorable” genotype 2 is the most common genotype in HIV-infected patients of this study, it could be concluded that patients who have HIV/polyomavirus coinfection should be under more frequent supervision in order to reduce the potential risk for reactivation of JCV and the emergence of PML by modulating immunosuppressive therapy.

Keywords: BKV, JCV, HIV, mutations, VP1, NCCR, genotypes, subtypes

Scientific field: Molecular Medicine / Virology

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Istorijat i klasifikacija BKV i JCV	2
1.2. Struktura viriona BKV i JCV.....	4
1.3. Karakteristike i organizacija genoma BKV i JCV	5
1.4. Životni ciklus BKV i JCV	6
1.5. Klinički značaj BK i JC virusne infekcije	9
1.5.1. HIV i reaktivacija JCV i BKV	11
1.5.2. Klinički značaj reaktivacije poliomavirusa kod HIV- inficiranih pacijenata	12
1.6. Varijabilnost NCRR i VP1 gena BKV i JCV	14
1.6.1. Varijabilnost NCRR BKV i JCV	14
1.6.2. Varijabilnost VP1 gena BKV i JCV	17
1.7. Molekularna epidemiologija BKV i JCV	19
1.7.1. Subtipovi i subgrupe BKV	19
1.7.2. Genotipovi i subgenotiovi JCV	19
1.7.2.1. JCV kao antropološki marker migracije stanovništva	20
1.7.3. Klinički značaj određivanja subgrupa BKV i genotipova JCV	22
2. Ciljevi istraživanja	23
3. Materijal i metode	25
3.1. Ispitanici	27
3.2. Klinički uzorci	29
3.3. Metodologija	29
3.3.1. Izolovanje virusne DNK	29
3.3.2. Dokazivanje JCV u urinu	31
3.3.2.1. Umnožavanje VP1 gena JCV seminested-PCR metodom	31
3.3.2.2. Umnožavanje NCRR JCV nested-PCR metodom	32
3.3.3. Dokazivanje BKV u urinu	34
3.3.3.1. Umnožavanje VP1 gena BKV seminested-PCR metodom	34

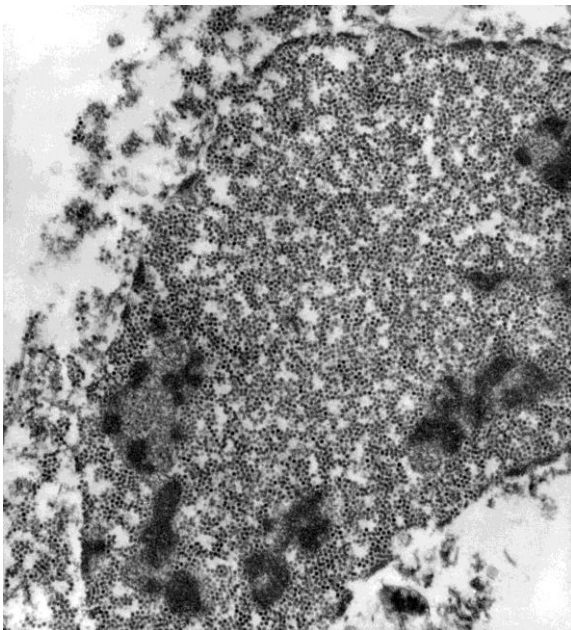
3.3.3.2. Umnožavanje NCRR BKV nested-PCR metodom	35
3.3.4. Analiza PCR produkta elektroforezom u agaroznom gelu	37
3.3.5. DNK sekvenciranje	39
3.3.5.1. Prečišćavanje PCR produkata	39
3.3.5.2. Reakcija cikličnog sekvenciranja	40
3.3.5.3. Prečišćavanje produkata cikličnog sekvenciranja	42
3.3.5.4. Kapilarna elektroforeza u automatskom sekvencioneru	42
3.3.6. Analiza DNK sekvenci	43
3.3.6.1. Određivanje genotipova i subgenotipova JCV	43
3.3.6.2. Otkrivanje nukleotidnih izmena i mutacija u VP1 genu	44
3.3.6.3. Utvrđivanje strukture i otkrivanje nukleotidnih izmena i mutacija u NCRR JCV	45
3.3.6.4. Određivanje subgrupa i subtipova BKV	45
3.3.6.5. Otkrivanje nukleotidnih izmena i mutacija u VP1 genu BKV	45
3.3.6.6. Utvrđivanje strukture i otkrivanje nukleotidnih izmena i mutacija u NCRR BKV	46
3.3.6.7. Filogenetska analiza	46
3.4. Statistička analiza dobijenih rezultata	48
4. Rezultati	49
4.1. Učestalost BKV DNK u urinu	51
4.2. Učestalost JCV DNK u urinu	53
4.3. Ispitivanje učestalosti BKV i JCV virurije u odnosu na kliničke parametre kod HIV-inficiranih pacijenata	56
4.3.1. Ispitivanje učestalosti BKV i JCV virurije u odnosu na broj CD4+ ćelija	56
4.3.2. Ispitivanje učestalosti BKV i JCV virurije u odnosu na CDC kategoriju HIV-inficiranih pacijenata	57
4.3.3. Ispitivanje učestalosti BKV i JCV virurije u odnosu na primenjenu HAART terapiju kod HIV-inficiranih pacijenata	58
4.4. Distribucija subtipova i subgrupa BKV	59
4.5. Identifikacija i distribucija nukleotidnih izmena i mutacija u VP1 genu BKV	62

4.6. Rezultati analize strukture NCRR izolata BKV	66
4.7. Distribucija genotipova i subgenotipova JCV	69
4.8. Identifikacija i distribucija nukleotidnih izmena i mutacija u VP1 genu JCV	73
4.9. Rezultati analize strukture NCRR izolata JCV	75
4.10. Filogenetska analiza izolata BKV i JCV	79
4.10.1. Rezultati procene selekcionog pritiska za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona izolata BKV	70
4.10.2. Rezultati procene selekcionog pritiska za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona izolata JCV	80
5. Diskusija	81
6. Zaključci	98
7. Literatura	101
Spisak skraćenica korišćenih u tekstu	119

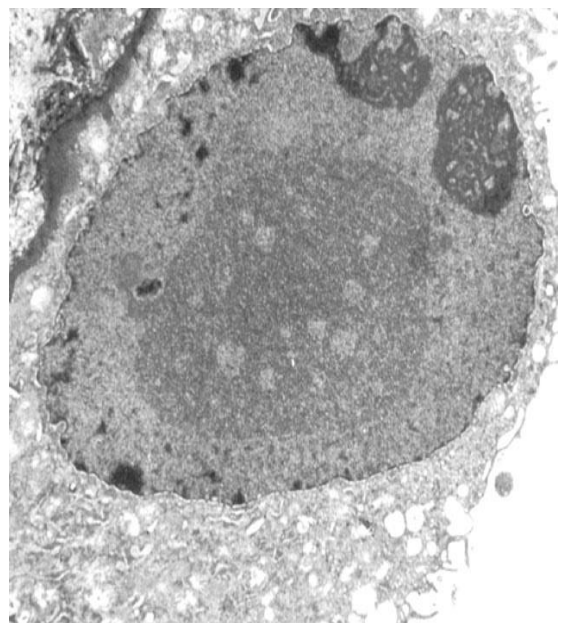
1. UVOD

1.1. Istorijat i klasifikacija BKV i JCV

BK i JC virus su prvi identifikovani humani poliomavirusi. Nazive su dobili po inicijalima pacijenata kod kojih su prvi put izolovani. JC virus je prvi humani poliomavirus koji je otkriven 1964. godine elektronskom mikroskopijom. Naime, 1964. godine naučnici Zu Rhein i Sam Chou su u formalinom fiksiranim preparatima moždanog tkiva pacijenta obolelog od progresivne multifokalne leukoencefalopatije (PML) videli veliki broj virusnih čestica ikozaedarne simetrije (Zurhein i Chou, 1965.) (Slika 1.). Posle šest godina virus je izolovan iz glijalnih ćelija moždanog parenhima pacijenta sa PML (Pagett i sar., 1971.). Padgett i sar., (1971) dokazuju da je JCV etiološki uzročnik PML, jako retkog ali u skoro 90-95% slučajeva smrtonosnog oboljenja koje nastaje pre svega kod osoba sa deficitom u ćelijskoj imunosti (Berger, 2003.). BKV je izolovan 1970. godine iz urina pacijenta sa uretralnom stenozom koja je nastala 3 i po meseca posle transplantacije bubrega (Gardner i sar., 1971.) (Slika 2.).

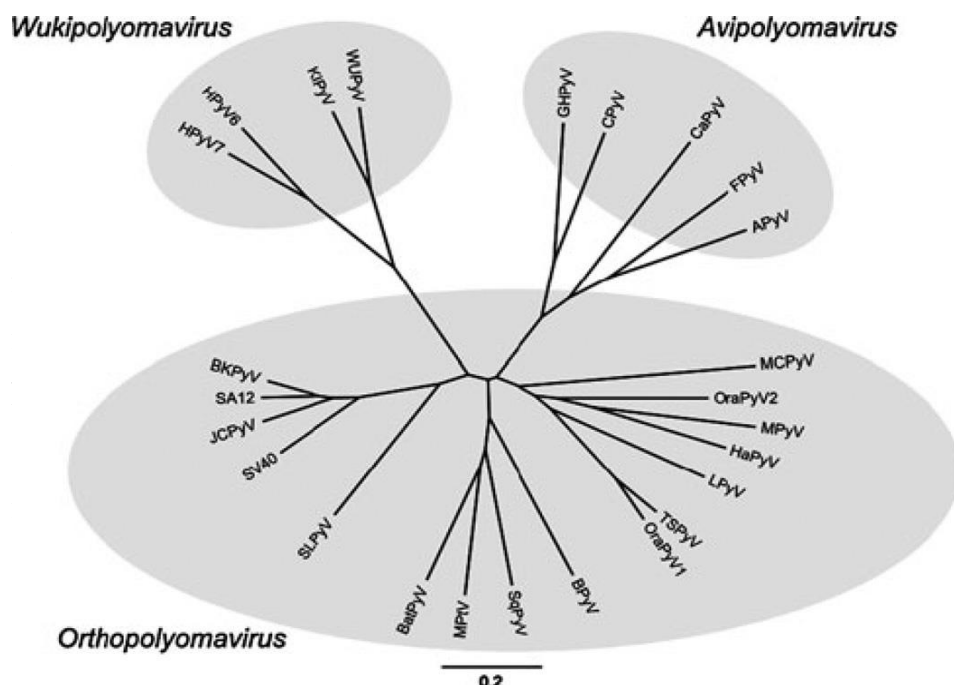


Slika 1. Elektronska mikroskopija JCV u oligodendrocitima pacijenta obolelog od PML-a (Zurhein i Chou, 1965.)



Slika 2. BK virusne partikule u tubularnoj ćeliji urinarnog trakta (Gardner i sar., 1971.)

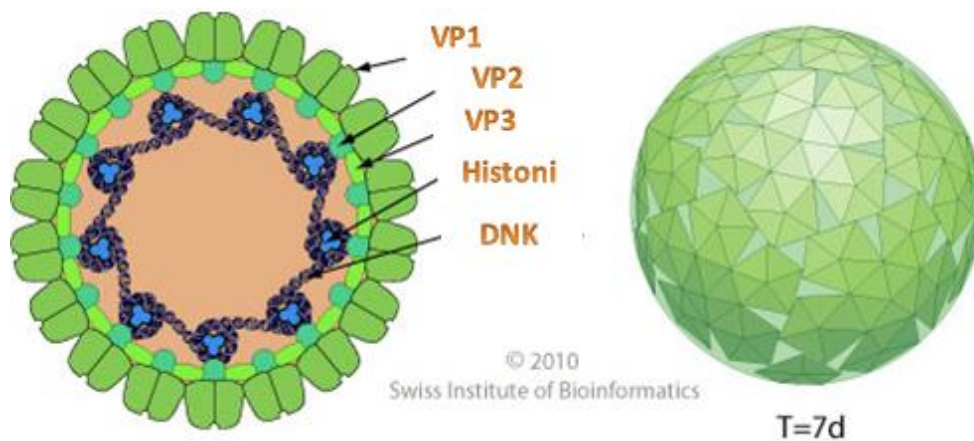
Do skoro porodica *Polyomaviridae* imala je samo jedan rod *Polyomavirus*, u okviru koga se nalazio veći broj vrsta poliomavirusa sisara i ptica (Johnes i sar., 2011.). U periodu 2007-2012, osam novih humanih poliomavirusa je otkriveno, pre svega zahvaljujući savremenim molekularno biološkim tehnikama. Godine 2010., *Polyomaviridae* studijska grupa u okviru Internacionalnog komiteta za taksonomiju virusa (engl. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) predložila je revizija porodice *Polyomaviridae*. Naime, prema ovoj novoj taksonomiji u okviru porodice *Polyomaviridae* postoje tri roda: *Orthopolyomavirus* koji sadrži „klasične“ poliomaviruse sisara (BKV, JCV, SV40, mišiji poliomavirus...); *Wikipolyomavirus* koji sadrži novootkrivene humane poliomaviruse (Karolinska Institute polyomavirus (KIV), Washington University polyomavirus (WUV)...); i *Avipolyomavirus* u okviru koga se nalaze poliomavirusi ptica (King i sar., 2011.). Filogenetska analiza ukazuje na činjenicu da su poliomavirusi u okviru roda *Orthopolyomavirus*, gde pripadaju i BKV i JCV, u evolutivnom smislu mnogo bliži i srodniji u odnosu na poliomaviruse rodova *Wikipolyomavirus* i *Avipolyomavirus* (Grafikon 1.).



Grafikon 1. Filogenetsko stablo porodice *Polyomaviridae*

1.2. Struktura viriona BKV i JCV

Poliomovirusi spadaju u najmanje DNK viruse. BK i JC virioni su sferičnog oblika, veličine od 45-50nm, ikozaedarne simetrije kapsida bez omotača (Slika 3.). Poseduju cirkularnu dvolančanu DNK veličine oko 5kbp koja je udružena sa ćelijskim histonima H2A, H2B, H3 i H4.

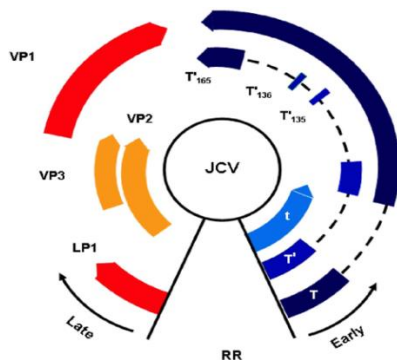


Slika 3. Šematski prikaz BKV i JCV

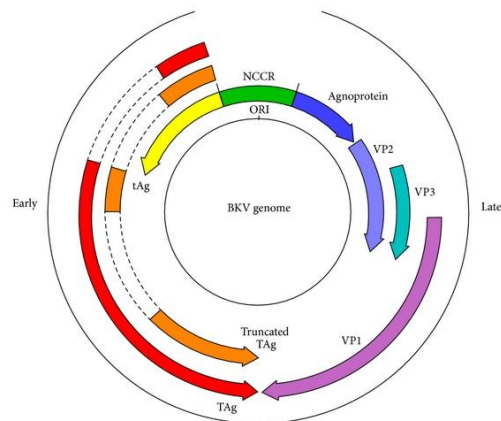
U sastav ikozaedarnog kapsida ulaze tri virusna proteina VP1, VP2 i VP3. Kapsid poliomavirusa se sastoji od 72 kapsomere, a svaka kapsomera se sastoji od 5 molekula VP1 proteina i po jednog molekula VP2 i VP3. Samo se VP1 protein nalazi na površini kapsida i služi za pripajanje za glikoproteinske receptore na ciljnoj ćeliji. Svojim C-terminalnim krajem svaki molekul VP1 proteina je povezan sa VP1 molekulom u susjednoj kapsomeri (Barouch i Harrison, 1994., Chen i sar., 1998.). VP2 i VP3 su unutrašnji proteini u kapsomeri i učestvuju u sklapanju virusne partikule. Kalcijumovi joni održavaju stabilnost kapsomera, a mutacije u regionu koji vezuje Ca^{2+} jone dovode do prerane razgradnje kapsida (Li i sar., 2003.).

1.3. Karakteristike i organizacija genoma BKV i JCV

Genom oba virusa je cirkularna dvolančana DNK, dužine 5153bp kod BKV tj 5130 bp kod JCV (Miyamura i sar., 1983., Dhar i sar., 1978.). Postoji 70-75% homologije između genoma BKV i JCV. Genomi BKV i JCV podeljeni su u tri regiona: rani kodirajući region, kasni kodirajući region i hipervarijabilni nekodirajući regulatorni region (engl. noncoding regulatory region- NCRR)(Šema 1. i 2.).



Šema 1: Struktura i organizacija genoma JCV



Šema 2: Struktura i organizacija genoma BKV

Rani kodirajući region, dužine 2.4 kbp, sadrži gene za sintezu ranih virusnih proteina koji se označavaju kao mali t i veliki T antigeni (t-Ag i T-Ag) (Moens i Rekvig, 2001.). Veliki T-Ag je jedan od prvih proteina koje se sintetiše u inficiranoj ćeliji i ima jednu od najvažnijih uloga u replikaciji. T-Ag je neophodan za proces adenilacije, ima ATP-aznu i helikaznu aktivnost i započinje sintezu virusne DNK. T-Ag uvodi ćeliju u S fazu ćelijskog ciklusa tako što vezivanjem za hipofosforilisani protein retinoblastoma (pRb) omogućava prevremeno oslobađanje transkripcionog faktora E2F koji vrši stimulaciju ćelije da pređe u replikativnu fazu (S-fazu) ćelijskog ciklusa. Kada uspostavi odgovarajuću sredinu, T-Ag se u kompleksu sa ćelijskom DNK polimerazom vezuje za mesto početka replikacije tzv. *origin of replication (ori)* u okviru NCRR i započinje sintezu virusne DNK u oba pravca (Stubdal i sar., 1997., Harris i sar., 1998.). Mali t antigen je cisteinom bogat protein koji se sastoji od 124

do 198 aminokiselina i deli N-terminalni kraj sa velikim T antigenom. Njegova uloga u životnom ciklusu poliomavirusa još uvek nije u potpunosti objašnjena. Virusna replikacija se uspešno odvija i u potpunom odsustvu ovog proteina (Moens i Rekvig, 2001.).

Kasni kodirajući region, dužine 2.3 kbp, sadrži genetičke informacije za sintezu strukturnih proteina (VP1, VP2 i VP3) koji ulaze u sastav ikozaedarnog kapsida. Takođe u okviru ovog regiona se nalazi gen za sintezu agnoproteina. Iako još u potpunosti nije razjašnjena funkcija ovog proteina u životnom ciklusu poliomavirusa zna se da agnoprotein ima ulogu u efikasnijem sklapanju virusnih proteina u kapsid i izlasku virusa iz inficirane ćelije (Carswell i Alwine, 1986.).

Nekodirajući regulatorni region (NCRR) je najvarijabilniji deo genoma poliomavirusa, dužine 300-500bp i nalazi se između ranog i kasnog kodirajućeg regiona (Šema 1. i 2.). U ovom regionu se nalaze mesto početka replikacije (ori), TATA region, mesta za vezivanje T-Ag i ćelijskih transkripcionih faktora kao i pojačivači i utišivači transkripcije ranih i kasnih gena. U okviru ovog regiona nalazi se bidirekcionni promotor koji inicira transkripciju kasnih gena u smeru kazaljke na satu, a ranih gena u suprotnom smeru (Moens i Rekvig, 2001., Ahsan i Shah, 2001.).

1.4. Životni ciklus BKV i JCV

Životni ciklus poliomavirusa je podeljen u dve faze: ranu i kasnu. Podela na dve faze je izvršena iz didatičkih razloga jer se određeni događaji iz rane i kasne faze međusobno preklapaju tako da jasna granica između ove dve faze ne postoji. Rana faza započinje vezivanjem virusa za receptore na površini ćelije i nastavlja se do početka replikacije virusne DNK kada započinje kasna faza. Kasnu fazu životnog ciklusa čine svi događaji koji dovode do sklapanja novih virusnih čestica i završava se izlaskom virusa iz inficirane ćelije.

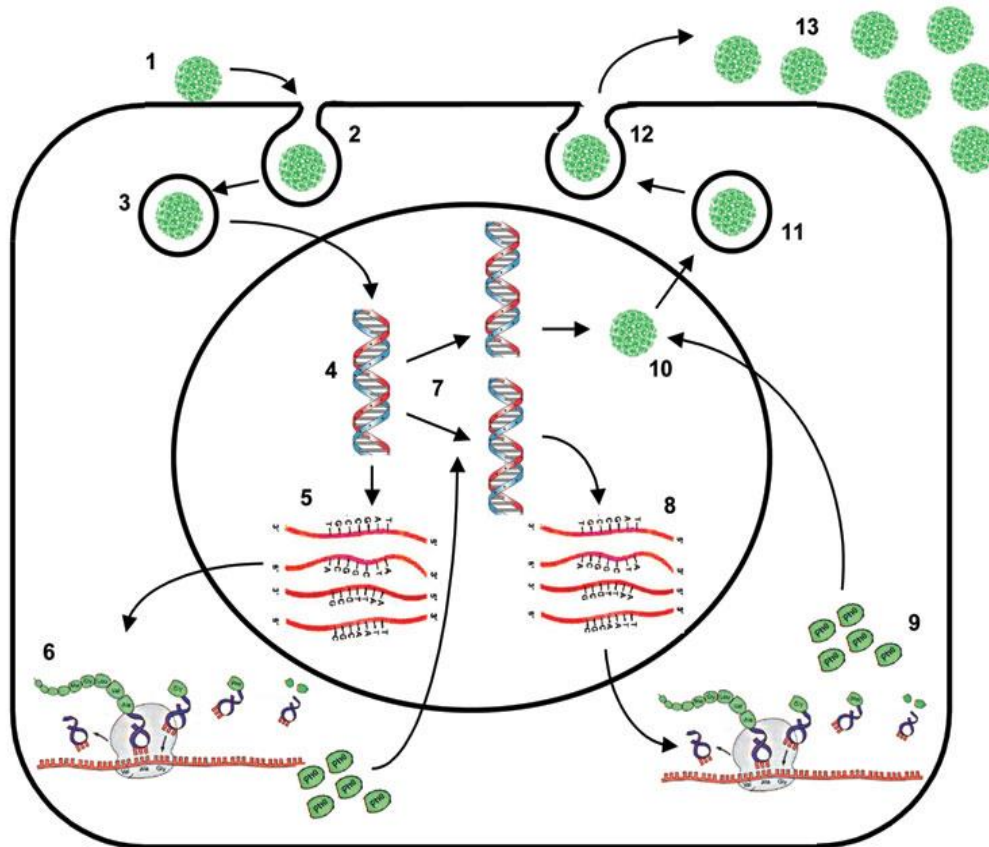
Prvi korak u životnom ciklusu humanih poliomavirusa (šema 3.) je vezivanje virusnih antireceptora za receptore na površini ciljnih ćelija. I BKV i JCV zahtevaju

prisustvo sijalinske kiseline na površini ćelija za efikasan ulazak virusa u ciljne ćelije. N-vezujući glikoprotein sa $\alpha(2,3)$ -sijalinskom kiselinom služi kao receptor za BK virus na ćelijama (Dugan i sar., 2005.). BKV takođe koristi ganglioze GT1a i GD1a kao receptore (Low i sar., 2006.). Ovi gangliozi se nalaze na površini bubrežnih tubularnih epitelijalnih ćelija koje predstavljaju ciljne ćelije za BKV. Receptori za JCV su N-vezujući glikoproteini na čijem se terminalnom kraju nalazi $\alpha(2,6)$ -sijalinska kiselina kao i serotoninski receptor 5HT_{2A} (Liu i sar., 1998., Elphick i sar., 2004.). Istraživanja su pokazala da antagonisti 5HT_{2A} receptora kao i antitela usmerena na 5HT_{2A} inhibiraju JCV infekciju (Elphick i sar., 2004.).

BKV i JCV ulaze u ćeliju endocitozom. BKV ulazi kaveolin-posredovanom endocitozom, dok JCV ulazi u ćelije endocitozom posredovanom klatrinom (Pho i sar., 2000.). Zatim se virusi u endozomalnim vezikulama citoskeletnom mašinerijom transportuju do endoplazmatskog retikuluma (ER) gde započinje proces dekapsidacije. Dekapsidacija JCV započinje tek na nivou jedarnih pora, jer je „jedarni lokalizacioni signal“ (engl. nuclear localization signal), koji se nalazi u okviru VP1 molekula, neophodan za ulazak JCV u jedro inficirane ćelije (Raghava i sar., 2011.).

U jedru ćelije se odvija transkripcija virusnih gena i replikacija virusnog genoma BKV ili JCV. Prvo dolazi do transkripcije ranih virusnih gena, velikog T i malog t antigena. Sinteza velikog T antigena omogućava započinjanje replikacije virusnog genoma. Veliki T antigen se vezuje za mesto početka replikacije (ori) u okviru NCRR i svojom helikaznom aktivnošću prvo dovodi do rasplitavanja dvočlane DNK. Zatim se T Ag vezuje za ćelijske proteine neophodne za virusnu replikaciju poput DNK polimeraze, topoizomeraze I i II. Zahvaljujući svojoj multifunkcionalnosti T Ag dovodi do promena u ćelijskoj mikrosredini, uvodi ćeliju u S fazu životnog ciklusa, kako bi obezbedio najpovoljnije uslove za replikaciju virusnog genoma. DNK replikacija se odvija kontinuirao u 5'-3' pravcu, a preko Okazakijevih fragmenata u 3'-5' pravcu. Po završetku sinteze novih molekula virusnog genoma, T Ag suprimira transkripciju ranih gena i dovodi do transkripcije kasnih virusnih gena VP1, VP2, VP3 kao i gena za agnoprotein.

Sinteza ranih i kasnih proteina se odvija u citoplazmi na ribozomima. I rani i kasni proteini sadrže „jedarni lokalizacioni signal“ koji ih usmerava i odvodi u jedro gde obavljaju svoje funkcije.



Šema 3. Životni ciklus JCV i BKV

1. Vezivanje virusa za receptore;
2. Ulazak virusa u ćeliju endocitozom;
3. Transport virusa u endozomalnoj vezikli do jedra;
4. Dekapsidacija;
5. Transkripcija ranih virusnih gena u jedru;
6. Translacija ranih virusnih proteina u citoplazmi;
7. Replikacija DNK virusa;
8. Transkripcija kasnih virusnih gena u jedru;
9. Translacija kasnih virusnih proteina u citoplazmi;
10. i 11. Morfogeneza novih virusnih čestica;
12. Izlazak virusa iz inficirane ćelije;
13. Izlazak novih virusnih čestica iz ćelije.

Morfogeneza BKV i JCV započinje u jedru gde prvo dolazi do formiranja kapsomera. Kapsomere se sastoji od 5 molekula VP1 i po jednog molekula VP2 i VP3. Procesom samosakupljanja 72 kapsomere se udružuju i formiraju ikozaedarni kaspid. Zatim dolazi do ugradnje viruse DNK i formiranja nukleokapsida. Virusna DNK je udružena sa ćelijskim histonima H2A, H2B, H3 i H4 i formira mini hromozomalne strukture koje je skoro nemoguće razlikovati od ćelijskog hromatina.

Mehanizam kojim poliomavirusi napuštaju ćeliju još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da novoformirani virioni dovode do lize ćelije, mada nalazi nekih studija vršenih elektronskom mikroskopijom, tvrde da virusi sekrecijom napuštaju ćeliju i ne dovode do oštećenja ćelijske membrane (Imperiale, 2001.).

1.5. Klinički značaj BK i JC virusne infekcije

Seroepidemiološke studije pokazuju da je između 27% i 80% humane populacije inficirano sa BKV i JCV. Primarna infekcije, koja nastaje u toku ranog detinjstva, je obično asimptomatska ili se ispoljava kao blago respiratorno oboljenje (Goudsmit i sar., 1981.). Posle primarne infekcije, oba virusa uspostavljaju latenciju u ćelijama bubrega i gornjih partija urinarnog trakta. JCV pored bubrega latenciju ostvaruje i u B limfocitima kao i u ćelijama monocitne loze. Sporadična asimptomatska reaktivacija oba virusa se dešava kod 0.5-20% imunokompetentnih seropozitivnih osoba (Eash i sar., 2006.). Međutim, kod osoba sa imunodeficijencijama kao i kod pacijenata koji koriste imunosupresivne lekove pre svega monoklonska antitela (natalizumab, basiliximab) u terapiji osnovne bolesti, reaktivacija ovih virusa može dovesti do nastanka životno ugrožavajućih oboljenja.

Reaktivacija BK virusne infekcije je vrlo značaj uzročnik oboljenja kod imunosuprimiranih pacijenata. BKV je etiološki uzročnik poliomavirus-udružene nefropatije (PVN) i uretralne stenozе kod pacijenata sa transplantiranim bubregom,

kao i hemoragijskog cistitisa (HC) kod pacijenata posle transplantacije koštane srži (Sukov i sar., 2008.). U obe grupe pacijenata, imunosupresivni lekovi za očuvanje grafta dovode do reaktivacije latentne BK virusne infekcije u urinarnom traktu.

Poliomavirus-udružena nefropatija, najčešće BKV-udruženo oboljenje posle transplantacije bubrega, je jedan oblik akutnog intesticijalnog nefritisa (Nickeleit i Mihatsch, 2006.). Reaktivacija BKV praćena virurijom i viremijom se javlja kod 80% pacijenata sa transplantiranim bubregom. Kod 10% ovih pacijenata nastaje PVN koja će dovesti do gubitka grafta kod skoro 90% pacijenata (Binet i sar., 1999., Egli i sar., 2007., Hirsch i sar., 2002.). Osnovna patohistološka karakteristika PVN je nekroza proksimalnih tubula i razaranje bazalne membrane praćena fibrozom (Nickeleit i sar., 2003.). U poslednje vreme, incidenca PVN je u porastu zbog upotrebe novijih i jačih imunosupresivnih lekova (Mengel i sar., 2003.). Pored imunosupresije, kao najbitnijeg faktora rizika, i faktori domaćina, virusa i grafta imaju svoju ulogu u nastanku PVN. Do danas, efikasna i specifična antivirusna terapija za BKV ne postoji. Najčešće se vrši modulacija imunosupresivne terapije kako bi imunski sistem pokušao da uspostavi kontrolu nad BK virusnom infekcijom. Međutim, smanjivanje doza imunosupresivnih lekova dovodi pacijente u rizik od akutnog odbacivanja bubrega.

Hemoragijski cistitis je ozbiljna BKV-udružena komplikacija koja pogađa oko 10% pacijenata posle transplantacije koštane srži i karakteriše se dizurijom i različitim stepenima hematurije (Dropulic i Jones, 2008.). HC najverovatnije nastaje kao posledica reaktivacija BKV u urotelijumu, pošto se BK virusne čestice mogu otkriti u deskvamovanim epitelijalnim ćelijama u urinu (Fogazzi i sar., 2001.). Nivo virurije korelira sa stepenom hematurije kod pacijenata sa HC (Bogdanovich i sar., 2004.). Obično, BKV-udruženi HC nastaje 10 dana posle transplantacije i zahteva hospitalizaciju i adekvatan medicinski tretman.

Progresivna multifokalna leukoencefalopatija (PML) je subakutno, degenerativno i progresivno oboljenje CNS-a koje nastaje kao posledica litičke infekcije JC virusa u oligodendrocitima. Oligodendrociti su mijelin produkujuće ćelije

CNS-a, tako da je osnovna patohistološka karakteristika PML prisustvo multifokalnih zona demijelinizacije u beloj masi mozga (White i Khalili, 2011.). Klinički, pacijenti sa PML-om pokazuju brojne neurološke simptome poput mišićne slabosti koja vremenom prelazi u hemiplegiju, kognitivno propadanje sa nastankom subkortikalne demencije kao i ispade u vidnom polju i senzornom sistemu (Ferenczy i sar., 2012.). PML može nastati bilo kada tokom života, čak i u detinjstvu, ali se najčešće dijagnostikuje kod odraslih sa ozbiljnijim stepenom imunosupresije. Vreme preživljavanja je jako kratko, od nekoliko meseci do godinu dana, i uslovljeno je težinom imunosupresivnog stanja kao i stepenom replikacije JCV u CNS-u (Berger, 2003.). Specifična antivirusna terapija ne postoji, već se vrši modifikacija terapije osnovnog oboljenja.

Pre epidemije AIDS-a, limfoproliferativna oboljenja su bila vodeći uzrok reaktivacije JCV i BKV, dok danas HIV infekcija predstavlja najčešći uzrok reaktivacije JCV i nastanka PML (Jiang i sar., 2009.).

1.5.1. HIV i reaktivacija JCV i BKV

CD8+ citotoksični T limfociti (CTL) su najznačajnije ćelije imuskog sistema u borbi protiv BKV i JCV infekcije. CTL su ćelije koje prepoznaju epitope u okviru VP1 molekula i T antigena BK i JC virusa. Osnovna odlika disfunkcije imuskog sistema u toku HIV infekcije je smanjenje broja CD4+ T limfocita. Tokom hroničnih virusnih infekcija dovoljan broj CD4+ T limfocita je neopodan kako bi se održao adekvatan odgovor CD8+ CTL i samim tim kontrola nad perzistentim virusnim infekcijama (Matloubian i sar., 1994.). Smanjen ili potpuni nedostatak odgovora citotoksičnih T limfocita usled smanjenja broja CD4+ T limfocita kod HIV inficiranih je jedan od razloga za povećen obim replikacije JCV i BKV.

Dodatni razlog za češću reaktivaciju poliomavirusa kod HIV inficiranih pacijenata je sinergistička veza između HIV-a i JCV/BKV koja se dešava na molekularnom nivou. Zanimljivo je da i HIV i JCV ostvaruju latenciju u istim

ćelijama. Naime CD34+ progenitorske ćelije koštane srži su rezervoari i HIV i JCV (Houff i Berger, 2008., Monaco i sar., 1996). Nestrukturani protein HIV-a, tat protein, je jako snažan aktivator i virusnih i ćelijskih promotora (Chowdhury i sar., 1993.), dok JCV agnoprotein dovodi da blagog smanjenja replikacije HIV-a (Kaniowska i sar., 2006.). HIV inficirane ćelije sekretuju tat protein koji ulazi i u susedne neinficirane ćelije i utiče na ćelijski ciklus (Ensoli i sar., 1990.), tako da koinfekcija ćelija sa JCV i HIV nije neophodna da bi se ostvarila veza na molekularnom nivou između ova dva virusa. Tat protein se vezuje za tat-vezujuća mesta u okviru NCRR JCV i deluje kao pojačivač transkripcije ranih gena pre svega T antigena. I JCV i HIV koriste iste ćelijske transkripcione faktore uključujući proteine iz NF-1 familije (Jones i sar., 1998.), Sp1 faktor kao i ćelijski protein Pur α (Chen i sar., 1995.). Tat protein kada se veže sa Pur α dovodi do povećanog obima replikacije JCV (Daniel i sar., 2001.).

Tat protein takođe aktivira BKV rani promotor (engl. BKV early promoter-BKVE) i dovodi do povećanog obima BKV replikacije. Tat stimuliše BKVE tako što vezuje NF-kB p65 subjedinicu za kB vezujuće mesto koje se nalazi u blizini 3' kraja BKVE (Gorrill i sar., 2006.). Aktivacija BKVE dovodi do sinteze T Ag koji se vezuje za mesto početka replikacije u okviru NCRR i predstavlja ključnog igrača u replikativnoj fazi BKV infekcije.

1.5.2. Klinički značaj reaktivacije poliomavirusa kod HIV inficiranih pacijenata

Reaktivacija JCV, pre svega kod pacijenata sa T ćelijskom imunodeficijencijom, dovodi do litičke infekcije oligodendrocita u centralnom nervnom sistemu i nastanka PML (Hou i Major, 2000.). Danas osamdeset posto pacijenata sa PML-om su HIV inficirane osobe. PML se javlja kod 1-10% pacijenata sa AIDS-om i dovodi do fatalnog ishoda u 90%-95% slučajeva u toku prve godine od postavljanja dijagnoze PML-a (Berger, 2003.). Iako je upotreba visoko aktivne antiretrovirusne terapije (engl. highly active antiretroviral therapy-HAART) smanjila

broj oportunističkih infekcija, incidenca PML se i dalje održava kod HIV/AIDS pacijenata. Imunomodulatorna terapija monoklonskim antitelima za Kronovu bolest ili multiplu sklerozu takođe povećavaju rizik za nastanak PML. Iako je retko oboljenje, incidenca PML je u stalnom porastu zbog povećanog broja ljudi sa AIDS-om kao i zbog sve većeg broja oboljenja u čijoj se terapiji koriste imunomodulatorni lekovi. Osim toga, u poslednje vreme reaktivacija JCV se dovodi u vezu sa nastankom nekih novih neuroloških poremećaja poput neuropatija, encefalopatija i meningitisa (Tan i Koranik, 2010.).

U poslednje vreme infekcija sa BKV dobija sve više pažnje u naučnim krugovima pre svega zbog porasta broja imunosuprimiranih pacijenata. BKV je etiološki uzročnik hemoragičnog cistitisa i poliomavirus-udružene nefropatije (Sukov i sar., 2008.). U poslednjoj deceniji, širok spektar oboljenja poput nefritisa, pneumonije, encefalitisa i retinitisa koji su posledica reaktivacije BKV utvrđen je kod HIV inficiranih pacijenata (Barouch i sar., 2002., Hedquist i sar., 1999., Cubukcu-Dimopulo i sar., 2000.).

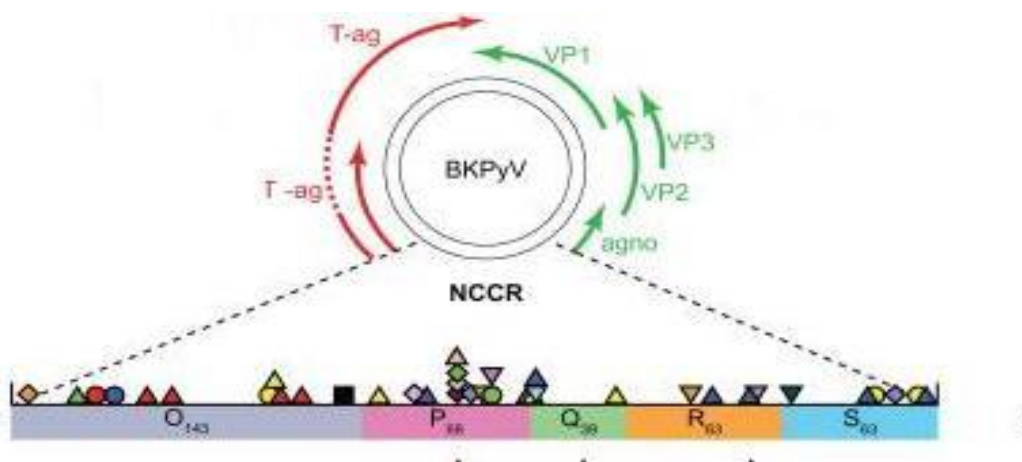
Ipak, ova oboljenja ne nastaju kod svih imunosuprimiranih osoba, tako da se smatra da i drugi faktori, poput genetičke varijabilnosti BK i JC virusa, mogu doprineti njihovom nastanku.

1.6. Varijabilnost NCCR i VP1 gena BKV i JCV

1.6.1. Varijabilnost NCCR BKV i JCV

Na osnovu strukture NCCR, i BK i JC virus su klasifikovani u dve varijante: arhetip (nepatološku) varijantu i rearanžiranu (patološku) varijantu.

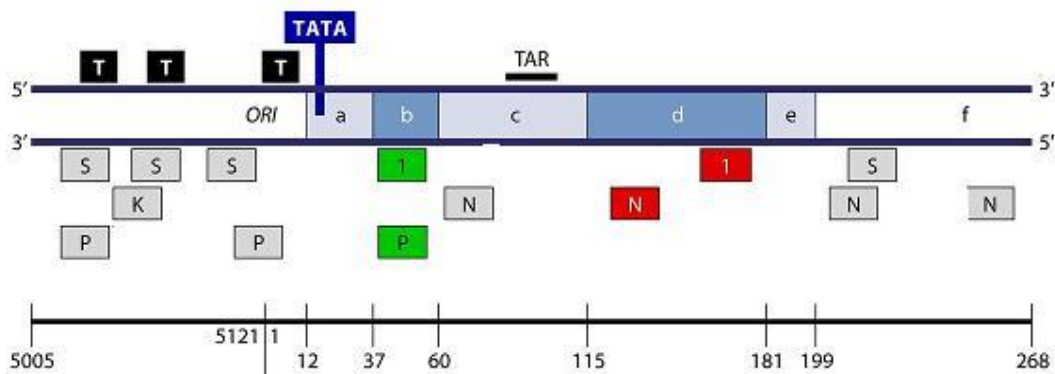
Arhetip varijanta NCCR se nalaze kod divljih sojeva virusa, ima ulogu u transmisiji virusa i najčešća je forma NCCR koja se otkriva u urinu kako imunokompetentnih tako i imunosuprimiranih pacijenata. Kod arhetip varijante, NCCR se sastoji od linearnog niza nukleotida podeljenih u 5 blokova DNK sekvenci koji se označavaju kao O, P, Q, R i S kod BKV tj. u 6 blokova kod JCV označenih kao A, B, C, D, E i F (Berger, 2003., Ault i Stoner, 1993.). BKV sadrži fiksni broj nukleotida u okviru svakog bloka NCCR. Kod arhetip varijante BKV blokovi se označavaju O₁₄₂, P₆₃, Q₃₉, R₆₃ i S₆₃, gde se blok O sastoji od 142 nukleotida, blok P od 63 itd (Šema 4.). U okviru ovih blokova se nalaze vezujuća mesta za brojne transkripcione faktore koji regulišu transkripciju i replikaciju BKV. U okviru Q i R bloka nalaze se dva vezujuća mesta za Sp1 transkripcioni faktor, dok se proteini NF-1 familije vezuju za mesta u okviru P, Q, R i S blokova (Moens i sar., 1993.).



Šema 4. Struktura arhetip varijante BKV NCCR;

O, P, Q, R, S blokovi sekenci DNK

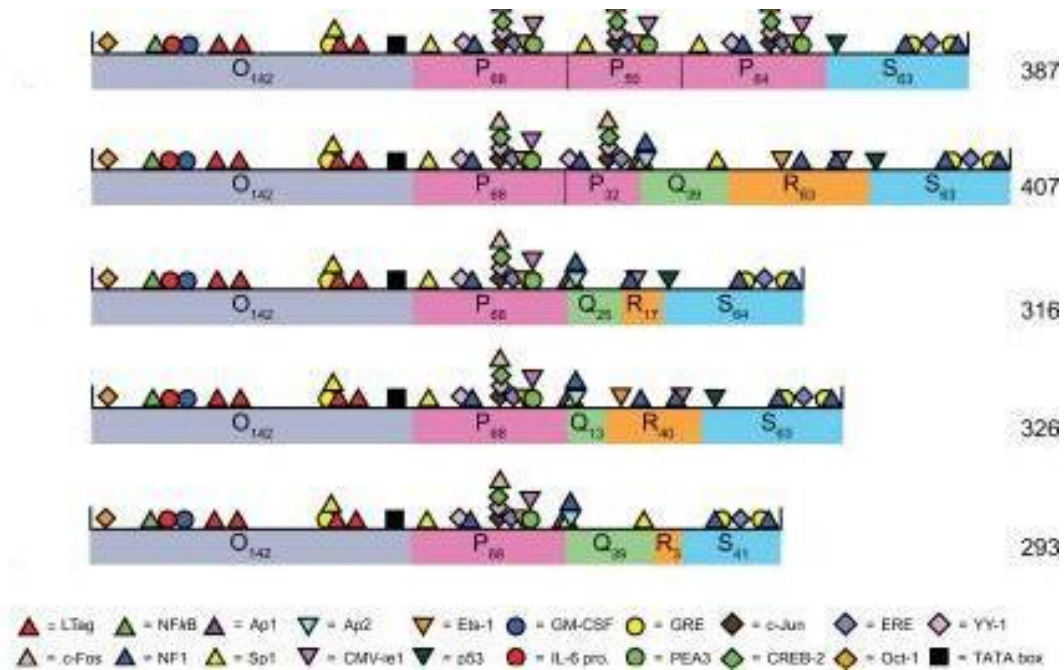
Arhetip varijanta NCRR JCV je dužine oko 300bp. I kod JCV svaki od blokova NCRR se sastoji od fiksnog broja nukleotida A36, B23, C55, D66, E18 i F69 u okviru kojih se nalaze vezujuća mesta za brojne transkripcione faktore (Šema 5.).Varijabilnost arhetip varijante NCRR se može manifestovati u vidu tačkastih mutacija (tranzicije ili transverzije).



Šema 5. Struktura arhetip varijante JCV NCRR:

a, b, c, d, e, f blokovi DNK sekvenci; T- vezujuća mesta za T Ag; TATA-tata region; TAR (engl. transactivation response element) vezujuće mesto za HIV tat protein; 1-vezujuće mesto za Sp1 faktor; K- vezujuće mesto za NF-kB; N-vezujuće mesto za proteine NFI familije; P-vezujuće mesto za Pura α ; S-vezujuće mesto za Spi-B.

Rearanžirane (patološke) varijante nastaju iz arhetip varijante delecijama, duplikacijama ili insercijama u okviru blokova tokom imunosupresije (Sharma i sar., 2007). Delecije, duplikacije ili insercije mogu da uklone, stvore ili povećaju broj vezujućih mesta za transkripcione faktore u okviru NCRR i dovode do selektivne prednosti rearanžiranih formi zbog povećanog obima replikacije i izmenjenog tkivnog tropizma (Šema 6).

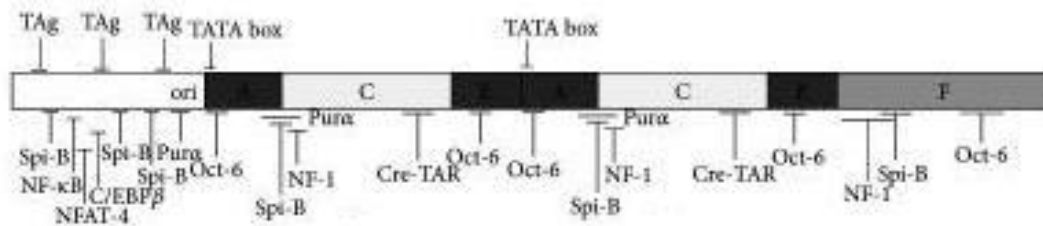


Šema 6. Rearanžirane varijante BKV NCR sa vezujućim mestima za različite transkripcione faktore

Npr. rearanžirana varijanta JCV je neurotropna i dovodi do litičke infekcije oligodendrocita i nastanka PML-a (Hou i Major, 2000.). Usled povećanog obima replikacije virusa, broj virusa sa rearanžiranom formom NCR se povećava i u jednom trenutku rearanžirana varijanta postaje dominantni oblik virusa u krvi (Gosert i sar., 2008.). Dominacija rearanžiranih varijanti virusa u domaćinu može direktno da utiče na klinički ishod oboljenja, pošto se ove varijante efikasnije replikuju i imaju izraženiji citocidni potencijal (Gosert i sar., 2008.). Rearanžirane BKV i JCV varijante se najčešće izoluju iz krvi, likvora ili tkiva imunosuprimiranih pacijenata koji boluju od nekog poliomavirus-udruženog oboljenja.

Rearanžiranje NCR JCV se najverovatnije odigrava u B limfocitima pošto se u njima nalaze potrebni enzimi za ovaj proces, a to su enzimi Rag1 i Rag2 koji vrše rearanžiranje imunoglobulinskih gena (Monaco i sar., 1996., Dorries i sar.,1994.).

Prototip rearanžirane forme NCRR JCV je izolat pod nazivom Mad-1 JCV i sastoji se od tandemskih ponovaka dužine 98bp pri čemu se svaki ponovak sastoji od blokova A, C i E (Šema 7.)

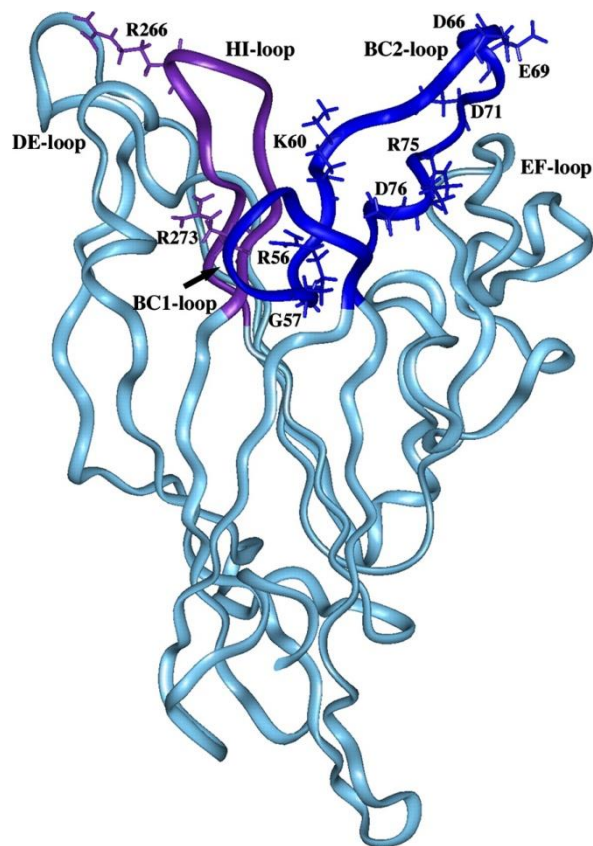


Šema 7. Rearanžirana varijanta NCRR JCV (izolat JCV Mad-1)

Mad-1 JCV je patološka forma virusa sa izraženim neurotropizmom i neuroviruelncijom, koja se skoro uvek izoluje iz uzoraka moždanog tkiva pacijenata sa PML-om (Marzocchetti i sar., 2008.). U poređenju sa arhetip sekvencom ova sekvenca sadrži mnogo veći broj vezujućih mesta za transkripcione faktore koji su neophodni za ekspresiju kako ranih tako i kasnih virusnih gena.

1.6.2. Varijabilnost VP1 gena BKV i JCV

Produkt VP1 gena, koji pripada grupi kasnih struktrnih gena BKV i JCV, je VP1 protein. VP1 molekul je glavni strukturni protein ikozaedarnog kapsida oba virusa. To je najpovršniji molekul u kapsidu koji ima ključnu ulogu u vezivanju za receptor na ćeliji domaćina. VP1 protein takođe sadrži epitope na koje imunski sistem stvara neutrališuća antitela (Shan i sar., 1977.). VP1 polipeptid se i kod BKV i kod JCV, sastoji od pet spoljašnjih domena (BC, CD, DE, EF, GH i HI) (slika 4.) koji su međusobno povezani β -pločama (β -C, β -D, β -E, β -F) (Dugan i sar., 2007.). Spoljašnji domeni BC i HI su najvažniji domeni VP1 proteina i imaju ulogu u vezivanju za sijalinsku kiselinu N-vezujućih glikoproteina na površini ciljnih ćelija za BKV i JCV.



Slika 4. Struktura VP1 polipeptida poliomavirusa

Mutacije u VP1 genu, pre svega u spoljašnjim domenima, mogu izmeniti biološke karakteristike virusa i dovesti do selekcije agresivnijih formi virusa sa izmenjenim tropizmom i povećanim patološkim potencijalom (Neu i sar., 2013.). Sunyaev i sar. (2009.) su u svom istraživanju otkrili specifične mutacije u spoljašnjim domenima VP1 proteina JCV samo kod PML pacijenata, dok kod kontrolnih uzoraka zdravih osoba takve mutacije nisu postojale .

S druge strane, klinički značaj mutacija u VP1 kod BKV je do sada uglavnom ispitivan kod pacijenata sa poliomavirus-udruženom nefropatijom (Tremolada i sar., 2010., Krautkrämer i sar., 2009.). U većini ovih studija utvrđena je povećana učestalost mutacija u VP1, međutim specifičan obrazac mutacija za nastanak poliomavirus-udruženih oboljenja nije utvrđen.

1.7. Molekularna epidemiologija BKV i JCV

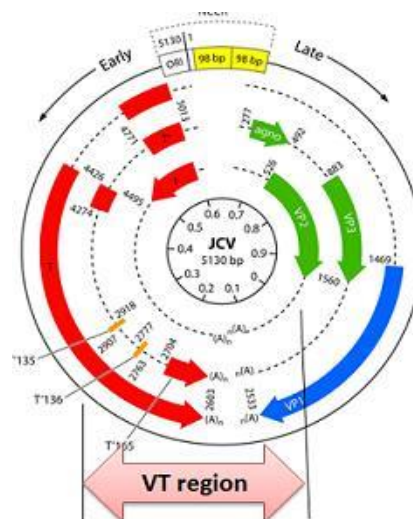
1.7.1. Subtipovi i subgrupe BKV

U prošlosti su na osnovu seroloških i genotipskih metoda izolati BKV klasifikovani u četiri subtipa (I-IV) (Knowles i sar., 1989., Jin i sar., 1993.). Danas se koristi genotipska metoda za klasifikaciju BKV izolata koja se zasniva na identifikaciji polimorfizma regiona VP1 gena koji kodira aminokisline 63 do 81 u VP1 proteinu (Jin i sar., 1993.). Subtip I je široko rasprostranjen u celom svetu, subtip IV dominira u Istočnoj Aziji, dok se subtipovi II i III jako retko otkrivaju među BKV izolatima bilo gde u svetu (Nishimoto i sar., 2007., Zheng i sar., 2007.). Na osnovu filogenetske analize, u okviru subtipa I se razlikuju četiri subgrupe (Ia, Ib1, Ib2 i Ic) sa jedinstvenom geografskom distribucijom: Ia je dominantan u Africi, Ib1 u Južnoj i Istočnoj Aziji, Ib2 u Evropi, a Ic u Severnoj Aziji (Ikegaya i sar., 2006., Takasaka i sra., 2004., Zheng i sar., 2007.). Takođe, na osnovu filogenetske analize subtip IV je podeljen na šest subgrupa (IVa1, IVa2, IVb1, IVb2, IVc1, IVc2) (Nishimoto i sar., 2007.). Sve subgrupe izuzev IVc2 su dominantne među stanovnicima Istočne Azije, dok je subgrupa IVc2 rasprostanjena u Evropi i Severnoistočnoj Aziji (Nishimoto i sar., 2007.).

1.7.2. Genotipovi u subgenotipovi

JCV

Genotipizacija JCV izolata izvršena je na osnovu tihih mutacija najkonzerviranijeg dela genoma tzv. „VT intergenic region“ (skr. VT region). VT je region dužine 610bp koji spaja 3' kraj VP1 gena i 5' kraj T antigena (Slika 5.).

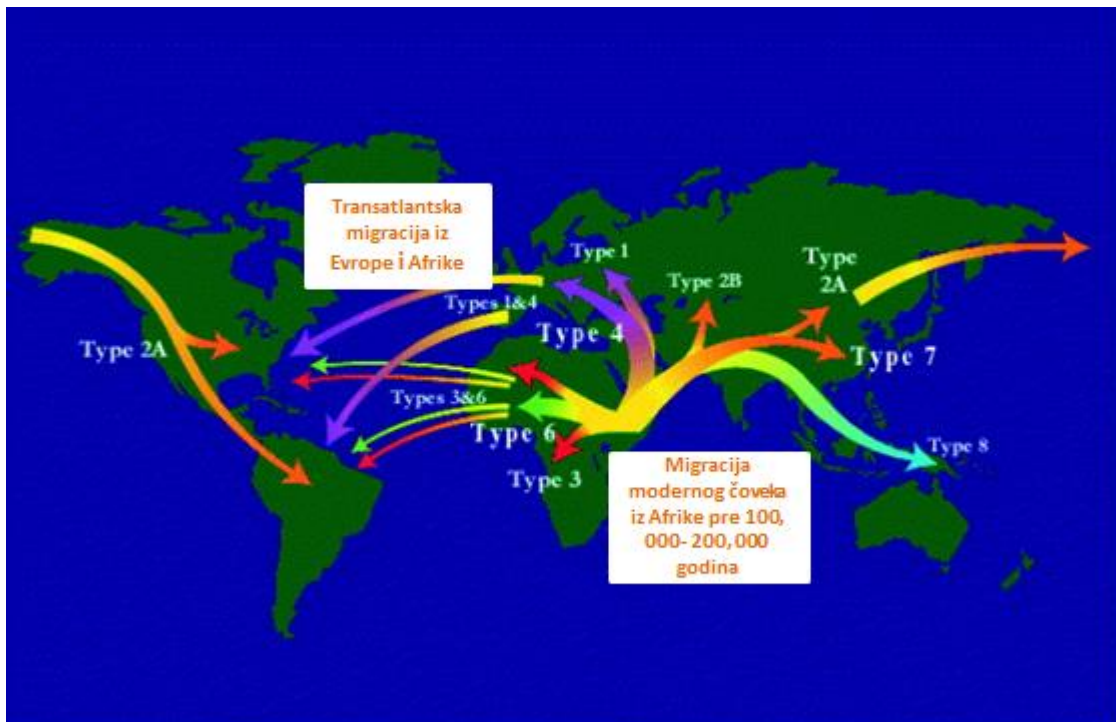


Do danas je otkriveno 8 genotipova JCV i u okviru njih nekoliko subgenotipova (Agostini i sar., 1996., Jobses i sar., 1998., Hatwell i Sharp, 2000.). Razlika u nukleotidnoj sekvenci između genotipova iznosi 1-3%, a između subgenotipova 0.5-1%. Genotip 1 i 4, koji su usko povezani jedan s drugim, dominiraju među Evropljanima kao i među potomcima Evropljana u Americi (Agostini i sar., 2001). Genotipovi 3 i 6 su karakteristika populacije koja naseljava subsaharsku Afriku; genotip 3 je otkriven u Etiopiji, Tanzaniji i Severnoj Africi, a genotip 6 u Gani (Guo i sar., 1996., Sugimoto i sar., 2002., Kato i sar., 2000.). Najširu geografsku distribuciju imaju genotipovi 2 i 7 (Sugimoto i sar., 1997.). Subgenotip 2A dominira među japanskom populacijom i starosedeocima Severne Amerike, 2B među Evropljanima, 2D u Indiji, a 2E u Australiji i narodima Zapadnog Pacifika (Fernandes-Cobo i sar., 2002., Yanagihara i sar., 2002., Zheng i sar., 2003., Miranda i sar., 2004., Takasaka i sar., 2004.). Subtip 7A je tipičan za Kinu i Jugoistočnu Aziju (Saruwatari i sar., 2002), a 7B Severnu Kinu, Mongoliju i Japan (Sugimoto i sar., 2002.). I na kraju, genotip 8, najnoviji genotip među izolatima JCV, je otkriven među stanovnicima Papua Novu Gvineju i ostrva Pacifika (Yanagihara i sar., 2002.).

1.7.2.1. JCV kao antropološki marker migracije stanovnika

Široka rasprostranjenost virusa, transmisija koja se uglavnom odvija unutar porodice tokom ranog detinjstva, kao i povezanost genotipova i subgenotipova sa određenim etničkim grupama su neke od karakteristika zbog kojih se JCV danas koristi i kao marker za praćenje migracije stanovništva (Slika 6.) (Stoner i sar., 2000.). Koevolucija JCV sa ljudskom populacijom započela je pre 100 000-200 000 godina nastankom modernog čoveka (*Homo sapiens sapiens*) (Stoner i sar., 2000.). Moderni čovek (*Homo sapiens sapiens*) je migrirao iz Afrike u dva talasa. Prvi talas je naselio Evropu i sa sobom doneo genotipove 1 i 4, a drugi talas Aziju sa genotipovima 2 i 7. Genotipovi 1 i 4 su markeri Evropljana kao i potomaka Evropljana koji su tokom istorije naselili druge kontinente i države. Subgenotip 2B je Evroazijski tip i karakteristika je naroda koji žive na granici zapada i istoka tj. Evrope i Azije. U drugom talasu migracije iz Afrike moderni čovek koji je „nosio“

subgenotipove 2A, 2C, 2D i genotip 7, naselio je Daleki Istok i Pacifik. Genotipovi 3 i 6 su markeri naroda koji naseljavaju afrički kontinent kao i njihovih potomaka. Možda najbolji primer o povezanosti genotipova JCV i migraciji stanovništva predstavlja distribucija JCV genotipova u Novom svetu. Naime, današnju Ameriku najvećim delom naseljavaju potomci Evropljana, naroda Azije i Afrike. Istočnu obalu Amerike su uglavnom naselili Evropljani tako da su među njihovim potomcima genotipovi 1 i 4 dominantni. Narodi Azije su prelaskom preko Beringovog moreuza naselili zapadnu obalu Amerike, i sa sobom doneli subgenotip 2A i 7 koji je karakteristika populacije Amerike koja vodi poreklo iz Azije. Afroamerikanci koji naseljavaju Novi svet nose genotipove svojih predaka tj. naroda Afrike (genotipovi 3 i 6).



Slika 6. Geografska distribucija JCV

Kroz istoriju narodi Balkana nalaze se na raskrsnici puteva istoka i zapada i izložen su uticaju različitih etničkih grupa. Današnji Srbi koji vode poreko od južnih Slovena, koji etnički i lingvistički pripadaju Indoevropskom narodu, izmešali su se sa starosedocima Balkana (Paleo populacijom) prilikom dolaska na Balkan u šestom veku. Imajući u vidu istoriju srpskog naroda kao i koevoluciju ljudi i JCV može se

očekivati da se evropski, evroazijski i indijski tipovi JCV otkriju među stanovništvom Srbije.

1.7.3. Klinički značaj određivanja subgrupa BKV i genotipova JCV

Smatra se da zbog varijacija u aminokiselinskom sastavu VP1 proteina pojedini genotipovi JCV imaju veću sposobnost da izazovu litičku infekciju u permisivnim ćelijama i tako dovedu do nastanka PML. Nekoliko studija je pokazalo povezanost između JCV genotipa 2, pre svega subtipa 2B, i nastanka PML kod AIDS pacijenata. Zbog epidemije AIDS-a u svetu i sve češće upotrebe imunosupresivnih lekova, određivanje genotipova JCV ima i kliničko-prognostički značaj upravo zbog povezanosti genotipova i nastanka PML (Ferrante i sar., 2001., Zanotta i sar., 2013.). Genotipizacija JCV izolata kod imunosuprimiranih može poslužiti za izdvajanje pacijenata koji nose "nepovoljniji" genotip za nastanak PML kako bi se modulacijom imunosupresivne terapije kod njih smanjila replikacija virusa i sledstvena litička infekcija.

BKV-udružena oboljenja predstavljaju značajan medicinski problem u svetu, pre svega u sve brojnijoj grupi imunosuprimiranih pacijenata. Ipak, još uvek ne postoje jasni dokazi o povezanosti određenog BKV genotipa sa većom verovatnoćom nastanka BKV-udruženih oboljenja.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Planom istraživanja određeni su sledeći ciljevi:

- Odrediti prevalencu izlučivanja BKV i JCV u urinu HIV-inficiranih pacijenata i pacijenata kontrolne grupe i ispitati povezanost stepena imunodeficijencije i virurije u grupi HIV-inficiranih pacijenata

- U obe grupe pacijenata odrediti strukturu NCRR BKV i JCV i identifikovati prisustvo tačkastih mutacija, delecija i duplikacija u okviru NCRR

- Filogenetskom analizom VP1 regiona odrediti genotipove i subtipove JCV i BKV u obe grupe pacijenata i utvrditi da li postoji razlika u distribuciji genotipova

- Ispitati moguću povezanost prisustva BKV i JCV u urinu HIV-inficiranih pacijenata sa demografskim, virusološkim i citološkim parametrima kao i sa stadijumima bolesti i vrstom primenjene terapije

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanja predviđeno temom ove doktorske disertacije obavljeno je u periodu 2011. do 2014. godine u:

1. Laboratoriji za virusologiju, Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Klinici za infektivne i tropske bolesti, Kliničkog Centra Srbije

3.1. Ispitanici

Prvu grupu činilo je 114 neselektovanih, konsekutivnih HIV inficiranih pacijenata, uzrasta iznad 18. godina, koji su lečeni na Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog centra Srbije. Osamdeset i pet pacijenata su bili muškarci (74,65%), a 29 žene (25,4%). Starost ispitivanih pacijenata se kretala od 23 do 70 godina (prosečna starost 44.1 ± 10.7).

Svih 114 HIV-inficiranih pacijenata su podeljeni u grupe prema poslednjem klasifikacionom sistemu infekcije HIV-om Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. Centers for Disease Control and Prevention) iz Atlante, SAD (CDC, 2008.). Ovaj sistem vrši klasifikaciju na osnovu prisustva specifičnih HIV-udruženih oboljenja i broja CD4+ T limfocita. Pacijenti su na osnovu prisustva HIV-udruženih oboljenja podeljeni u tri kliničke kategorije: A, B i C. Svaka od ovih kliničkih kategorija je dalje podeljena, na osnovu broja CD4+ T limfocita, na tri subkategorije (A1-A3, B1-B3, C1-C3)(Tabela 1.). Kategorije A1-A3 obuhvataju klinički asimptomatsku HIV infekciju. Kategorije B1-B3 obuhvataju osobe sa neurološkim manifestacijam HIV infekcije i oportunističkim infekcijama koje nisu kriterijum za AIDS. Kategorije C1-C3 podrazumevaju „AIDS indikativne bolesti“.

Na osnovu broja CD4+ T limfocita pacijenti su podeljeni u tri kategorije: I, II i III. U kategoriju I spadaju pacijenti sa ukupnim brojem CD4+ T limfocita ≥ 500 ; u kategoriju II su svrstani pacijenti sa brojem CD4+ T limfocita između 201-499, dok pacijenti sa CD4+ćelijama ≤ 200 spadaju u kategoriju III (Tabela 1.).

U ovom istraživanju 36,8% HIV-inficiranih pacijenata je pripadalo A kliničkoj kategoriji prema CDC klasifikaciji, 23,7% kategoriji B i 39,5% kliničkoj kategoriji C.

Na osnovu broja CD4+ ćelija po ml krvi, 7% HIV-inficiranih pacijenata pripadalo je kategoriji I, 35,1% kategoriji II i 57,9% kategoriji III.

Srednja vrednost broja CD4+ ćelija za CDC kliničke kategorije A,B i C iznose $285,4 \pm 173,9$; $213,8 \pm 187,2$ i $90,1 \pm 83,8$ ćelija u mm^3 krvi.

Svi HIV-inficirani pacijenti uključeni u ovo istraživanje su bili na visokoj aktivnoj antiretrovirusnoj terapiji (HAART): 98% njih je lečeno lamivudinom, 78% abakavirom, 74,6% efavirenzinom, 58% zidovudinom, 55,3% didanozinom, 42,5% lopinavirom, 30,7% nevirapinom, 29,8% stavudinom, i ostatak je lečen sa etravirinom, sakvinavirom, indinavirom i nelfinavirom u različitim kombinacijama.

Tabela 1. Klasifikacioni sistem za HIV infekciju prema kriterijumima CDC-a

Kategorije prema broju CD4+ ćelija/mm ³	KLINIČKE KATEGORIJE		
	A	B	C
I ≥ 500	A1	B1	C1*
II 201-499	A2	B2	C2*
III ≤ 200	A3*	B3*	C3*

*Svi pacijenti koji spadaju u kategorije A3, B3 i C1-C3 se smatraju obolelim od AIDS-a, bilo prema kriterijumima za dijagnozu AIDS-a, bilo na osnovi broja CD4+ T limofocita < 200/mm³

Drugu kontrolnu grupu činilo je 120 uzastopnih pacijenata koji su se javili u prijemnu ambulantu Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu radi rutinske analize urina. Pedeset i šest pacijenata su bili muškarci (46,7%), a 64 žene (53,3%). Uslovi za isključivanje ispitanika iz ove grupe bili su trudnoća, bilo koja maligna bolest ili maligni tumor, upotreba imunosupresivnih lekova, HIV infekcija kao i želja ispitanika da ne učestvuje u studiji.

Broj ispitanika u obe grupe određen je na osnovu ukupnog broja HIV inficiranih pacijenata koji su se lečeli i kontrolisali odnosno na osnovu ukupnog broja pacijenata koji su dolazili radi rutinske analize urina u gore pomenutim

ustanovama u jednogodišnjem periodu koji je prethodio istraživanju. Svaki od ispitanika je detaljno obavešten o cilju studije i dao je pisani informisani pristanak za učešće u ovoj studiji.

3.2. Klinički uzorci

Ispitanicima uključenim u istraživanje, u prijemnim ambulancama gore pomenutih ustanova je uziman po jedan uzorak urina (10-20ml) uz poštovanje pravila za uzimanje urina za mikrobiološka ispitivanja. Zatim su uzorci, poštujući principe dobre laboratorijske prakse, transportovani do Laboratorije za virusologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu radi dalje obrade i analize.

Deset mililitara urina je centrifugirano 20 minuta na 3000 x g. Sediment je zatim resuspendovan u 5ml sterilnog fiziološkog rastvora (engl. sterile phosphate-buffered saline – PBS) i ponovo centrifugiran. Supernatant je odliven, a sediment je automatskom pipetom izdvojen u količini od 200 μ l i zamrzavan na -70°C do dalje obrade. Iz ovako pripremljenih uzoraka izolovana je virusna DNK.

3.3. Metodologija

3.3.1. Izolovanje virusne DNK

Za izolovanje virusne DNK iz uzorka urina, korišćen je komercijalni kit QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemačka), prema uputstvu proizvođača:

- U prvom koraku u plastičnu epruvetu od 1.5ml sa 200 μ l uzorka dodato je 200 μ l AL pufera i 20 μ l enzima proteinaze K. Zatim je smeša izmešana vorteksovanjem i inkubirana na 56°C 10 minuta. U ovoj fazi pod dejstvom deterdženata iz AL pufera i proteinaze K dolazi do lize ćelijskih membrana, membrana organela kao i jedarnih membrana i denaturacije proteina u cilju oslobađanja DNK.
- Sledeći korak je podrazumevao dodavanje 200 μ l 96-100% etanola u predhodno lizirani uzorak. Zatim je smeša alkohola i liziranog uzorka sipana u QIAamp Mini kolonu koja se nalazi u odgovarajućoj tubici i izvršeno je centrifugiranje. U etanolu se sav ćelijski debris rastvori, jedino se ne rastvara DNK, već dolazi do precipitacije i vezivanja DNK za silicijumsku membranu kolone.
- Zatim su sledila dva koraka ispiranja DNK vezane za membranu kolone, pomoću pufera za ispiranje (AW1 i AW2). Cilj je bio da se DNK dodatno prečisti od zaostalog etanola i ćelijskog debrisa.
- Poslednji korak podrazumevao je dodavanje AE pufera (pufera za eluciju) i inkubaciju od 1 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugiranje pri čemu se na kraju dobija filtrat koji sadrži izolovanu DNK. Količina filtrata zavisila je od količine AE pufera koji je dodat. U cilju dobijanja koncentrovanog uzorka DNK dodavano je samo 30 μ l AE pufera.

Dobijena izolovana DNK je korišćena za seminested i nested PCR-metode.

3.3.2. Dokazivanje JCV u urinu

Za dokazivanje prisustva JC virusa u urinu vršeno je umnožavanje dva regiona JCV genoma:

- deo VP1 gena- između nukleotida 1769-2263 i,
- deo NCRR –između nukleotida 5041-310.

3.3.2.1. Umnožavanje VP1 gena JCV seminested-PCR metodom

Umnožavanje fragmenta dužine 495-nt VP1 gena vršeno je seminested-PCR metodom. Prajmeri P13 i M5 korišćeni su za prvi krug PCR-a, dok su prajmeri JLP1 i M5 korišćeni u drugom krugu (Tabela 2.).

Tabela2. Prajmeri korišćeni za umnožavanje fragmenta JCV VP1 gena

Prajmer	Sekvenca (5' - 3')	Nukleotidna pozicija u genomu JCV	Referenca
P13	ttcactaccaatctaaatgagg	1725 - 1748	Lafon i sar. (1998)
M5	gtttgtaaacaatgccacagacatc	2263 - 2240	Lafon i sar. (1998)
JLP1	ctcatgtggaggctgtgact	1769 - 1790	Agostini i sar. (1996)

Reakciona smeša, zapremine 25 μ l, prvog kruga PCR sadržala je:

- ❖ 12,5 μ l 2x Qiagen TaqPCR Maser Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- ❖ po 1 μ l P13 i M5 prajmera koncentracije 25 μ M (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, SAD),
- ❖ 5 μ l biološke vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i
- ❖ 5 μ l DNK izolovane iz uzorka urina

Reakciona smeša, zapremine 25 μ l, drugog kruga PCR sadržala je:

- ❖ 12,5 μ l 2x Qiagen TaqPCR Maser Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- ❖ po 1 μ l JLP1 i M5 prajmera koncentracije 25 μ M (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, SAD),
- ❖ 8 μ l biološke vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i
- ❖ 2,5 μ l PCR produkta prvog kruga PCR.

Umnožavanje i prvog i drugog kruga vršeno je u PCR termosajkleru „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), prema sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 95°C 5 minuta zatim 40 ciklusa 95°C - 30 sek, 60°C - 40 sek, 72°C - 1 min i zatim finalna elongacija na 72°C 10 minuta.

3.3.2.2. Umnožavanje NCRR JCV nested-PCR metodom

Umnožavanje dela JCV nekodirajućeg regulatornog regiona (NCRR) dužine 400-nt vršeno je nested-PCR metodom, korišćenjem A1 i A2 kao spoljašnjih prajmera i B1 i B3 kao unutrašnjih prajmera (Tabela 3.).

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za umnožavanje dela JCV NCRR

Prajmer	Sekvenca (5' - 3')	Nukleotidna pozicija u genomu JCV	Referenca
A1	tccatggattcctccctattcagcactttgt	4979 - 5009	Sugimoto i sar. (1998)
A2	ttacttacctatgtagcttt	500 - 481	Sugimoto i sar. (1998)
B1	gaaaaaaagggaaaaacaaggg	5041 - 5062	Sugimoto i sar. (1998)
B3	cagaagccttacgtgacagctgg	310 - 288	Sugimoto i sar. (1998)

Reakciona smeša, zapremine 25 μ l, prvog kruga PCR sadržala je:

- ❖ 12,5 μ l 2x Qiagen TaqPCR Maser Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- ❖ po 1 μ l A1 i A2 prajmera koncentracije 25 μ M (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, SAD),
- ❖ 5 μ l biološke vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i
- ❖ 5 μ l DNK izolovane iz uzorka urina

Reakciona smeša, zapremine 25 μ l, drugog kruga PCR sadržala je:

- ❖ 12,5 μ l 2x Qiagen TaqPCR Maser Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- ❖ po 1 μ l B1 i B3 prajmera koncentracije 25 μ M (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, SAD),
- ❖ 8 μ l biološke vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i
- ❖ 2,5 μ l PCR produkta prvog kruga PCR.

Umnožavanje i prvog i drugog kruga vršeno je u PCR termosajkleru „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), prema sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 95°C 5 minuta zatim 40 ciklusa 95°C - 30 sek, 55°C - 1 min, 72°C - 1 min i zatim finalna ekstenzija na 72°C 10 minuta.

Po pravilu, uz uzorke u oba kruga PCR i za VP1 gen i za NCRR, pripremane su i pozitivna kontrola (sa JCV DNK) i negativna kontrola (bez JCV DNK, dodavanjem vode umesto DNK) radi kontrole ispravnosti same procedure i utvrđivanje eventualne kontaminacije.

3.3.3. Dokazivanje BKV u urinu

Za dokazivanje prisustva BK virusa u urinu vršeno je umnožavanje dva regiona BKV genoma:

- deo VP1 gena- između nukleotida 1672-1962 i,
- deo NCRR -između nukleotida 2-429.

3.3.3.1. Umnožavanje VP1 gena BKV seminested-PCR metodom

Za umnožavanje fragmenata dužine 290-nt u okviru VP1 gena korišćena je seminested-PCR metoda. Prajmeri BKV1 i BKV2 korišćeni su za prvi krug PCR-a, dok su prajemri BKV2 i BKV3 korišćeni u drugom krugu (Tabela 4.).

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za umnožavanje fragmenta BKV VP1 gena

Prajmer	Sekvenca (5' - 3')	Nukleotidna	Referenca
		pozicija u genomu BKV	
BKV1	cgtgcaagtgcctaaaactac	1626 - 1645	Zabna i sar. (2011)
BKV2	gacctgcatgaaggtaag	1962 - 1943	Zabna i sar. (2011)
BKV3	gaagttaaaactggggtagatgc	1672 - 1694	Zabna i sar. (2011)

Reakciona smeša, zapremine 25 μ l, prvog kruga PCR sadržala je:

- ❖ 12,5 μ l 2x Qiagen TaqPCR Maser Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- ❖ po 1 μ l BKV1 i BKV2 prajmera koncentracije 25 μ M (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, SAD),
- ❖ 5 μ l biološke vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i
- ❖ 5 μ l DNK izolovane iz uzorka urina

Reakciona smeša, zapremine 25 μ l, drugog kruga PCR sadržala je:

- ❖ 12,5 μ l 2x Qiagen TaqPCR Maser Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- ❖ po 1 μ l BKV2 i BKV3 prajmera koncentracije 25 μ M (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, SAD),
- ❖ 8 μ l biološke vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i
- ❖ 2,5 μ l PCR produkta prvog kruga PCR.

Umnožavanje i prvog i drugog kruga vršeno je u PCR termosajkleru „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), prema sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 95°C 3 minuta zatim 40 ciklusa 95°C - 30 sek, 60°C - 1 min, 72°C - 1 min i zatim finalna ekstenzija na 72°C 10 minuta.

3.3.3.2. Umnožavanje NCRR BKV nested-PCR metodom

Umnožavanje dela BKV nekodirajućeg regulatornog regiona (NCRR) dužine 430-nt vršena je nested-PCR metodom, korišćenjem BKTT5 i BKTT6 kao spoljašnjih prajmera i BKTT7 i BKTT8 kao unutrašnjih prajmera (Tabela 5.).

Tabela 5. Prajmeri korišćeni za umnožavanje dela BK NCRR

Prajmer	Sekvenca (5' - 3')	Nukleotidna pozicija u genomu BKV	Referenca
BKTT5	gagctccatggattcttc	5115 - 5132	Gosert i sar. (2008)
BKTT6	ccagtccaggtttacca	446 - 429	Gosert i sar. (2008)
BKTT7	ccctgtaagaactttatccatt	5132 - 2	Gosert i sar. (2008)
BKTT8	aacttcactgaagcttgcgt	429 - 408	Gosert i sar. (2008)

Reakciona smeša, zapremine 25µl, prvog kruga PCR sadržala je:

- ❖ 12,5µl 2x Qiagen TaqPCR Maser Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- ❖ po 1 µl BKTT5 i BKTT6 prajmera koncentracije 25µM (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, SAD),

- ❖ 5 µl biološke vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i
- ❖ 5 µl DNK izolovane iz uzorka urina

Reakciona smeša, zapremine 25µl, drugog kruga PCR sadržala je:

- ❖ 12,5µl 2x Qiagen TaqPCR Master Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka),
- ❖ po 1 µl BKTT7 i BKTT8 prajmera koncentracije 25µM (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, SAD),
- ❖ 8 µl biološke vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i
- ❖ 2,5 µl PCR produkta prvog kruga PCR.

Umnožavanje i prvog i drugog kruga vršeno je u PCR termosajkleru „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), prema sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 95°C 3 minuta zatim 40 ciklusa 95°C - 30 sek, 60°C - 1 min, 72°C - 1 min i zatim finalna ekstenzija na 72°C 10 minuta.

Po pravilu, uz uzorke u oba kruga PCR i za VP1 i za NCRR, pripremane su i pozitivna kontrola (sa BKV DNK) i negativna kontrola (bez BKV DNK, dodavanjem vode umesto DNK) radi kontrole ispravnosti same procedure i utvrđivanje eventualne kontaminacije.

3.3.4. Analiza PCR produkta elektroforezom u agaroznom gelu

Analiza PCR produkta odgovarajuće dužine vršena je elektroforezom u 2% agaroznom gelu. Osnovni princip ove metode zasnovan je na činjenici da čestice različitog naelektrisanja i različite mase, pod dejstvom električnog polja za isto vreme prelaze različite putanje u agaroznom gelu. Za pravljenje gelova i elektroforezu korišćen je pufer Tris Acetat EDTA (40 mM Tris Acetat, 2 mM EDTA,

pH 8,5; TA). Agarozni gel 2% koncentracije je pravljen tako što je 2g agaroze rastvoreno u 100ml TAE pufera zagrevanjem do tačke topljena, zatim je razlivan u kalupe koji su određivali dimenziju gela. Po hlađenju agaroze, u formirane bunarčice u gelu su sipani uzorci. Pre nanošenja na gel uzorci su pomešani sa puferom za punjenje (engl. loading buffer-LB). LB (250 mg/ml saharoze i 2,5 mg/ml bromfenol plavog) omogućava vizuelizaciju uzorka na gelu kao i praćenje njihovog kretanja kroz gel. U bunarčice je unošeno po 8 µl seminested/nested PCR produkta pomešanih sa 2 µl pufera za punjenje. Elektroforeza je sprovedena uključivanjem u strujno kolo pri naponu od 100V u TAE puferu.

Vizuelizacija DNK izvršena je pod UV svetlom uz pomoć etidijum bromida (EtBr 25 µg/ml, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka). Etidijum bromid je interkalirajući agens koji ima sposobnost da se veže za vodonične veze u dvoančanom molekulu DNK. Pod dejstvom UV svetla etidijum bromid svetli, tako da se DNK molekuli u koje je ugrađen etidijum bromid raspoznaju kao svetle trake na gelu. Etidijum bromid je dodavan u agarozni gel u finalnoj koncentraciji od 0,2 µg/ml.

U svaki gel u jedan od bunarčića dodovani su i markeri (engl. ladder) od 100-1000 bp (DNK Standard 100bp - Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka). Markeri predstavljaju DNK isečenu restrikcionim enzimima na više fragmenata poznate dužine i služe za identifikaciju PCR produkata, poređenjem svoje veličine sa veličinom ispitivanih PCR produkata.

Pozitivnim nalazima smatralo se prisustvo sledećih produkata:

- ✓ 495 bp za JCV VP1
- ✓ 400 bp za JCV NCRR
- ✓ 290 bp za BKV VP1
- ✓ 430 bp za BKV NCRR

Pozitivni uzorci su čuvani na -20°C do dalje obrade tj. DNK sekvenciranja.

3.3.5. DNK sekvenciranje

DNK sekvenciranje tj. određivanje redosleda nukleotida u DNK molekulu, korišćeno je za određivanje genotipova i subgenotipova JCV, subtipova i subgrupa BKV, nukleotidnih izmena i mutacija u VP1 genu BKV i JCV, kao i strukture nekodirajućih regiona BKV i JCV.

U ovom istraživanju korišćen je Sanger-ov metoda sekvenciranja tzv. metoda završetka lanca (Sanger i sar., 1997.). Ova metoda se zasniva na upotrebi fluorescento obeleženih didezoksiribonukleotida koji kada se ugrade u DNK lanac sprečavaju dalju sintezu DNK lanca. Postupak DNK sekvenciranja čine četiri koraka:

1. Prečišćavanje PCR produkata
2. Reakcija cikličnog sekvenciranja (engl. cycle sequencing)
3. Prečišćavanje produkata cikličnog sekvenciranja
4. Kapilarna elektroforeza u automatskom sekvencioneru

Dobijene DNK sekvence su analizirane upotrebom različitih bioinformatičkih programa.

3.3.5.1. Prečišćavanje PCR produkta

PCR produkti su prečišćavani upotrebom QIAGEN MiniElute Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Nemačka), po uputstvu proizvođača uz određene modifikacije. Postupak je podrazumevao sledeće korake:

- Prvo, 5 μ l PCR produkta je mešano sa 50 μ l PBI pufera. Zatim je smeša naneta na MiniElute kolonu koja se nalazi u odgovarajućoj tubici i vršeno je centrifugiranje 1 minut na 18 000 x g. PBI je vezujući pufer (engl.binding buffer) koji ima ulogu da veže umnoženu DNK iz PCR produkta za membranu MiniElute kolone, dok se centrifugiranjem odstranjuje sav višak prajmera, nukleotida i enzima.

- Sledeći korak podrazumevao je upotrebu PE pufera (pufera za ispiranje). Centrifugiranjem i upotrebom ovog pufera odstranjuju se soli iz PBI pufera, a još jedno dodatno centrifugiranje odstranjuje sav zaostali PE pufer. PE pufer sadrži alkohol (etanol) i jako je bitno odstraniti ga u potpunosti dodatnim centrifugiranjem jer alkohol može da inhibira reakciju cikličnog sekvenciranja.
- Poslednji korak podrazumevao je dodavanje 10 μ l EB pufera (pufera za eluciju) i inkubaciju od 1 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugiranje pri čemu se dobija filtrat koji sadrži prečišćenu DNK.

Filtrat se koristi za sledeći korak, za reakciju cikličnog sekvenciranja.

3.3.5.2. Reakcija cikličnog sekvenciranja

Za reakciju cikličnog sekvenciranja korišćeni su Big Dye v3.1 Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) i odgovarajući unutrašnji prajmeri za VP1 gen ili NCRR JCV i BKV (Tabela 6.). Pošto se u svakoj reakciji cikličnog sekvenciranja koristi samo po jedan prajmer, za svaki izolat su rađene po dve reakcije, svaka za sekvenciranje po jednog lanca DNK.

Reakciona smeša, ukupne zapremine 10 μ l, reakcije cikličnog sekvenciranja sadržala je:

- ❖ 2 μ l Big Dye Terminator Mix-a (DNK polimeraza, smeša deoksi i fluroscento obeleženih dideoksiribunuklotida)
- ❖ 2 μ l Big Dye Terminator pufera
- ❖ 1 μ l jednog unutrašnjeg prajmera
- ❖ 4 μ l biološke vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka)
- ❖ 1 μ l prečićenog PCR produkta.

Tabela 6. Prajmeri korišćeni za ciklično sekvenciranje VP1 gena i NCRR JCV i BKV
izolata

Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	Region genoma virusa koji prajmeri ograničavaju	Referenca
M5	gtttgtaaacatgccacagacatc	JCV VP1 (nt 1769-2263)	Lafon i sar. (1998)
JLP1	ctcatgtggaggctgtgact		Agostini i sar. (1996)
B1	gaaaaaaagggaaaaacaaggg	JCV NCRR (nt 5041-310)	Sugimoto i sar. (1998)
B3	cagaagccttacgtgacagctgc		Sugimoto i sar. (1998)
BKV2	gaccctgcatgaaggtaag	BKV VP1 (nt 1672-1962)	Zalona i sar. (2011)
BKV3	gaagttaaaactgggtagatgc		Zalona i sar. (2011)
BKTT7	ccagtccaggtttacca	BKV NCRR (nt 2-429)	Gosert i sar. (2008)
BKTT8	ccctgtaagaactttatccattt		Gosert i sar. (2008)

Za sve gore navedene reakcije cikličnog sekvenciranja umnožavanje je vršeno u PCR termosajkleru „Master Cycle Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) prema sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 95°C 1 minuta zatim 40 ciklusa 96°C - 10 sek, 50°C – 5 sec, 60°C – 4 min.

3.3.5.3. Prečišćavanje produkta cikličnog sekvenciranja

Produkti cikličnog sekvenciranja su prečišćavani 75% izopropanolom. Postupak su činili sledeći koraci:

- u svaku tubicu u kojoj su se nalazili produkti cikličnog sekvenciranja dodavan je sveže pripremljen 75% izopropanol u odnosu 1:4 i tubice su inkubirane 15 minuta u mraku
- posle inkubacije vršeno je centrifugiranje 45 minuta na 2000 x g
- posle centrifugiranja sledilo je odbacivanje supernatanta, okretanje tubica i dodatno centrifugiranje na 2 minuta 700 x g
- poslednji korak podrazumevao je sušenje otvorenih tubica u mraku

Ukoliko se nije odmah nastavljalo sa daljom procedurom tubice su zamrzavane na -20°C.

3.3.5.4. Kapilarna elektroforeza u automatskom sekvencioneru i analiza elektroferograma

Prečišćeni produkti cikličnog sekvenciranja su bili denaturisani pre započinjanja kapilarne elektroforeze. Denaturacija DNK je vršena hemijskim i fizičkim metodama. Hemijska metoda je podrazumevala dodavanje po 20µl Hi-Di TM formamida (Applied Biosystems, Foster City, SAD) u svaku tubicu sa prečišćenim produktima cikličnog sekvenciranja. Dodatna denaturacija vršena je fizičkom metodom-toplotom prema sledećem protokolu: 95°C - 2 minuta zatim 4°C – 2 min u PCR termosajklu „Master Cycle Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

Kapilarna elektroforeza vršena je u automatskom sekvencioneru (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, SAD). Analiza sekvenci rađena je u Sequence Analysis 5.1 softveru (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Elektroferogram tj. grafički zapis redosleda nukleotida, za svaku dobijenu sekvencu je

pojedinačno pregledan kako bi se utvrdio kvalitet sekvence i ručno su ispravljene eventualno nastale greške u očitavanju redosleda nukleotida. Svaki uzorak je imao po dva elektroferograma za analizu pošto je sekvenciranje vršeno u oba pravca za svaki lanac DNK posebno. Ove dve sekvence su upoređene i spojene u jednu koja je korišćena za dalju analizu.

3.3.6. Analiza DNK sekvenci

3.3.6.1. Određivanje genotipova i subgenotipova JCV

Za određivanje genotipova i subgenotipova JCV korišćena je 495-nt duga sekvenca VP1 gena (nt 1769-2263) svakog od izolata, u okviru koga se nalazi 215-nt dug „typing region“ (region sa polimorfizmima koji služi za genotipizaciju JCV izolata). Određivanje genotipova vršeno je manuelno inspekcijom u BioEdit 7.0.1 (Hall, 1999.) programu poređenjem dobijenih sekvenci i referentnih sekvenci za sve poznate genotipove iz DDBJ/EMBL/GenBank Internet baze podataka, a potvrda je izvršena filogenetskom analizom. U BioEdit 7.0.1 programu svaka sekvenca izolata posebno je poređena sa referentnom sekvencom. Zatim su manuelnom inspekcijom duž čitave sekvence izolata identifikovani polimorfizmi i na osnovu njihove nukleotidne pozicije i šeme za genotipizaciju (Šema 8.) određivani genotipovi i subgenotipovi JCV.

Nukleotidne pozicije u JCV Mad-1 genomu (J02227)																			Pristupni broj u GenBank
JCV tip	1790	1804	1818	1837	1843	1850	1869	1870	1933	1936	1940	1959	1993	2011	2177	2224	2227		
1A	T	T	G	T	G	A	G	G	G	G	C	A	C	C	T	A	C	J02227	
1B	T	T	G	T	T	G	G	G	G	G	G	A	C	C	T	A	C	AF015527	
2A	T	T	C	T	T	A	G	A	G	G	G	A	A	A	C	G	T	AF030085	
2B	T	T	C	C	T	G	G	A	A	A	G	A	A	C	C	G	T	M20322	
2C	T	T	C	T	T	G	G	A	G	A	G	A	A	A	C	G	T	AF015534	
2D	T	T	C	T	T	G	G	A	G	G	G	A	A	A	C	G	T	AF015536	
3	T	C	C	T	T	A	C	A	G	G	G	C	A	A	C	G	T	U73500	
4	T	T	C	T	G	G	C	A	G	G	G	C	C	C	T	A	T	AF015528	
6	C	T	C	T	T	A	G	G	A	G	G	C	A	A	C	G	T	AF015537	
7A	T	T	C	T	T	A	G	A	G	G	G	A	A	A	C	G	T	U61771	
7B	T	T	A	T	T	A	G	A	G	G	G	A	A	A	C	G	T		

Šema 8. Algoritam za genotipizaciju JCV

Potvrda ovako određenih genotipova izvršena je pravljenjem filogenetskog stabla koje predstavlja zlatni standard za genotipizaciju JCV. Filogenetsko stablo napravljeno je u PhyML 3.0 programskom paketu, korišćenjem metoda opisanih u poglavlju 3.3.8.7. Filogenetska analiza.

3.3.6.2. Otkrivanje nukleotidnih izmena i mutacija u VP1 genu JCV

Nukleotidne izmene i mutacije u VP1 genu ispitivane su u 495-nt dugoj sekvenci, svakog od izolata JCV. Prvo su napravljeni setovi poravnanih sekvenci upotrebom CLUSTAL W algoritma implementiranog u MEGA 5.1 programski paket (Tamura i sar., 2011). Svaki od setova se sastojao od sekvenci izolata istog genotipa zajedno sa referentnom sekvencom za dati genotip. Zatim je svaki od setova poravnanih sekvenci ponaosob analiziran u MEGA 5.1 programskom paketu, radi utvrđivanja prisustva sinonimnih i nesinonimnih nukleotidnih izmena. Prisustvo eventualnih mutacija otkrivano je po prevođenju DNK sekvence u AK sekvencu u istom programskom paketu.

3.3.6.3. Utvrđivanje strukture i otkrivanje nukleotidnih izmena u NCRR JCV

Za utvrđivanje strukture NCRR JCV korišćena je 400-nt duga sekvenca regulatornog regiona svakog od izolata. Dobijene sekvence NCRR zajedno sa referentnom arhetip varijantom JCV CY analizirane su primenom CLUSTAL W algoritma implementiranog u MEGA 5.1 programski paket (Tamura i sar., 2011), a u cilju poravnavanja sekvenci. Zatim je u BioEdit 7.0.1 programu na osnovu seta poravnanih sekvenci utvrđena struktura NCRR JCV (arhetip ili rearanžirana varijanta).

Prisustvo sinonimnih i nesinonimnih nukleotidnih izmena utvrđeno je poređenjem posebno svake sekvence izolata sa referentnom arhetip varijantom JCV u MEGA 5.1 programskom paketu (Tamura i sar., 2011).

3.3.6.4. Određivanje subtipova i subgrupa BKV

Sekvenca VP1 gena dužine 290-nt (1672-1962) svakog od izolata korišćena je za određivanje subgrupa i subtipova BKV. Subtipovi i subgrupe BKV utvrđeni su filogenetskom analizom na osnovu položaja sekvenci u filogenetskom stablu, korišćenjem metoda opisanih u poglavlju 3.3.8.7. Filogenetska analiza. Preliminarna identifikacija BKV subtipova i subgrupa obavljena je korišćenjem BLAST programa u okviru NCBI baze podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.3.6.5. Otkrivanje nukleotidnih izmena i mutacija u VP1 genu BKV

Sekvenca duga 290-nt svakog od izolata korišćena je za otkrivanje nukleotidnih izmena i mutacija u VP1 genu BKV. Sve sekvence izolata BKV su na osnovu subgrupa podeljeni u odgovarajuće setove. Svakom setu dodeljena je referentna sekvenca za odgovarajuću subgrupu BKV, i zatim je izvršeno

poravnavanje setova sekvenci upotrebom CLUSTAL W algoritma implementiranog u MEGA 5.1 programski paket (Tamura i sar., 2011). Radi utvrđivanja prisustva sinonimnih i nesinonimnih nukleotidnih izmena setovi poravnanih sekvenci su analizirani u MEGA 5.1 programskom paketu.

Aminokiselinske substitucije su otkrivane prevođenjem DNK sekvenci u AK sekvencu svakog od seta poravnanih sekvenci.

3.3.6.6. Utvrđivanje strukture i otkrivanje nukleotidnih izmena u NCRR BKV

Sekvenca NCRR dužine 430-nt svakog od izolata, korišćena je za utvrđivanje strukture regulatornog regiona BKV. Set poravnanih sekvenci koji se sastojao od dobijenih NCRR sekvenci i referentne arhetip varijante BKV ww napravljen je upotrebom CLUSTAL W algoritma implementiranog u MEGA 5.1 programski paket (Tamura i sar., 2011). Dalja analiza seta poravnanih sekvenci, u cilju otkrivanja delecija, duplikacija, i insercija rađena je u BioEdit 7.0.1 programskom paketu radi utvrđivanja varijante NCRR BKV (arhetip ili rearanžirana).

U cilju otkrivanja sinonimnih i nesinonimnih nukleotidnih izmena svaka sekvence izolata posebno je poređena sa referentnom arhetip varijantom BKV ww u MEGA 5.1 programskom paketu.

3.3.6.7. Filogenetska analiza

U ovom istraživanju napravljena su dva filogenetska stabla, za VP1 regione JCV i BKV. Dobijene sekvence VP1 regiona BKV i JCV zajedno sa referentnim sekvencama koje odgovaraju ispitivanim regionima analizirane su primenom CLUSTAL W algoritma implementiranog u MEGA 5.1 programski paket, a u cilju poravnavanja sekvenci. Zatim je primenom jModeltest 0.0.1 (Posada, 2008.) na

setove poravnanih sekvenci za VP1 region BKV i JCV, utvrđen najbolji model evolucije za oba seta podataka, koji je korišćen u daljoj analizi. Na osnovu podataka iz jModeltesta 0.0.1, utvrđeno je da je najbolji model evolucije za VP1 region BKV HKY+G model, dok je za JCV, model HKY85 utvrđen kao model evolucije koji najbolje odgovara datom setu podataka. Na osnovu ovih modela, upotrebom algoritma maksimalne verovatnoće (engl. Maximum-likelihood) implementiranog u PhyML 3.0 programski paket (Guindon i Gascuel, 2003.) konstruisana su filogenetska stabla. „Bootstrep“ analiza urađena je u većem broju ponavljanja (1000) u cilju provere stabilnosti i izračunavanja statističke podrške topologiji stabla. Inicijalna inspekcija filogenetskih stabala konstruisanih u PhyML 3.0 programu obavljena je u FigTree 1.3.1 programskom paketu (Rambaut, 2010), a dodatno sređivanje i obeležavanje obavljeno je u MEGA 5.1 programskom paketu (Tamura i sar., 2011).

Za konstrukciju filogenetskih stabla korišćene su sledeće referentne sekvence iz DDBJ/EMBL/GenBank Internet baze podataka:

- ❖ Za BKV (navedeni su pristupni brojevi): NC001538, AB263926, AB211370, AB263918, AB263916, AB263920, M23122, AB211386, AB269869, AB269841, AB211390, AB211387, AB269834, AB269846, AB269830 i AB269833.
- ❖ Za JCV (navedeni su pristupni brojevi): J02227, AF015526, AF281160, AF15527, AF281599, AF015529, AF045530, AF015531, AF015532, AF015533, AF015535, AF015536, U73500, AF295731, AF295732, U73502, U73501, AF015528, AF015537 i U61771.

U cilju procene selekcionog pritiska, analiziran je odnos nesinonimnih (dN) i sinonimnih (dS) nukleotidnih izmena (dN/dS) upotrebom Synonymous Non-synonymous Analysis programa (SNAP) (<http://www.hiv.lanl.gov>). Odnos dN/dS veći od 1 ukazivao je na pozitivnu selekciju, manje od 1 na negativnu, a ukoliko je odnos jednak 1 to je označavalo neutralnu selekciju.

3.4. Statistička analiza dobijenih rezultata

Statistička analiza dobijenih rezultata urađena je u SPSS programu ver. 20.

Statistička analiza urađena je korišćenjem standardnih metoda deskriptivne i analitičke statistike.

Za podatke sa normalnom raspodelom, testiranje značajnosti razlike između dve grupe podataka korišćen je studentov T-test, a za više od dve grupe podataka parametarska ANOVA. Za utvrđivanje statistički značajne povezanosti korišćen je Pearson-ov koeficijent korelacije.

U slučaju da podaci nemaju normalnu raspodelu za procenu značajnosti razlike upotrebljen je Hi-kvadrat test ili Fisher-ov test i neparametarska ANOVA, a za procenu povezanosti Spearman-ov koeficijent korelacije.

U svim testovima statistički značajan nivo verovatnoće bio je $p < 0.05$.

4. REZULTATI

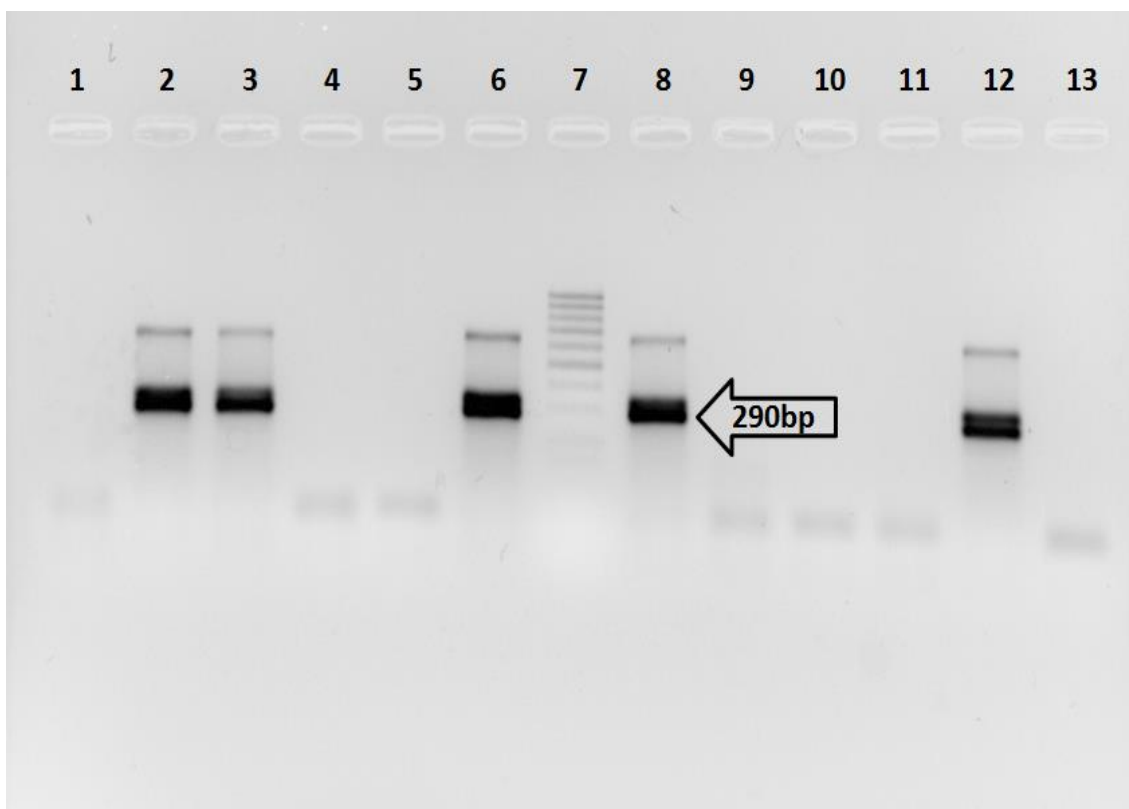
U toku trogodišnjeg istraživanja, prisustvo BKV i JCV ispitano je u ukupno 234 uzoraka urina dobijenih od 114 HIV-inficiranih pacijenata i 120 donora koji su činili kontrolnu grupu.

Dobijeni izolati BKV i JCV su korišćeni za određivanje genotipova, subgenotipova, subgrupa i subtipova, a detaljna analiza sekvenci omogućila je utrdivanje sinonimnih i nesinonimnih nukleotidnih izmena i mutacija u VP1 genu i NCRR BKV i JCV.

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

4.1. Učestalost BKV DNK u urinu

Prisustvo BKV u urinu dokazano je umnožavanjem fragmenta VP1 gena dužine 290-nt PCR metodom. Posle umnožavanja vršena je analiza PCR produkta gel elektroforezom. Prisustvo DNK fragmenta odgovarajuće veličine od 290-nt je bio dokaz uspešnog umnožavanja BKV DNK i prisustva virusa u urinu (Slika 7.).



Slika 7. Gel elektroforeza – Analiza PCR produkta za VP1 gen BKV
Kolone 1, 4-5, 9-11 negativni uzorci; 2-3, 6 i 8 pozitivni uzorci; 7-100bp standard;
12-pozitivna kontrola; 13-negativna kontrola

Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost
kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa

Rezultati prevalence BKV DNK u urinu prikazane su u tabeli 7 za obe grupe: HIV-inficirane pacijente i ispitanike kontrolne grupe.

Tabela 7. Učestalost BKV u urinu HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe i povezanost sa demografskim karakteristikama ispitanika

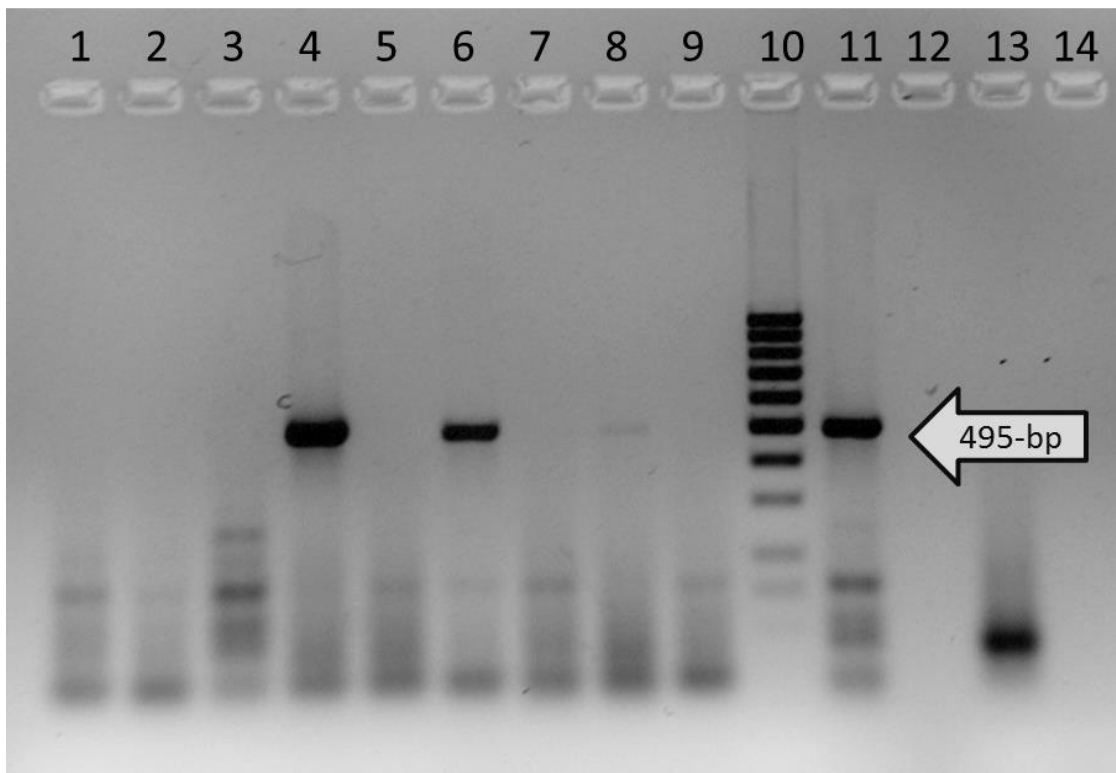
	Svi pacijenti ukupno (%)	Br. BKV pozitivnih/ukupno (%)	Br. BKV negativnih/ukupno (%)	P- vrednost
HIV-inficirani pacijenti (%)*	114 (100)	58/114 (50,8)*	56/114 (49,2)*	*p=0.0001
Muškarci, br. pacijenata/ukupno (%)	85/114 (74,6)	41/85 (48,2)	44/85 (51,8)	
Žene, br. pacijenata/ukupno (%)	29/114 (25,4)	17/29 (58,6)	12/29 (41,4)	NS
Starost, godine (prosečna starost±SD)	44,1±10,7	45,3±9,9	42,8±11,4	NS
Kategorije po godinama, br.pacijenata/ukupno (%)				
21-30	14/114 (12,3)	5/14 (35,7)	9/14 (64,3)	
31-40	34/114 (29,8)	16/34 (47,1)	18/34 (52,9)	
41-50	34/114 (29,8)	19/34 (55,9)	15/3 (44,1)	NS
51-60	25/114 (21,9)	15/25 (60)	10/25 (40)	
61-70	7/114 (6,2)	3/7 (42,8)	4/7 (57,2)	
Kontrolna grupa ispitanika (%)*	120 (100)	9/120 (7,5)*	111/120 (92,5)*	
Muškarci, br.ispitanika/ukupno (%)	56/120 (46,7)	5/56 (8,9)	51/56 (91,1)	
Žene, br.ispitanika/ukupno (%)	64/120 (53,3)	4/64 (6,3)	60/64 (93,7)	NS

Statistička analiza je pokazala da je BKV virurija mnogo češća kod HIV-inficiranih pacijenata ($p=0,0001$). Kod 50,8% HIV-inficiranih pacijenata u urinu je dokazano prisustvo BKV, dok je u kontrolnoj grupi BKV DNK umnožena kod 7,5% ispitanika.

Što se tiče polova, nije postojala statistički značajna razlika u prevalenci BKV u urinu između muškaraca i žena ($p=0,334$ u grupi HIV-inficiranih pacijenata; $p=0,578$ u kontrolnoj grupi ispitanika).

4.2. Učestalost JCV DNK u urinu

Umnožavanjem fragmenta VP1 kodirajućeg regiona JCV, dokazano je prisustvo JC virusa u uzorcima urina ispitanika. Prisustvo DNK fragmenata veličine 495-nt u gel elektroforezi smatralo se dokazom uspešnog umnožavanja JCV DNK i prisustva virusa u urinu (Slika 8.).



Slika 8. Gel elektroforeza - Analiza PCR produkta za VP1 gen JCV. Kolone 1-3, 5, 7 i 9 negativni uzorci; 4, 6 i 8 pozitivni uzorci; 10-100bp standard; 11-pozitivna kontrola; 13-negativna kontrola

Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost
kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa

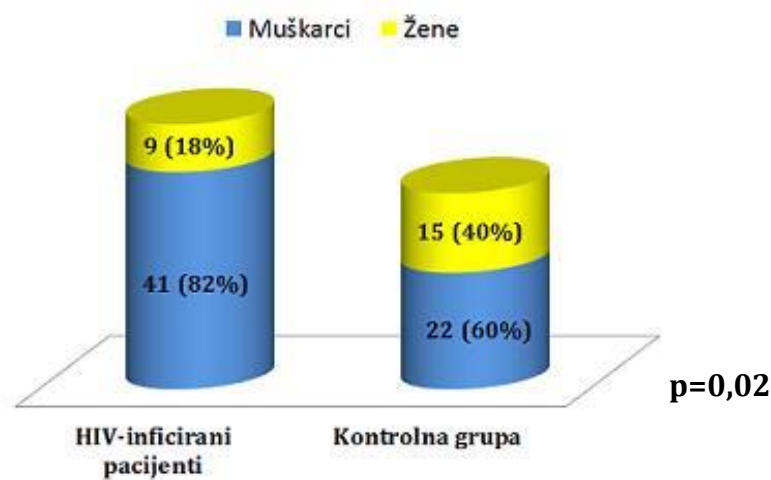
Rezultati prevalence JCV DNK u urinu prikazane su u tabeli 8 za obe grupe: HIV-inficirane pacijente i ispitanike kontrolne grupe.

Tabela 8. Učestalost JCV u urinu HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe i povezanost sa demografskim karakteristikama ispitanika

	Svi pacijenti ukupno (%)	Br. JCV pozitivnih/ukupno (%)	Br. JCV negativnih/ukupno (%)	P- vrednost
HIV-inficirani pacijenti (%)*	114 (100)	50/114 (43,8)*	64/114 (56,2)*	*p=0,039
Muškarci, br. pacijenata/ukupno (%)	85/114 (74,6)	41/85 (48,2)	44/85 (51,8)	
Žene, br. pacijenata/ukupno (%)	29/114 (25,4)	9/29 (31,1)	20/29 (68,9)	NS
Starost, godine (prosečna starost±SD)	44,1±10,7	45,9±10,7	42,9±10,5	NS
Kategorije po godinama, br.pacijenata/ukupno (%)				
21-30	14/114 (12,3)	5/14 (35,7)	9/14 (64,3)	
31-40	34/114 (29,8)	13/34 (38,2)	21/34 (61,8)	
41-50	34/114 (29,8)	14/34 (41,1)	20/34 (58,9)	NS
51-60	25/114 (21,9)	13/25 (52)	12/25 (48)	
61-70	7/114 (6,2)	5/7 (71,4)	2/7 (28,6)	
Kontrolna grupa, donori (%)*	120 (100)	37/120 (30,8)*	83/120 (69,2)*	
Muškarci, br. ispitanika/ukupno (%)	56/120 (46,7)	22/56 (39,3)	34/56 (60,7)	
Žene, br. ispitanika/ukupno (%)	64/120 (53,3)	15/64 (23,4)	49/64 (76,6)	

JCV virurija je češća kod HIV-inficiranih pacijenata, i utvrđena je statistički značajna razlika između HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe ($p=0,039$).

U obe grupe ispitanika, muškarci (82% HIV-inficiranih pacijenata; 60% ispitanika kontrolne grupe) su češće izlučivali JCV u urinu u odnosu na žene (18% HIV-inficiranih pacijentkinja; 40% ispitanica kontrolne grupe) (Grafikon 2.). Utvrđena je statistički značajna razlika u frekvenci izlučivanja JCV među muškaracima i ženama HIV-inficirane i kontrolne grupe ($p=0,020$).



Grafikon 2. Distribucija JCV pozitivnih izolata po polovima u ispitivanim grupama (broj izolata i procenat)

4.3. Ispitivanje učestalosti BKV i JCV virurije u odnosu na kliničke parametre kod HIV-inficiranih pacijenata

4.3.1. Ispitivanje učestalosti BKV i JCV virurije u odnosu na broj CD4+ ćelija

Da bi se ispitaio odnos između prisustva BKV i JCV virurije i stepena imunodeficijencije, svi HIV-inficirani pacijenti su podeljeni u tri grupe prema broju CD4+ ćelija: grupa I, ≥ 500 ; grupa II, 201-499; grupa III, ≤ 200 . Statističkom analizom nije utvrđena značajna razlika u učestalosti BKV ili JCV virurije u odnosu na stepen imunosupresije (definisano brojem CD4+ ćelija) ($p > 0,05$) (Tabela 9. i 10.).

Tabela 9. Učestalost JCV virurije kod HIV-inficiranih pacijenata u odnosu na broj CD4+ ćelija

Broj CD4+ ćelija u mm ³	JCV pozitivni (%)	JCV negativni (%)	Ukupno	P-vrednost
I ≥ 500	3 (2,7)	5 (4,4)	8 (7,1)	NS
II 201-499	16 (14)	24 (21)	40 (35)	
III ≤ 200	31 (27,2)	35 (30,7)	66 (57,9)	
Ukupno	50 (43,9)	64 (56,1)	114 (100)	

Tabela 10. Učestalost BKV virurije kod HIV-inficiranih pacijenata u donosu na broj
CD4+ ćelija

Broj CD4+ ćelija u mm ³	BKV pozitivni (%)	BKV negativni (%)	Ukupno	P-vrednost
I ≥ 500	4 (3,5)	4 (3,5)	8 (7)	NS
II 201-499	16 (14)	24 (21,1)	40 (35,1)	
III ≤ 200	38 (33,4)	28 (24,5)	66 (57,9)	
Ukupno	58 (50,9)	56 (49,1)	114 (100)	

4.3.2. Ispitivanje učestalosti BKV i JCV virurije u odnosu na CDC kategorije HIV-inficiranih pacijenata

Statistički značajna razlika dokazana je u stepenu BKV virurije među CDC kliničkim kategorijama ($p=0,019$; Tabela 11.). Utvrđeno je da je BK virurija značajno češća među HIV-inficiranim pacijentima koji pripadaju C kliničkoj kategoriji (64,4%) u odnosu na one koje pripadaju A+B kategoriji (42%).

Tabela 11. Učestalost BKV virurije kod HIV-inficiranih pacijenata u odnosu na
kliničke kategorije CDC klasifikacionog sistema

CDC klinička kategorija	Broj CD4+ ćelija u mm ³	BKV pozitivni (%)	BKV negativni (%)	Ukupno (%)	P- vrednost
A+B	258,2±182,6	29 (42)	40 (58)	69 (100)	0.019
C	90,1±83,8	29 (64,4)	16 (35,6)	45 (100)	

S druge strane, nije utvrđena statistički značajna razlika između JCV virurije i kliničkih kategorija ($p=0,207$; Tabela 12.).

Tabela 12. Učestalost JCV virurije kod HIV-inficiranih pacijenata u odnosu na kliničke kategorije CDC klasifikacionog sistema

CDC klinička kategorija	Broj CD4+ ćelija u mm ³	JCV pozitivni (%)	JCV negativni (%)	Ukupno (%)	P-vrednost
A+B	258,2±182,6	27 (39,1)	42 (60,9)	69 (100)	NS
C	90,1±83,8	23 (51,1)	22 (48,9)	45 (100)	

4.3.3. Ispitivanje učestalosti BKV i JCV virurije u odnosu na primenjenu HAART terapiju kod HIV-inficiranih pacijenata

U odnosu na antiretrovirusnu terapiju, kod HIV-inficiranih pacijenata koji primaju didanozin češće je otkrivena BKV DNK u urinu u odnosu na pacijente koji nisu primali ovaj lek ($p=0,014$).

S druge strane, nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti JCV virurije u odnosu na primenjenu HAART terapiju kod HIV-inficiranih pacijenata ($p>0,05$).

4.4. Distribucija subtipova i subgrupa BKV

Fragment VP1 gena dužine 290-nt, koji sadrži region za tipizaciju, je sekvenciran i analiziran u cilju određivanja BKV subgrupa i subtipova. Preliminarna identifikacija, za svih 67 izolata, je obavljena korišćenjem BLAST programa u okviru NCBI baze podataka (<http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>). BLAST program vrši poređenje ispitivane sekvence sa sekvencama iz NCBI baze podataka. Potvrda rezultata dobijenih upotrebom BLAST programa izvršena je filogenetskom analizom na osnovu položaja sekvenci u filogenetskom stablu.

U grupi HIV-inficiranih pacijenata identifikovana su dva BKV subtipa, I i IV. Dominantan subtip u ispitivanoj populaciji je bio subtip I (81%), dok je subtip IV identifikovan kod 19% izolata (Tabela 13.).

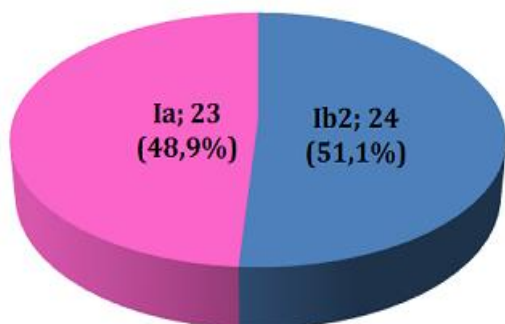
Slična distribucija subtipova je određena i u kontrolnoj grupi ispitanika: subtip I (66,6%) i subtip IV (33,4%) (Tabela 13.).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji subtipova BKV između HIV-inficiranih pacijenata i kontrolne grupe ispitanika ($p=0,381$).

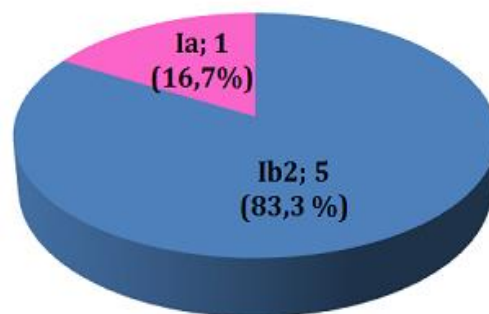
Tabela 13. Distribucija BKV subtipova i subgrupa u ispitivanim grupama

BKV subtipovi i subgrupe	HIV-inficirani pacijenti br., (%)	Kontrolna grupa br., (%)
Subtip I	47 (81)	6 (66,6)
Subgrupa Ia	23 (39,6)	1 (11,1)
Subgrupa Ib2	24 (41,4)	5 (55,5)
Subtip IV	11 (19)	3 (33,4)

Između dve grupe ispitanika uočena je razlika u distribuciji subgrupa unutar subtipa I. Kod HIV-inficiranih pacijenata, unutar subtipa I, 48,9% izolata identifikovano je kao subgrupa Ia, dok je 51,1% izolata svrstano u subgrupu Ib2 (Grafikon 3.). S druge strane u kontrolnoj grupi ispitanika najveći broj izolata je pripadao subgrupi Ib2 (83,3%), dok je samo jedan izolat identifikovan kao subgrupa Ia (16,7%) (Grafikon 4.).



Grafikon 3. Distribucija subgrupa u okviru subtipa I BKV u grupi HIV-inficiranih pacijenata (subgrupa, broj izolata i procenat)

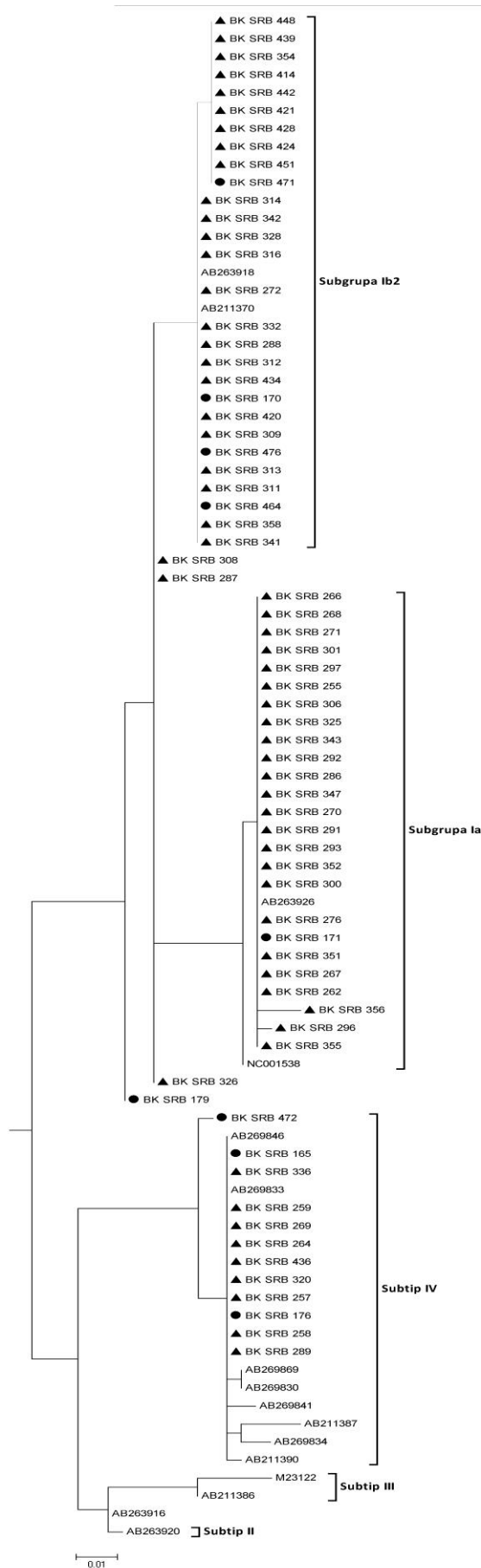


Grafikon 4. Distribucija subgrupa u okviru subtipa I BKV u kontrolnoj grupi ispitanika (subgrupa, broj izolata i procenat)

Subtipovi II i III nisu identifikovani među izolatima u ovom istraživanju.

Stablo maksimalne verovatnoće (ML stablo) je konstruisano upotrebom svih 67 sekvenci VP1 gena BKV dobijenih u ovom istraživanju, zajedno sa referentnim sekvencama za BKV preuzete iz DDBJ/EMBL/GenBank Internet baze podataka. Na osnovu filogenetskog stabla (Grafikon 5.), svi BKV izolati iz ovog istraživanja su pripadali ili subgrupi Ia ili Ib2 ili subtipu IV.

Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa



Grafikon 5. Filogenetsko stablo maksimalne verovatnoće konstruisano u PhyML programu, na osnovu 290-nt sekvence VP1 gena 67 izolata BKV (BK SRB) i 16 referentnih sekvenci preuzetih iz GenBank baze podataka. Trouglovi pored izolata označavaju izolate BKV HIV-inficiranih pacijenata dok krugovi označavaju izolate BKV ispitanika kontrolne grupe.

- ▲ HIV-inficirani pacijenti,
- Ispitanici kontrolne grupe

4.5. Identifikacija i distribucija nukleotidnih izmena i mutacija u VP1 genu BKV

Nukleotidne izmene su otkrivene kroz ceo sekvencirani fragment VP1 gena BKV u obe grupe ispitanika. Nesinonimne nukleotidne izmene su otkrivene na nukleotidnim pozicijama 1741, 1744, 1780, 1790, 1807, 1809, 1828, 1922, 1926 i 1938, dok su sinonimne izmene utvrđene na pozicijama 1695, 1704, 1706, 1722, 1771, 1800, 1890, 1905, 1908, 1912 i 1923 (numeracija nukleotidnih pozicija u odnosu na BKV Dunlop izolat, pristupni broj u GenBank-u NC001538).

Od ukupno 10 nesinonimnih nukleotidnih imena, 7 (70%) je otkriveno kod izolata BKV HIV-inficiranih pacijenata i 3 (30%) kod ispitanika kontrolne grupe.

Među izolatima BKV HIV-inficiranih pacijenata, 6 od 7 (85,7%) nesinonimnih nukleotidnih izmena nalazilo su se u okviru BC receptorskog domena VP1 gena. Samo 1 (14,3%) nesinonimna nukleotidna izmena je otkrivena izvan BC receptorskog domena VP1 gena u okviru β ploča koje povezuju domene (β -C, β -D, β -E, β -F) (Tabela 14.).

Među izolatima iz kontrolne grupe ispitanika sve 3 (100%) nesinonimne nukleotidne izmene T1828A, C1938T i T1922G otkrivene su van receptorskih domena u okviru β ploča (β -C, β -D, β -E, β -F) (Tabela 14.).

„Hot-spots“, nukleotidne pozicije u genomu koje su izmenjene minimalno kod 3 izolata, utvrđene su na pozicijama 1809, 1890, 1908 i 1923 u 13, 10, 4 i 3 izolata.

Tabela 14. Distribucija nesinonimnih nukleotidnih izmena u VP1 regionu BKV
izolata u ispitivanim populacijama

Nukleotidna pozicija nesinonimne izmene	Lokalizacija u VP1 proteinu	Broj izolata	Grupa ispitanika
1741	BC receptorski domen	1	HIV-inficirani pacijenti
1744	BC receptorski domen	1	HIV-inficirani pacijenti
1780	BC receptorski domen	1	HIV-inficirani pacijenti
1790	BC receptorski domen	1	HIV-inficirani pacijenti
1807	BC receptorski domen	1	HIV-inficirani pacijenti
1809	BC receptorski domen	13	HIV-inficirani pacijenti
1828	β ploča	1	Kontrolna grupa
1922	β ploča	1	Kontrolna grupa
1926	β ploča	2	HIV-inficirani pacijenti
1938	β ploča	1	Kontrolna grupa

Kod 34,5% HIV-inficiranih pacijenata otkriveno je 20 mutacija u VP1 regionu BKV izolata. Frekvencija otkrivenih mutacija među HIV-inficiranim pacijentima se kretala u rasponu od 1 do 13. U grupi HIV-inficiranih pacijenata, 90% (18/20) mutacija otkriveno je u BC receptorskom domenu VP1. Preostalih 10% (2/20) mutacija otkriveno je van receptorskih domena u okviru β ploča (β -C, β -D, β -E, β -F) (Tabela 15.). Najčešća mutacija je otkrivena na poziciji 82 u okviru subgrupe Ib2, gde je glutaminska kiselina (E) zamenjena aspartanskom kiselinom (D). Ni jedna mutacija nije otkrivena među izolatima koji pripadaju subtipu IV u grupi HIV-inficiranih pacijenata. Svi HIV-inficirani pacijenti kod kojih su otkrivene mutacije su imali broj CD4+ ćelija od 200ćelija/mm³.

U kontrolnoj grupi, kod 30% ispitanika otkrivene su 3 mutacije među BKV izolatima. Sve tri mutacije (Y89N, Q117K i V120G), jedinstvene za svakog ispitanika, su otkrivene van receptorskih domena u okviru β ploča (Tabela 15.). Među ispitanicima kontrolne grupe nijedna mutacija nije otkrivena u BC receptorskom domenu VP1 regiona BKV.

Statistički visoko značajna razlika je utvrđena u distribuciji mutacija u BC receptorskom domenu VP1 gena između HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe ($p=0,0004$).

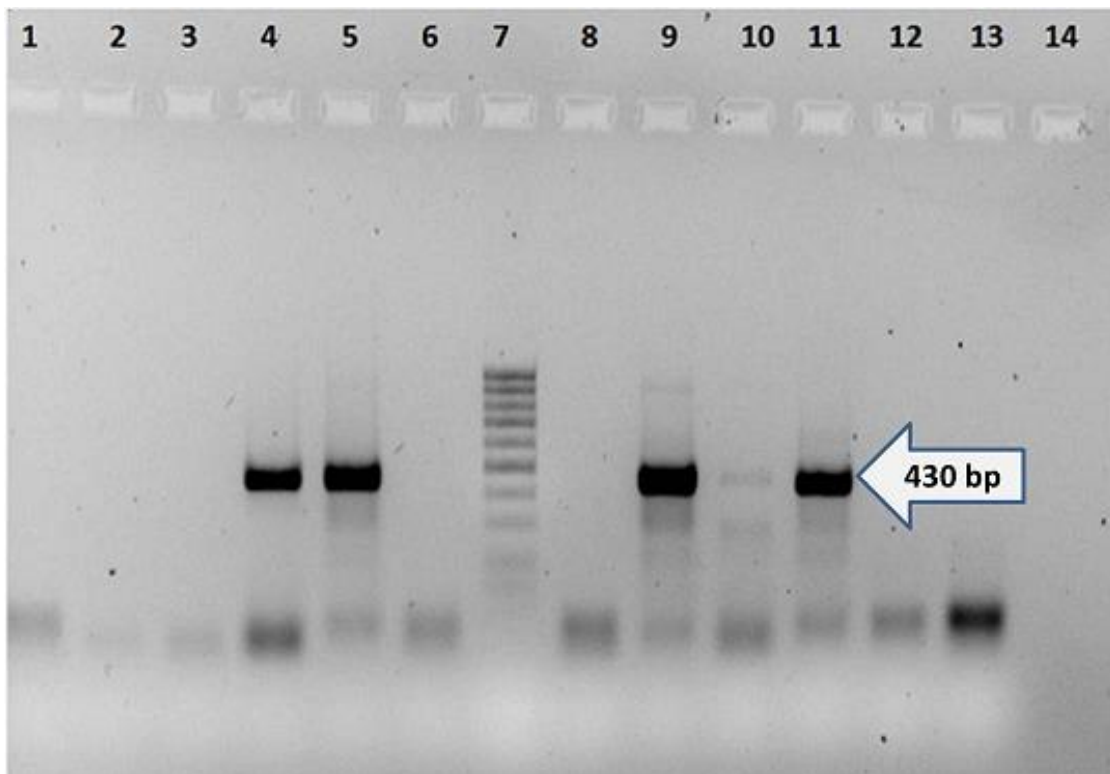
Tabela 15. Distribucija mutacija u VP1 regionu BKV izolata u ispitivanim grupama

Subtip/ Subgrupa	Izolat	AK pozicija																			Učestalost mutacija u grupi HIV- inficiranih pacijenata	Učestalost mutacija u kontrolnoj grupi
		42	47	60	61	62	66	69	71	73	74	75	76	77	82	89	117	120	121			
Ia	NC001538 ^a	V	E	D	E	N	F	K	S	E	N	D	F	S	E	Y	Q	V	I	-	-	
Ia	BK SRB 276 ^e	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
Ia	BK SRB 291 ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	1	-	
Ia	BK SRB 296 ^e	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
Ia	BK SRB 306 ^e	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
Ia	BK SRB 356 ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
Ia	BK SRB 171 ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	1	
Ib1	AB211369 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ib2	AB211370 ^c	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ib2	BK SRB 272 ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	13	-	
Ib2	BK SRB 309 ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	2	-	
Ib2	BK SRB 179 ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	1	
IV	AB211391 ^d	-	-	-	N	D	Y	R	T	-	T	A	-	D	D	-	-	-	-	-	-	
IV	BK SRB 472 ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	1	
																				Σ20	Σ3	

^a Prototip sekvence za subgrupu Ia
^b Prototip sekvence za subgrupu Ib1
^c Prototip sekvence za subgrupu Ib2
^d Prototip sekvence za subtip IV
^e Sekvence iz ovog istraživanja su obeležene kao BK SRB broj

4.6. Rezultati analize strukture NCRR izolata BKV

Kod svih uzoraka urina gde je PCR na VP1 gen bio pozitivan, izvršeno je i umnožavanje NCRR. Potvrdom ovog nalaza smatralo se prisustvo DNK fragmenta veličine 430-nt u gel elektroforezi nakon drugog kruga umnožavanja (Slika 9.).



Slika 9. Gel elektroforeza – Analiza PCR produkta za NCRR BKV Kolone 1-3, 6, 8, 12 negativni uzorci; 4-5, 9-10 pozitivni uzorci; 7 – 100bp standard; 11-pozitivna kontrola; 13- negativna kontrola

Pokazano je odstupanje rezultata PCR metode za VP1 gen i NCRR, s obzirom da je amplifikacija NCRR bila uspešna kod samo 26/58 (44,8%) uzoraka koji su bili pozitivni PCR metodom za VP1 gen. I kod ispitanika kontrolne grupe je pokazano odstupanje, amplifikacija NCRR je bila uspešna kod 4 (44,4%) ispitanika od ukupno 9 koliko ih je bilo pozitivno PCR metodom za VP1 gen.

Dobijene NCRR sekvence su analizirane i upoređivane sa arhetip varijantom BKV ww u BioEdit programu. Utvrđeno je da struktura NCRR svih pozitivnih uzoraka urina odgovara arhetip varijanti NCRR BKV. Arhetip varijanta se definiše kada ispitivana sekvenca liči na sekvencu BKV ww izolata i ima bazičnu strukturnu formulu P68Q39R63S63. Samo male promene poput baznih supstitucija, insercija i delecija koje nisu remetile bazičnu arhitekturu NCRR su otkrivene među sekvencama NCRR i HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe. Ukupno, 52 transverzije, 26 tranzicije, 2 delecije i 1 insercija su otkrivene među sekvencama NCRR u ovom istraživanju. Bazna supstitucija po tipu tranzicije je podrazumevala zamenu pirimidina pirimidinom ili purina purinom, dok je transverzija podrazumevala zamenu pirimidina purinom ili obrnuto. Delecije i insercije su podrazumevale uklanjanje ili dodavanje nukleotida. Delecije i insercije su otkrivene samo u R i S bloku dok su bazne supstitucije po tipu tranzicije i transverzije otkrivene u svim blokovima NCRR (Tabela 16.). Najčešća nukleotidna izmena je bila po tipu transverzije G253A, otkrivena je u S bloku kod 16 izolata (14 izolata HIV-inficiranih pacijenata i 2 izolata ispitanika kontrolne grupe). Kod najvećeg broja izolata nukleotidne izmene su otkrivene u S i R bloku NCRR. Tačkaste mutacije u S bloku su otkrivene kod 21/30 (70%) različitih izolata, odnosno kod 17/30 (56,6%) različitih izolata u R bloku NCRR.

Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost
kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa

Tabela 16. Distribucija nukleotidnih izmena po blokovima NCRR BKV

Nukleotidna izmena i njena pozicija u genomu BKV (numeracija na osnovu varijante BKV ww)									
	C81A	A85C	G92A	C107G	C119T	T121C	A122T	A124C	A124T
Blok NCRR	P	P	P	Q	Q	Q	Q	Q	Q
Nukleotidna izmena *	Tv	Tv	Tv	Tz	Tv	Tv	Tz	Tv	Tz
Broj izolata (grupa ispitanika**)	2 (HIV)	1 (HIV)	1 (HIV)	1 (HIV)	3 (HIV)	1 (HIV)	1 (HIV)	2 (HIV)	2 (HIV)

* I-insercija; D-delecija; Tv-transverzija; Tz-tranzicija ** HIV- HIV-inficirani pacijenti; KG-ispitanici kontrolne grupe

Nukleotidna izmena i njena pozicija u genomu BKV (numeracija na osnovu varijante BKV ww)									
	T125A	A126T	T127A	A131T	A139G	149G150	T160A	A161T	C173T
Blok NCRR	Q	Q	Q	Q	Q	R	R	R	R
Nukleotidna izmena*	Tz	Tz	Tz	Tz	Tv	I	Tz	Tz	Tv
Broj izolata (grupa ispitanika**)	1 (HIV)	2 (HIV)	1 (HIV)	1 (HIV)	2 (HIV)	1 (HIV)	3 (HIV)	10 (HIV)	3 (HIV)
								2 (KG)	

Nukleotidna izmena i njena pozicija u genomu BKV (numeracija na osnovu varijante BKV ww)										
	T183--	T225G	T231C	C251--	G253A	A254G	C259G	C259T	C261T	A267C
Blok NCRR	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Nukleotidna izmena*	D	Tv	Tv	D	Tv	Tv	Tz	Tv	Tv	Tv
Broj izolata (grupa ispitanika**)	1 (HIV)	3 (HIV)	2 (HIV)	1 (HIV)	14 (HIV)	10 (HIV)	2 (HIV)	1 (HIV)	1 (HIV)	2 (HIV)
					2 (KG)	2 (KG)				

4.7. Distribucija genotipova i subgenotipova JCV

Sekvence VP1 gena JCV dužine 495-nt, koje sadrže region za genotipizaciju, su analizirane i upoređene sa svim poznatim referentnim sekvencama JCV u BioEdit programu. Za svih 87 izolata, određeni su genotipovi i subgenotipovi. Potvrda dobijenih rezultata izvršena je filogenetskom analizom na osnovu položaja sekvenci u filogenetskom stablu.

U grupi HIV-inficiranih pacijenata dominantan genotip je bio genotip 2 (42%), praćen genotipovima 1 (34%) i 4 (24%) (Tabela 17.).

S druge strane, među ispitanicima kontrolne grupe najčešći genotipovi su bili genotipovi 1 (43,2%), genotip 2 (29,7%) i genotip 4 (27,1%) (Tabela 19.).

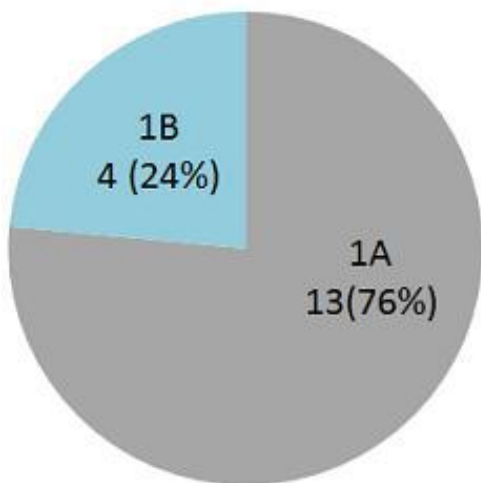
Tabela 17. Distribucija JCV genotipova i subgenotipa u ispitivanim grupama

JCV genotip i subgenotip	HIV-inficirani pacijenti, br. (%)	Ispitanici kontrolne grupe, br. (%)
Genotip 1	17 (34)	16 (43,2)
1A	13 (26)	6 (16,2)
1B	4 (8)	10 (27)
Genotip 2	21 (42)	11 (29,7)
2B	11 (22)	5 (13,5)
2C	6 (12)	5 (13,5)
2D	4 (8)	1 (2,7)
Genotip 4	12 (24)	10 (27,1)
Ukupno	50	37

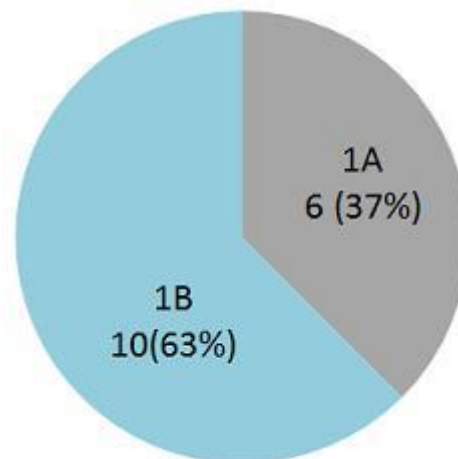
Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova JCV između HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe ($p>0,05$).

Međutim, utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji subgenotipova 1 JCV između HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe ($p=0,036$)(Grafikoni 6. i 7.).

Naime, među izolatima genotipa 1 JCV HIV-inficiranih pacijenata 76% izolata je pripadalo subgenotipu 1A, a 24% subgenotip 1B (Grafikon 6.). S druge strane, među izolatima JCV ispitanika kontrolne grupe, 37% izolata genotipa 1 pripadalo je subgenotipu 1A tj. 63% subgenotipu 1B (Grafikon 7.).



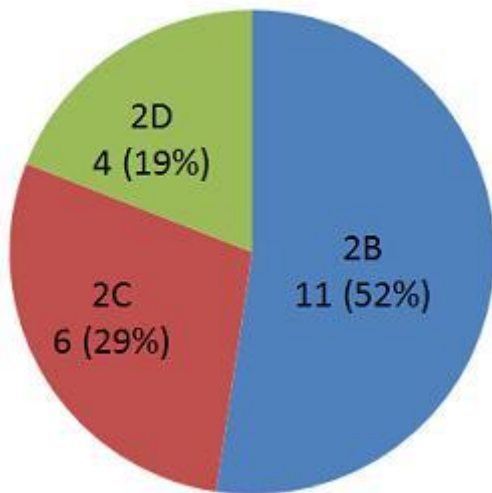
Grafikon 6. Distribucija subgenotipova u okviru genotipa 1 JCV u grupi HIV-inficiranih pacijenata (subgenotip, broj izolata i procenat)



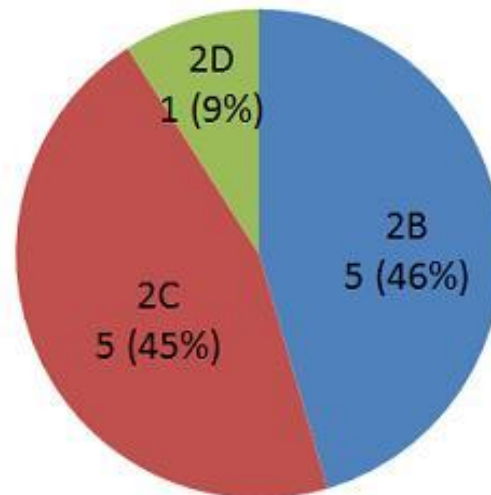
Grafikon 7. Distribucija subgenotipova u okviru genotipa 1 JCV u kontrolnoj grupi ispitanika (subgenotip, broj izolata i procenat)

Iako nije dostigla statističku značajnost, razlika je utvrđena i u distribuciji subgenotipova genotipa 2 JCV između HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe (Grafikoni 8. i 9.). U grupi HIV-inficiranih pacijenata, među

izolatima JCV genotipa 2, 52% je pripadalo subgenotipu 2B, 29% subgenotipu 2C i 19% subgenotipu 2D (Grafikon 8.). Među ispitanicima kontrolne grupe, izolati JCV klasifikovani kao genotip 2 pripadali su subgenotipu 2B (45%), 2C (46%) i 2D (9%) (Grafikon 9.).



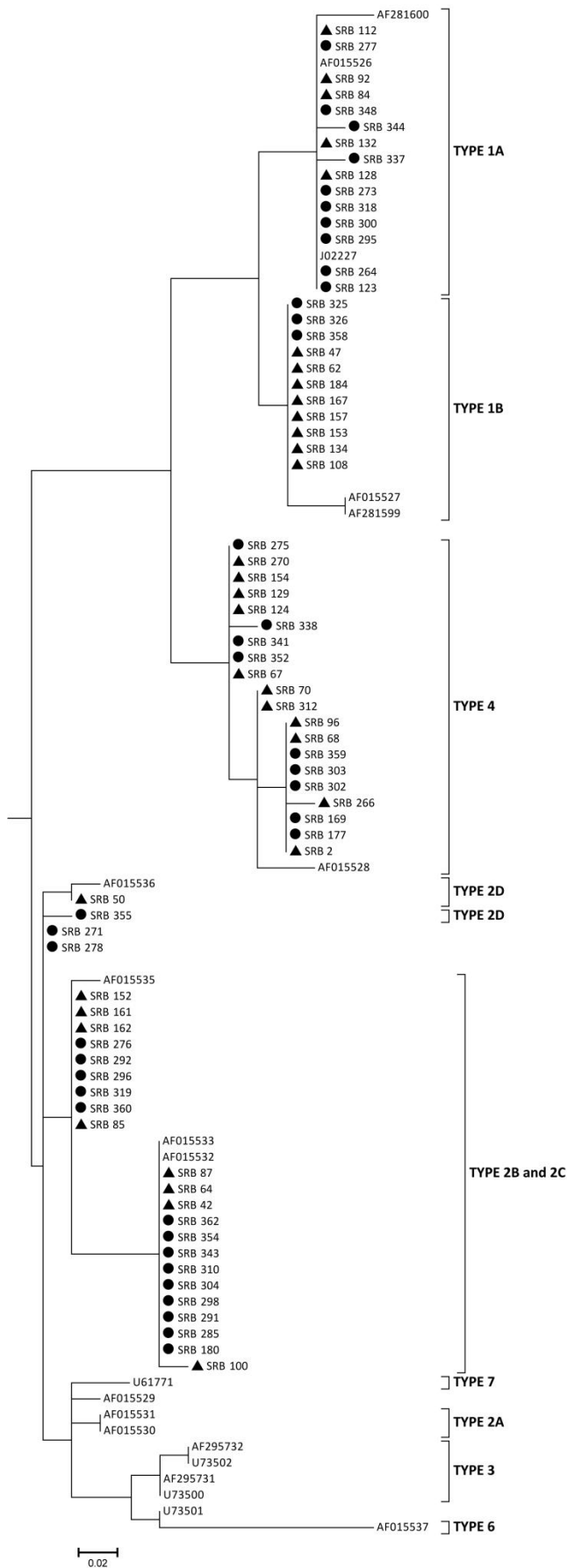
Grafikon 8. Distribucija subgenotipova u okviru genotipa 2 JCV u grupi HIV-inficiranih pacijenata (subgenotip, broj izolata i procenat)



Grafikon 9. Distribucija subgenotipova u okviru genotipa 2 JCV u kontrolnoj grupi ispitanika (subgenotip, broj izolata i procenat)

Stablo maksimalne verovatnoće (ML stablo) je konstruisano upotrebom svih 87 sekvenci VP1 gena JCV dobijenih u ovom istraživanju, zajedno sa referentnim sekvencama za JCV preuzete iz DDBJ/EMBL/GenBank Internet baze podataka. Na osnovu filogenetskog stabla (Grafikon 10.), svi JCV izolati iz ovog istraživanja klasifikovani su kao genotipovi 1, 2 i 4.

Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa



Grafikon 10. Filogenetsko stablo maksimalne verovatnoće konstruisano u PhyML programu, na osnovu 495-nt sekvence VP1 gena 87 izolata JCV (SRB) i 20 referentnih sekvenci preuzetih iz GenBank baze podataka. Trouglovi pored izolata označavaju izolate JCV ispitanika iz kontrolne grupe, dok krugovi označavaju izolate BKV HIV-inficiranih pacijenata.

- ▲ Ispitanici kontrolne grupe
- HIV-inficirani pacijenti

4.8. Identifikacija i distribucija nukleotidnih izmena i mutacija u VP1 genu JCV

Sinonimne i nesinonimne nukleotidne izmene su otkrivene među izolatima JCV kako HIV-inficiranih pacijenata tako i među izolatima ispitanika kontrolne grupe. Sinonimne nukleotidne izmene, izmene koje ne dovode do promene aminokiseline, su otkrivene kod 11 (22%) HIV-inficiranih pacijenata i 5 (13,5%) ispitanika kontrolne grupe na sledećim nukleotidnim pozicijama 1804, 1819, 1834, 1837, 1879, 1957, 1987, 2002, 2011, 2149, 2182, 2203, 2224 i 2227. Nesinonimne nukleotidne izmene su utvrđene na pozicijama 1851, 1861, 1869, 1940, 1959 2124, 2185 i 2186 kod 7 (14%) HIV-inficiranih pacijenata i 4 (10,8%) JCV ispitanika kontrolne grupe (numeracija nukleotidnih pozicija u odnosu na JCV Mad-1, pristupni broj u GenBank-u J02227).

Otkrivene nesinonimne nukleotidne izmene nalazile su se u okviru DE receptorskog domena VP1 gena i u okviru β ploča. Tri nesinonimne izmene (C1851G, T1861A i C1869A) su otkrivene u okviru DE domena VP1 kod 3 izolata HIV-inficiranih pacijenta i 1 izolata ispitanika kontrolne grupe (Tabela 18.). Preostalih 5 nesinonimnih izmena otkrivene su u β pločama, strukturama koje spajaju receptorske domene VP1 proteina (Tabela 18.). „Hot-spot“, nukleotidna pozicija koja je izmenjen kod minimalno 3 izolata, otkrivena je na samo jednoj poziciji C1940G kod 5 izolata JCV.

Kod 20% HIV-inficiranih pacijenata otkriveno je 10 mutacija u VP1 regionu JCV (Tabela 18.). Frekvencija otkrivenih mutacija među HIV-inficiranim pacijentima se kretala u rasponu od 1 do 3. U DE receptorskom domenu VP1 protein otkriveno je 30% (3/10) mutacija. Preostalih 7 (70%) mutacija otkriveno je u β pločama koje povezuju receptorske domene VP1 proteina (Tabela 18.). Najčešća mutacija je lokalizovana u β ploči na poziciji 152 u okviru subgenotipa 1A, gde je leucin (L) zamenjen valinom (V).

U kontrolnoj grupi, kod 13,5% ispitanika otkriveno je 5 mutacija među JCV izolatima. Samo 1 (20%) mutacija A134G otkrivena je u DE receptorskom domenu, dok su preostale 4 (80%) otkrivene u β pločama (Tabela 18.). I među ispitanicima kontrolne grupe, najčešća mutacija je bila na poziciji L152V.

Tri mutacije (L157V, T164K i E240) koje su otkrivene među ispitanicima obe grupe lokalizovane su u okviru β ploča, dok su mutacije otkrivene u DE receptorskom domenu bile jedinstvene za ispitanike obe grupe.

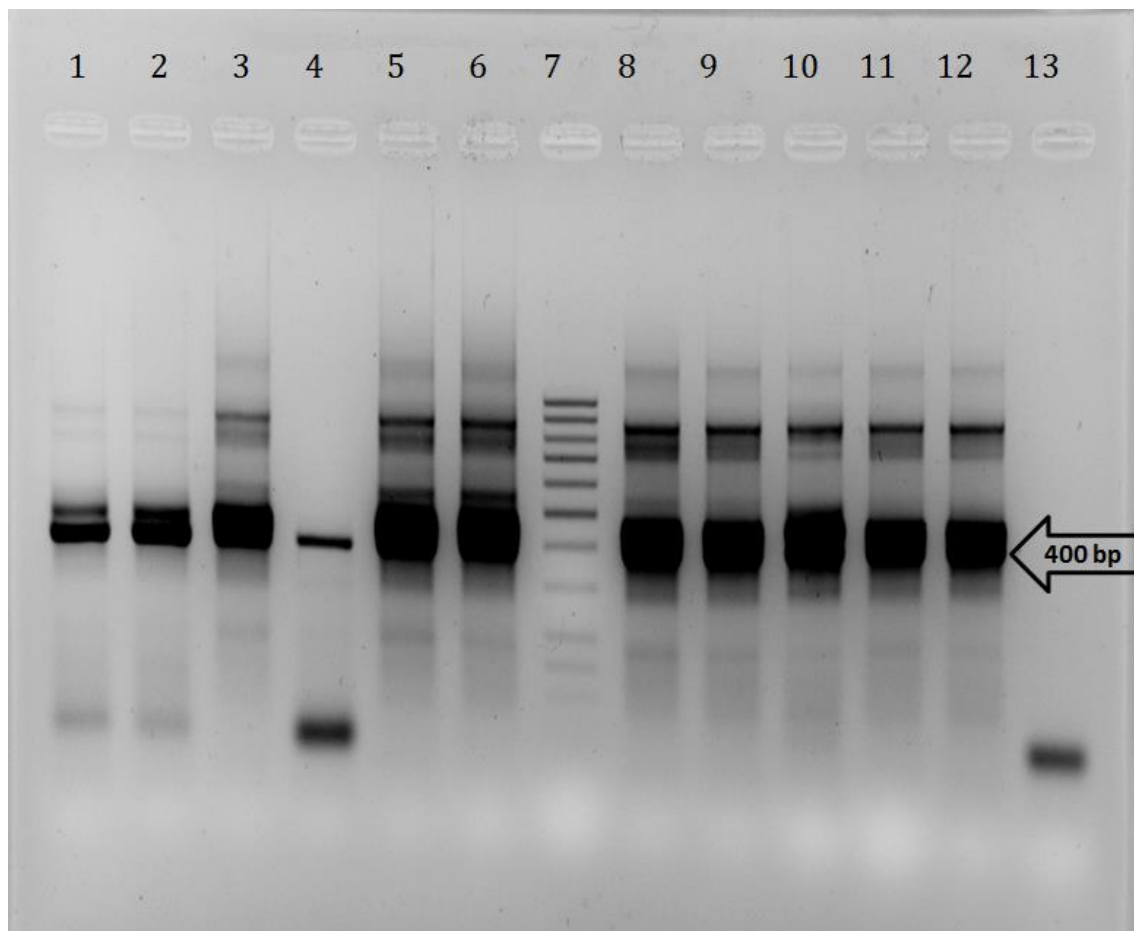
Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji mutacija u VP1 proteinu između HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe ($p=0,310$).

Tabela 18. Nesinonimne nukleotidne izmene i mutacije u VP1 regionu JCV izolata u ispitivanim grupama

Nukleotidna pozicija	Nesinonimna nukleotidna izmena	AK pozicija	Mutacija	Region VP1	Učestalost u grupi HIV-inficiranih pacijenata	Učestalost u kontrolnoj grupi ispitanika
1851	C→G	128	Thr→Ser	DE domen	1	-
1861	T→A	131	Asn→Lys	DE domen	2	-
1869	C→A	134	Ala→Gly	DE domen	-	1
1940	C→G	157	Leu→Val	β ploča	3	2
1959	C→A	164	Thr→Lys	β ploča	1	1
2124	G→C	219	Gly→Ala	β ploča	1	-
2185	T→G	239	Asp→Glu	β ploča	1	-
2186	G→A	240	Glu→Gln	β ploča	1	1

4.9. Rezultati analize strukture NCRR izolata JCV

Umnožavanje NCRR izvršeno je kod svih pozitivnih uzoraka urina na JCV VP1 gen. Potvrdom umnožavanja NCRR JCV smatralo se prisustvo DNK fragmenta veličine 400-nt u gel elektroforezi nakon drugog kruga umnožavanja (Slika 10.).



Slika 10. Gel elektroforeza – Analiza PCR produkta za NCRR JCV
Kolone 1-6 pozitivni uzorci; 7-100bp standard; 8-12 pozitivni uzorci; 13-negativna kontrola

Dobijene NCRR sekvence su analizirane i upoređivane sa arhetip varijantom JCV CY u BioEdit programu. Analizom je utvrđeno da struktura NCRR odgovara arhetip varijanti NCRR JCV. Arhetip varijanta se definiše kada ispitivana sekvenca liči na sekvencu JCV CY izolata i ima bazičnu strukturnu formulu A36B23C55D66E18F69.

Minimalne promene poput baznih supstitucija (tranzicija i transverzija), pojedinačnih delecija koje nisu menjale osnovnu arhitekturu NCRR su otkrivene među sekvencama NCRR i HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe. Ukupno, 19 transverzija, 8 tranzicija i 6 delecije su otkrivene među sekvencama JCV NCRR u ovom istraživanju. Tranzicije i transverzije su otkrivene u skoro svakom bloku, dok su delecije otkrivene u B, D i F bloku NCRR JCV (Tabela 19.). Najčešća promena je bila delecija jednog nukleotida na poziciji 165 u D bloku kod 7 izolata. Ova delecija je otkivena među izolatima kako HIV-inficiranih pacijenata tako i među izolatima ispitanika kontrolne grupe. Blokovi B, C i F su se pokazali kao najvarijabilniji delovi NCRR sa najvećim brojem različitih nukleotidnih izmena (Tabela 19.).

Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost
kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa

Tabela 19. Distribucija nukleotidnih izmena po blokovima NCRR JCV

Nukleotidna izmena i njena pozicija u genomu JCV (numeracija na osnovu varijante JCV CY)									
	G7T	A38G	T48A	C51T	A53G	A53T	A54G	A55C	A55-
Blok NCRR	A	B	B	B	B	B	B	B	B
Nukleotidna izmena *	Tv	Tv	Tz	Tv	Tv	Tz	Tv	Tv	D
Broj izolata (grupa ispitanika**)	1 (HIV)	1 (KG)	1 (HIV)	2 (HIV)	1 (HIV)	1 (KG)	1 (HIV)	1 (KG)	1 (HIV)

* D-delecija; Tv-transverzija; Tz-tranzicija

** HIV- HIV-inficirani pacijenti; KG-ispitanici kontrolne grupe

Tabela 19(nastavak). Distribucija nukleotidnih izmena po blokovima NCRR JCV

Nukleotidna izmena i njena pozicija u genomu JCV (numeracija na osnovu varijante JCV CY)									
	A56-	A61C	C65T	G71C	C83G	G95T	A104G	C106T	G108A
Blok NCRR	B	C	C	C	C	C	C	C	C
Nukleotidna izmena*	D	Tv	Tv	Tz	Tz	Tv	Tv	Tv	Tv
Broj izolata (grupa ispitanika**)	1 (HIV)	1 (HIV)	1 (HIV)	1 (HIV)	1 (KG)	1 (HIV)	1 (HIV)	1 (KG)	1 (HIV) 1 (KG)

* D-delecija; Tv-transverzija; Tz-tranzicija

** HIV- HIV-inficirani pacijenti; KG-ispitanici kontrolne grupe

Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost
kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa

Tabela 19 (nastavak). Distribucija nukleotidnih izmena po blokovima NCRR JCV

Nukleotidna izmena i njena pozicija u genomu JCV (numeracija na osnovu varijante JCV CY)										
	A109T	C129G	T130G	A133C	T146C	A165-	T166C	A190G	G199-	G200-
Blok NCRR	C	D	D	D	D	D	D	E	F	F
Nukleotidna izmena*	Tz	Tz	Tv	Tv	Tv	D	Tv	Tv	D	D
Broj izolata	1	1	1	1	1	3 (HIV)	1	1	1	1
(grupa ispitanika**)	(HIV)	(HIV)	(HIV)	(KG)	(HIV)	4 (KG)	(KG)	(HIV)	(HIV)	(HIV)

* D-delecija; Tv-transverzija; Tz-tranzicija

** HIV- HIV-inficirani pacijenti; KG-ispitanici kontrolne grupe

Tabela 19 (nastavak). Distribucija nukleotidnih izmena po blokovima NCRR JCV

Nukleotidna izmena i njena pozicija u genomu JCV (numeracija na osnovu varijante JCV CY)					
	G219A	A221-	A222-	G239A	G241C
Blok NCRR	F	F	F	F	F
Nukleotidna izmena*	Tv	D	D	Tv	Tz
Broj izolata	1 (HIV)	1 (HIV)	1 (HIV)	2	1 (HIV)
(grupa ispitanika**)	1(KG)	1(KG)	1(KG)	(HIV)	

* D-delecija; Tv-transverzija; Tz-tranzicija

** HIV- HIV-inficirani pacijenti; KG-ispitanici kontrolne grupe

4.10. Filogenetska analiza izolata BKC i JCV

Za procenu selekcionog pritiska, izračunat je odnos nesinonimnih (dN) i sinonimnih (dS) nukleotidnih izmena (dN/dS) upotrebom Synonymous Non-synonymous Analysis programa (SNAP) (<http://www.hiv.lanl.gov>).

4.10.1. Rezultati procene selekcionog pritiska za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona izolata BKV

Vrednost dN, mere nesinonimnih izmena po nesinonimnom mestu, za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona bila je slična među sekvencama u obe ispitivane grupe (0,016±0,006 u grupi HIV-inficiranih pacijenata; 0,030±0,011 u kontrolnoj grupi ispitanika). Takođe, vrednosti dN su izračunate za grupu CDC A+B (0,014±0,005) u odnosu na grupu CDC C (0,021±0,008) i nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednosti dN između ove dve grupe. U okviru BC receptorskog domena, vrednosti dN su bile veće od dN vrednosti za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona u svakoj ispitivanoj grupi (0,063±0,036 u kontrolnoj grupi ispitanika; 0,035±0,019 u grupi HIV-inficiranih pacijenata; 0,030±0,016 u grupi CDC A+B i 0,045±0,025 u grupi CDC C).

I vrednost dS, mere sinonimnih izmena po sinonimnom mestu, bila je slična među sekvencama u ispitivanim grupama (0,096±0,026 u grupi HIV-inficiranih pacijenata; 0,128±0,035 u kontrolnoj grupi ispitanika; 0,112±0,030 za grupu CDC C i 0,084±0,023 u grupi CDC A+B). U grupi HIV-inficiranih pacijenata, vrednost dS BC receptorskog domena (0,122±0,065) bila je veća u odnosu na vrednost dS VP1 regiona sekvenciranog i analiziranog u ovom straživanju.

Selekциони pritisak, odnos dN/dS je bio manji od 1 u svim ispitivanim grupama.

4.10.2. Rezultati procene selekcionog pritiska za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona izolata JCV

Vrednosti dN za protein kodirajuće sekvence VP1 region su bile skoro identične u svim ispitivanim grupama ($0,005 \pm 0,002$ u kontrolnoj grupi ispitanika; $0,006 \pm 0,002$ u grupi HIV-inficiranih pacijenata; $0,006 \pm 0,002$ i u grupi CDCA+B i u grupi CDC C). U okviru DE receptorskog domena, vrednosti dN su bile nekoliko puta veće od vrednosti dN za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona u svakoj ispitivanoj grupi ($0,037 \pm 0,011$ u kontrolnoj grupi ispitanika; $0,037 \pm 0,012$ u grupi HIV-inficiranih pacijenata; $0,038 \pm 0,012$ u grupi CDC A+B i $0,037 \pm 0,012$ u grupi CDC C).

I vrednosti dS su bile gotovo identične među ispitivanim grupama, jedino u kontrolnoj grupi ispitanika dS je bila nešto niža u odnosu na ostale grupe ($0,037 \pm 0,011$ u kontrolnoj grupi ispitanika; $0,045 \pm 0,013$ u grupi HIV-inficiranih pacijenata; $0,046 \pm 0,013$ u grupi CDCA+B i $0,045 \pm 0,013$ u grupi CDC C).

Selekциони pritisak, odnos dN/dS je bio manji od 1 u svim ispitivanim grupama.

5. DISKUSIJA

Produženo stanje imunosupresije kao posledica HIV infekcije, izdvojilo je humane poliomaviruse kao nove igrače u timu „oportunističkih infekcija“ kod AIDS pacijenta. U poslednje vreme, BKV i JCV dobijaju sve više i više pažnje u naučnim krugovima pre svega zbog visokog mortaliteta oboljenja koja nastaju kao posledica njihove reaktivacije. Pre epidemije AIDS-a, limfoproliferativna oboljenja su bila vodeći uzrok za reaktivaciju humanih poliomavirusa. Međutim, već neko vreme ovaj trend je promenjen i značajna veza između povećane replikacije BKV ili JCV i HIV infekcije je ustanovljena. U ovom istraživanju, analizirani su izolati BKV i JCV dobijeni iz uzoraka urina HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe u cilju ispitivanja uticaja infekcije virusom humane imunodeficijencije na učestalosti BK i JC virurije i genetičku varijabilnost NCCR i VP1 regiona BK i JC virusa. Ovo je prva studija u našoj zemlji, ali i u zemljama u regionu koja se bavi izučavanjem genetičke varijabilnosti humanih poliomavirusa: BKV i JCV.

BK i JC su ubikvitarni i široko rasprostranjeni humani poliomavirusi. Posle primarne asimptomatske infekcije, koja se uglavnom dešava u toku ranog detinjstva, virusi uspostavljaju doživotnu latenciju. Najvažnija mesta latencije za oba virusa su ćelije bubrega i urinarnog trakta, a JCV uspostavlja još latenciju i u B limfocitima. Virus se najčešće prenose respiratornim putem unutar porodice (Kunitake i sar., 1995.). Serokonverzija za oba virusa se dešava u detinjstvu: kod 90% dece uzrasta od 5 do 9 godina se mogu otkriti antitela specifična za BKV, dok se serokonverzija za JCV dešava nešto kasnije oko 10 godine i anti-JCV antitela se mogu otkriti kod 50 do 60% dece tog uzrasta (Knowles, 2006.). Seroprevalenca kod odraslih za BKV i JCV je veoma visoka: više od 90% odraslih ima antitela specifična za epitope VP1 proteina BKV (Knowles i sar., 2003.), dok je 50 do 80% odraslih seropozitivno za JCV (Khalili i sar., 2007., Knowles, 2006.). Zanimljivo je da titar anti-BKV antitela opada sa godinama, dok se titar neutrališućih antitela specifičnih za površinske epitope JCV ne menja sa godinama (Knowles, 2006., Knowles i sar., 2003.).

Reaktivacija BKV je retka kod zdravih imunokompetentnih osoba (0-6%) i uglavnom je asimptomatska, dok je za pojavu simptomatske i ozbiljne infekcije urinarnog trakta neophodna značajna ugroženost imunskog sistema domaćina, kao npr. kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, posle transplantacije koštane srži (Lee i sar., 2004., Drachenberg i sar., 2007., Shakiba i sar., 2011.) ili kao posledica HIV infekcije (Markowitz i sar., 1993., Sundsfjord i sar., 1994., Boldorini i sar., 2000., Behzad-Behbahani i sar., 2004.). Reaktivacija BKV kod imunosuprimiranih pacijenata je povezana sa nastankom hemoragijskog cistitisa i poliomavirus-udružene nefropatije (Sukov i sar., 2008.). U poslednje vreme reaktivacija BKV kod HIV-inficiranih pacijenata se dovodi u vezu sa nastankom širokog spektra oboljenja poput nefritisa, pneumonije, encefalitisa, retinitisa itd. (Barouch i sar., 2002., Hedquist i sar., 1999., Cubukcu-Dimopulo i sar., 2000.).

Za razliku od BKV, JC virurija je česta pojava kako kod imunokompetentnih tako i kod imunosuprimiranih osoba. Reaktivacija JCV kod imunosuprimiranih osoba se dovodi u vezu sa nastankom PML-a, a u poslednje vreme i u vezu sa nastankom nekih neuroloških poremećaja poput neuropatija, encefalopatija i meningitisa (Tan i Koranik, 2010.).

U ovom istraživanju BK virurija je utvrđena kod 50,8% HIV-inficiranih pacijenata. Rezultati ranijih studija su pokazali široki raspon učestalost BK virurije među HIV-inficiranim pacijentima koja se kretala od 15% do 60% (Markowitz i sar., 1993., Sundsfjord i sar., 1994., Machado i sar., 2011., Ledesma i sar., 2012., Knowes i sar., 1999.). S druge strane, učestalost BK virurije među ispitanicima kontrolne grupe tj. zdravim osobama u Srbije je bila 7,5%. Ova učestalost je u skladu sa rezultatima predhodnih istraživanja gde je utvrđena da se kod imunokompetentnih seropozitivnih osoba BKV reaktivira kod nekih 5-10% (Eash i sar., 2006.). Kao i u određenom broju ranijih studija (Markowitz i sar., 1993., Sundsfjord i sar., 1994., Machado i sar., 2011.), utvrđena je visoka statistički značajna razlika u frekvenci izlučivanja BKV između HIV-inficiranih pacijenata i zdravih osoba.

Moguće objašnjene za povećanu replikaciju BKV kod HIV-inficiranih pacijenata možda se krije u činjenici da HIV-1 tat protein ima sposobnost da transaktivira rani promotor BKV (BKV_E). Gorrill i sar., (2006) navode da tat protein stimuliše BKV_E tako što vezuje subjednicu NF-kB p65 za kB motiv koji se nalazi u blizini 3' kraja BKV_E. Reaktivacija BKV_E dovodi do povećane produkcije ranog T antigena koje se vezuje za mesto početka replikacije (ori) u okviru NCRR i ostvaruje svoju ulogu „glavnog igrača“ u produktivnoj BKV infekciji (Gorrill i sar., 2006.).

Među HIV-inficiranim pacijentima u Srbiji, učestalost JC virurije iznosila je 43,8%. Ova učestalost virurije je u skladu sa rezultatima za druge evropske zemlje. Na primer, frekvencija JC virurije među HIV-inficiranim pacijentima u Irskoj je iznosila 54,2% (Schaffer i sar., 2008.), u Portugaliji 51% (Matos i sar., 2010.) u Italiji 46,7% (Ferrante i sar., 2001.) Kao i u drugim studijama (Ferrante i sar., 2001., Schaffer i sar., 2006., Matos i sar., 2010.) i rezultati ovog istraživanja potvrđuju statistički značajnu razliku u frekvenci izlučivanja JCV između HIV-inficiranih pacijenata i zdravih osoba.

Učestalost JC virurije iznosila je 30,8% kod zdravih osoba u ovom istraživanju. Ovaj rezultat je u skladu sa objavljenim rezultatima za druge evropske zemlje, gde se frekvencija JC virurije kreće u rasponu od 21% u Irskoj (Schaffer i sar.,

2006.), do 32% u Nemačkoj (Agostini i sar., 2001.), 38% u Portugalu (Matos i sar., 2010.), 39-46% u Poljskoj (Agostini i sar., 2001., Kmiecik i sar., 2008.), 40-47% u Italiji (Ferrante i sar., 2001., Pagani i sar., 2003., Rossi i sar., 2007.), 47-54% u Španiji (Agostini i sar., 2001., Polo i sar., 2004.). Moguće objašnjenje za ove varijacije verovatno leži u razlikama među pacijentima uključenim u različite studije. U većini studija, uključujući i ovo istraživanje, uzorci urina koji su činili kontrolnu grupu su dobijeni od hospitalizovanih ili ambulantnih pacijenata. S druge strane, npr. u Irskoj, uzorci urina su dobijeni od mladog i zdravog univerzitetskog osoblja i to je verovatno razlog niže učestalosti JC virurije u Irskoj u odnosu na ostale evropske zemlje (Schaffer i sar., 2006.).

Sinergistička veza između JCV i HIV, koja se ostvaruje na molekularnom nivou, je moguće objašnjenje za češću reaktivaciju JCV kod HIV-inficiranih pacijenata. Naime, HIV tat protein se vezuje za tat-vezujuća mesta u okviru NCRR JCV i dovodi do povećane transkripcije ranih gena pre svega T antigena JCV, koji ima ključnu ulogu u započinjanju i održavanju replikativnog ciklusa JCV (Chowdhury i sar., 1993., Daniel i sar., 2006.).

U obe ispitivane populacije, JC virurija je bila češća među ispitanicima muškog pola. Rezultati istraživanja Rossi i sar. 2007, takođe su pokazali veću učestalost JC virurije među muškarcima, dok rezultati većine drugih istraživanja (Pagani i sar., 2003., Kmiecik i sar., 2008.) nisu utvrdili razlike u frekvenci JC virurije između polova. Međutim, statistička povezanost između BK virurije i pola nije utvrđena u ovom istraživanju i u skladu je sa nalazima studije koju su sproveli Nali i sar., 2012. gde takođe nije utvrđena razlika u frekvenci izlučivanja BKV između muškaraca i žena.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da godine starosti imaju uticaj na frekvencu JC i BK virurije. Frekvencija JC virurije je sa godinama starosti ispitanika rasla, dostižući 52% u grupi od 51-60 godina i skoro 72% kod osoba starijih od 61 godine. Ovi nalazi su slični nalazima većine drugih studija o povezanosti godina starosti i JC virurije (Ling i sar., 2003., Schaffer i sar., 2006., Rodrigues i sar., 2007., Zhong i sar., 2007., Kmiecik i sar., 2008., Egli i sar., 2009.). Takođe, učestalost BK

virurije je bila veća kod starijih ispitanika u ovom istraživanju. Ipak, mali pad u frekvenci BK virurije je uočen u starosnoj grupi od 61 do 70 godina (42,8%) u odnosu na grupu 51-60 godina (60%). Međutim, ova razlika nije dostigla statističku značajnost, i verovatno je posledica malog broja ispitanika u starosnoj grupi 61-70 godina.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja je bio da se ispita ranije postavljena hipoteza (Lednicky i sar., 2003., Schaffer i sar., 2006.) o povezanosti frekvence BK i JC virurije sa stepenom imunosupresije. Naime, kod HIV-inficiranih pacijenata veća učestalost JC virurije je utvrđena kod pacijenata sa nižim brojem CD4+ ćelija (Lednicky i sar., 2003., Schaffer i sar., 2006.). Međutim, ovo istraživanje kao i neka predhodna (Matos i sar., 2010., Nali i sar., 2012.) nisu pokazala statistički značajnu povezanost između JC virurije i stepena imunosupresije utvrđenog na osnovu broja CD4+ ćelija. Takođe, nije utvrđena povezanost između CDC kliničke kategorije i učestalosti JC virurije. Činjenica da je aktivna JC replikacija u bubrezima relativno česta i kod imunokompetentnih i HIV-inficiranih pacijenata, ukazuje na značaj i drugih faktora, osim imunosupresije, za reaktivaciju JCV a za povećan rizik od nastanka PML kod HIV-inficiranih pacijenata.

JCV ima sposobnost da inficira B limfocite i da u njima perzistira, i smatra se da su B limfociti odgovorni za prenos JCV od bubrega do CNS-a. U CNS-u JCV dovodi do litičke infekcije oligodendrocita i nastanka PML. Litička infekcija oligodendrocita, mijelin produkujućih ćelija CNS-a, dovodi do nastanka multifokalnih zona demijelinizacije u beloj masi mozga i to je osnovna patološka karakteristika PML-a (White i Khalili, 2011.). Međutim, i kod imunokompetentnih osoba JCV inficira B limfocite kojim se mogu preneti do CNS-a, ali nema nastanka PML. Postavlja se pitanje, zbog čega? Jedno od mogućih objašnjenja je da kod HIV-inficiranih osoba imunodeficijencija omogućava JCV inficiranim limfocitima da perzistiraju duže u cirkulaciji i tako povećavaju rizik za prenos JCV do CNS-a. Zatim, disfunkcija B limfocita udružena sa povećanom cirkulacijom istih, koja doprinosi prelasku JCV kroz krvno-moždanu barijeru, takođe je primećena tokom HIV infekcije (Berger i Houff, 2006.). Takođe, HIV tat protein direktno povećava ekspresiju ranih gena JCV, i tako olakšava i povećava nivo JCV replikacije u inficiranim ćelijama (Chowdhury i

sar., 1993.). Čini se da HIV infekcija dovodeći do promena u imunskom sistemu domaćina, stvara pogodno stanje za nastanak PML.

Nije uočena povezanost između BK virurije i stepena imunosupresije utvrđenog samo na osnovu broja CD4+ T ćelija. Međutim s druge strane, statistički značajna razlika je utvrđena u frekvenci izlučivanja BKV u odnosu na CDC kategoriju HIV-inficiranih pacijenata. Naime, BK viruriju su najčešće imali HIV-inficirani pacijenti sa najvećim stepenom imunosupresije (C klinička kategorija prema CDC klasifikacionom sistemu sa brojem CD4+ ćelija $<200/\text{mm}^3$). Markowitz i sar., (1993) kao i Knowles i sar., (1999) su takođe u svojim istraživanjima utvrdili češću BK viruriju kod pacijenata sa brojem CD4+ ćelija $<200/\text{mm}^3$. Učestalost BK virurije je povezana sa nivoom imunosupresije ukazujući na činjenicu da je povećan nivo replikacije BKV pre svega posledica reaktivacije, a ne reinfekcije (Doerries, 2001.).

Uvođenjem HAART, došlo je do promene tokova nekih oportunističkih infekcija kod HIV-inficiranih pacijenata. Svi HIV-inficirani pacijenti u ovom istraživanju su bili na HAART i primali su nekoliko lekova u različitim kombinacijama. Samo kod pacijenta lečenih sa didanozionom utvrđena je veća učestalost BK virurije u odnosu na pacijente koji nisu primali ovaj lek, dok statistička povezanost između BK ili JC virurije i drugih lekova nije utvrđena. Didanozin, nukleozidni analog koji inhibira reverznu transkriptazu HIV-a, je inaktivan protiv BKV i samim tim ne utiče na replikaciju BKV (Randhawa i sar., 2008.). Akhgari i sar., (2015) su pokazali da je BK viremija češća kod nelečenih HIV-inficiranih pacijenata i predpostavili su da rekonstitucija imunskog sistema domaćina, kao posledica HAART-a, dovodi do značajnog smanjenja viremije, a da manje utiče na smanjenje viruriju. Imajući na umu da didanozin ne utiče na replikaciju BKV, razlog za veću učestalost BK virurije kod pacijenata na terapiji sa didanozinom možda je u činjenici da ostali lekovi smanjuju učestalost BK virurije, a da sam didanozin ne utiče na replikaciju BKV.

Široka rasprostanjenost JCV udružena sa transmisijom unutar porodice i koevolucija sa ljudskom populacijom od trenutka nastanka modernog čoveka, učinili

su ovaj virus pogodnim kandidatom za rekonstrukciju migracije stanovništva. Određivanje genotipova JCV se danas koristi i kao marker za praćenje migracija stanovništva. Distribucija genotipova i subgenotipova JCV u populaciji je odraz etničkog i geografskog razilaženja (odstupanja) ljudi tj. ispitivane populacije od prvog modernog čoveka tokom mnogo milenijuma duge koevolucije (Stoner i sar., 2000.). Nekoliko genotipova i subgenotipova JCV je opisano širom sveta. Genotip 1 je glavni genotip u Evropi i Americi, genotipovi 2 i 7 su karakteristika stanovništva Azije, tipovi 3 i 6 dominiraju među stanovništvom Afrike kao i njihovim potomcima koji naseljavaju druge kontinente (Agostini i sar., 1996; Schaffer i sar., 2006., Agostini i sar., 2001.). Genotip 4 je posle genotipa 1 drugi najznačajni tip JCV među Evropljanima kao i njihovim potomcima koji naseljavaju pre svega Severnu Ameriku (Agostini i sar., 1998.). Najnovije otkriveni genotip je tip 8 među stanovništvom Papua Nove Gvineje (Yanagihara i sar., 2002.). Među evropskim narodima najčešće se otkriva genotip 1, zatim genotipovi 4 i 2 (Dubois i sar., 2001., Pagani i sar., 2003., Schaffer i sar., 2006.).

Jedan od ciljeva ovog istraživanja je bio i da se stekne uvid u genotipove JCV koji cirkulišu među stanovništvom Srbije. Moderni Srbi su južnoslovenski narod, etnički i lingvistički organak Indoevropskog naroda, koji su se izmešali sa starosedeočima Balkana (Paleo populacijom) po naseljavanju Balkanskog poluostrva u šestom veku. Imajući u vidu, istoriju srpskog naroda i milenijum dugu zajedničku evoluciju ljudi i JCV, nije bilo neočekivano da se evropski, evroazijski i indijski genotipovi JCV otkriju među stanovništvom Srbije.

Dominantan JCV genotip, među ispitanicima kontrolne grupe (zdravim osobama) u Srbiji, je bio genotip 1, praćen genotipovima 2 i 4. Nukleotidna razlika između genotipova 1 i 4 iznosi svega 1%, i oni su specifični za Evropljane kao i potomke Evropljana koji su tokom istorije naselili i druge kontinente i države (Agostini i sar., 1998.). Skoro 71% (70,3%) ispitanika kontrolne grupe u našem istraživanju su nosioci genotipova 1 i 4, osnovnih markera naroda koji su tokom migracije stanovništva naselili Evropski kontinent. Rezultati nekih predhodnih istraživanja (Agostini i sar., 2001., Dubois i sar., 2001.) ukazuju da postoji razlika u distribuciji subgenotipova genotipa 1 kako se ide od istoka ka zapadu Evrope.

Naime, subgenotip 1A se češće otkriva među stanovnicima istočne Evrope, dok je 1B karakteristika stanovništva zapadne Evrope. Međutim, rezultati ovog istraživanja nisu potvrdili ove nalaze jer je među stanovnicima Srbije subgenotip 1B bio češći od subgenotipa 1A.

Ovaj obrazac distribucije genotipova JCV, gde je genotip 1 dominantan i praćen genotipovima 2 i 4, je takođe utvrđen i u nekim drugim evropskim zemljama (Schaffer i sar., 2006., Kmiecik i sar., 2008., Matos i sar., 2010., Agostini i sar., 2001.). Međutim, za razliku od ovih istraživanja gde je genotip 1 praćen genotipom 4, u ovom istraživanju dominantan genotip 1 je praćen genotipom 2 pa genotipom 4. Tri različita subgenotipa genotipa 2 su otkrivena u Srbiji: 2B, 2C i 2D. Subgenotipovi 2A i 2C dominiraju u severnoistočnoj Aziji (Agostini i sar., 1997.), subgenotip 2B je evroazijski tip dok je 2D indijski tip (Cui i sar., 2004). Moguće objašnjenje za dominaciju genotipa 2 u odnosu na genotip 4 u našoj populaciji možda leži u istoriji i geografskom položaju Srbije. Naime, Srbija se nalazi na raskrsnici puteva Evrope i Azije i tokom cele svoje istorije bila je pod uticajem brojnih osvajača sa istoka i zapada što je vremenom dovelo i do imigracije stanovnika sa Bliskog istoka koji su sa sobom nosili evroazijski tip, tip 2B. Više-vekovno prisustvo osvajača sa istoka i sledstveno mešanje sa lokalnim stanovništvom dovelo je do veće učestalosti tipa 2 u odnosu na tip 4 među stanovništvom Srbije. Imajući u vidu današnju veliku migraciju stanovništva ka Evropskom kontinentu, veliki priliv imigranata iz Azije može u budućnosti promeniti sliku distribucije JCV genotipova u Evropi i Srbiji.

Interesantno, situacija sa distribucijom genotipova JCV se menja kada se u celu priču uključe i imunodeficienti pacijenti. Lednicky i sar., (2003) su na osnovi rezultat svojih istraživanja utvrdili da se distribucija genotipova JCV razikuje između zdravih donora i HIV-inficiranih pacijenata. I u ovom istraživanju je utvrđena razlika u distribuciji genotipova JCV između dve ispitivane grupe. Naime, među HIV-inficiranim pacijentima najčešće otkrivan genotip je bio genotip 2, praćen genotipovima 1 i 4. Ovakvu distribucija genotipova JCV među HIV-inficiranim pacijentima predhodno su u svojim istraživanjima utvrdili i Schaffer i sar., (2006) kao i Matos i sar., (2010). Imajući u vidu povezanost genotipova JCV sa određenim etničkim grupama, za očekivati je da ljudi koji naseljavaju istu oblast i

pripadaju istoj etničkoj grupi budu inficirani s istim genotipom JCV bez obzira da li su imunodeficijenti ili ne. Međutim, zašto je genotip 2 najčešće otkrivan genotip među HIV-inficiranim pacijentima u odnosu na zdravu populaciju u Evropi, je još uvek otvoreno pitanje bez pravog odgovora. Postoji nekoliko hipoteza koje pokušavaju da objasne razlog povećane frekvence JCV genotipa 2 kod imunosuprimiranih pacijenata. Jedno od predloženih objašnjenja je da imunosupresija utiče na efikasniju replikaciju genotipa 2. Naime, smatra se da je procent populacije koji je inficiran sa više od jednim tipom JCV mnogo veći od uočenog, a da upravo imunosupresivno stanje omogućava efikasniju replikaciju genotipa 2 (Schaffer i sar., 2006.). Drugo objašnjenje, mada manje verovatno, je da mutacije koje nastaju u okviru VP1 kodirajućeg regiona tokom imunosupresivnog stanja mogu dovesti do promene genotipa JCV (Schaffer i sar., 2006.). Poslednja od predloženih hipoteza je da imunosupresivno stanje omogućava sekundarnu JC infekciju i da je tip 2 taj koji najčešće dovodi od superinfekcije (Ferrante i sar., 2001.).

Veća učestalost genotipa 2 je značajan podatak pošto su rezultati nekih predhodnih studija utvrdili da je genotip 2, pre svega subgenotip 2B, najčešće otkrivan tip JCV u moždanom tkivu pacijenata obolelih od PML-a (Agostini i sar., 1998a., Ferrante i sar., 2001.). Takođe, infekcija sa genotipom 2 četverostruko povećava rizik za nastanak PML u odnosu na infekciju sa nekim drugim genotipom (Agostini i sar. 1998a.). Jedno od objašnjenja za odsustvo PML-a među AIDS pacijentima u Africi je upravo nepostojanje genotipa 2 u Africi (Chima i sar., 1999.). S druge strane, genotip 4 se jako retko otkriva u moždanom tkivu obolelog od PML-a i smatra se da ima ograničenu neurovirulenciju (Agostini i sar., 1998a.).

Zanotta i sar., 2013, su u svom istraživanju utvrdili statističku povezanost između genotipa 2 i pacijenata na imunomodulatornoj terapiji. Naime, u grupi pacijenta koji su za lečenje svoje osnovne bolesti koristili imunomodulatorne lekove, genotip 2 JCV je mnogo češće otkrivan u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika koji nisu bili na ovoj terapiji. Selekcija JCV genotipova je odgovor na pritisak koji imunomodulatorni lekovi vrše na imunski sistem. Može se pretpostaviti da slični

mehanizmi dovode do selekcije JCV genotipova u toku imunosupresivnog stanja koje je posledica HIV infekcije.

Određivanje distribucije JCV genotipova u imunokompetetnoj tj. zdravoj populaciji ima pre svega ulogu markera u praćenju migracije stanovništva, dok se distribucija genotipova u populaciji imunosuprimiranih ne može koristiti u te svrhe, jer imunosupresivno stanje dovodi od promene u distribuciji. Određivanje JCV genotipova kod HIV-inficiranih pacijenata ima kliničko-prognostički značaj upravo zbog povezanosti genotipova i nastanka PML (Ferrante i sar., 2001., Zanotta i sar., 2013.). Genotipizacija JCV izolata kod HIV-inficiranih pacijenata može poslužiti za izdvajanje pacijenata koji nose "nepovoljni" genotip za nastanak PML kako bi se modulacijom HAART terapije kod njih smanjila replikacija virusa i rizik za nastanak PML-a.

Faktori koji utiču na neurotropizam i neuroviruenciju JCV nisu još uvek u potpunosti razjašnjeni. Postoji ideja da se mogući prognostički markeri za nastanak PML-a nalaze u okviru polimorfnih regiona JCV genoma (Sala i sar., 2001.). U ovom istraživanju posebna pažnja je posvećena NCRR i VP1 polimorfnim regionima JCV koji imaju fundamentalnu ulogu u regulaciji virusne transkripcije i interakciji virus domaćin.

VP1 JCV se sastoji od pet spoljašnjih domena (BC, CD, DE, EF, GH i HI) koji su međusobno povezani β -pločama (β -C, β -D, β -E, β -F) (Dugan i sar., 2007.). Spoljašnji domeni BC i HI su najvažniji domeni VP1 proteina i imaju ulogu u vezivanju za sijalinsku kiselinu N-vezujućih glikoproteina na površini ciljnih ćelija za JCV.

Sunyaev i sar., (2009) su u svom istraživanju identifikovali četiri kodona JCV (koje odgovaraju aminokiselinama na poziciji 55, 60, 267 i 269) koji podležu pozitivnom selekcionom pritisku od strane imunskog odgovora kod PML pacijenata. Dve delecije od osam i devet aminokiselina u okviru DE domena (AK 125-132 i AK 127-134) su opisane kao dominantne JCV forme kod dva AIDS pacijenta sa PML-om (Stoner i Ryschkewitsch, 1995.). Kod oba pacijenta, JCV klon sa delecijom aminokiselina pokazao je bolji evolutivni fitnes i replikacionu prednost u odnosu na forme bez delecije.

U ovom istraživanju, JCV VP1 se pokazao kao visoko konzerviran region, bez delecija (Stoner i Ryschkewitsch., 1995.) i drugih većih genetičkih izmena poput insercija ili duplikacija. Međutim, izmene u vidu tačkastih mutacija su otkrivene u ovom regionu u obe grupe ispitanika. Mutacije su otkrivene u okviru DE receptorskog domena i u okviru β -ploča. Kod 20% HIV-inficiranih pacijenata otkriveno je 10 mutacija. Najveći broj mutacija čak 70% je otkriven van receptorskih domena u tzv. β -pločama, dok je preostalih 30% mutacija otkriveno u DE domenu VP1. Mutacije u DE domenu su otkrivene na pozicijama 128 i 131. Kod 13,5% ispitanika kontrolne grupe otkrivena je jedna mutacija u okviru DE domena i četiri mutacije u okviru β -ploča. Najčešća mutacija u obe grupe ispitanika je bila L157V otkrivena van receptorskih domena JCV. Spoljašnji domeni JCV VP1 ne sadrže samo mesta za vezivanje za ćelijske receptore (Gee i sar., 2004.), već epitope koje prepoznaju anti-JCV antitela (Chang i sar., 1996.). Mutacije u okviru epitopa koji su ključni za vezivanje neutrališućih antitela mogu stvoriti varijante JCV koje se nesmetano diseminuju po organizmu i inficiraju ciljne ćelije.

Mera nesinonimnih izmena po neisnonimnom mestu tj. vrednost dN određena je za protein kodirajuće sekvence celog sekvenciranog VP1 regiona i posebno za DE receptorski domen VP1 u obe grupe ispitanika. dN i dS vrednosti DE receptorskih domena kod HIV-inficiranih pacijenata su bile nekoliko puta više od dN i dS vrednosti za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona, ukazujući da je ovaj deo genoma pod većim uticajem selekcionog pritiska imunskog odgovora.

Nijedna od 4 mutacije koje Sunyaev i sar., (2009) označavaju kao prognostičke markere za PML nije otkrivena u ovom istraživanju. JCV se sa mesta primarne latencije do CNS-a transportuje preko krvi u B limfocitima i najverovatnije u njima dolazi do rearanžiranje i nastanka mutacija koje su karakteristične za PML-a. U ovom istraživanju svi uzorci HIV-inficiranih pacijenta su bili urini i to je mogući razlog zašto nijedna mutacija koja je karakteristika PML nije otkrivena.

Dva osnovna oblika NCRR JCV su arhetip i rearanžirana varijanta. Usled promena u imunskom sistemu domaćina, arhetip varijanta NCRR JCV podleže

manjim ili većim adaptivnim promenama u vidu tačkastih mutacija, delecija i duplikacija koje stvaraju nove varijante JCV koje se brže replikuju i mogu dovesti do izmene tropizma virusa (Ault i Stoner, 1993.). Svaka sekvenca NCRR koja ima bazičnu građu A36B23C55D66E18F69 se naziva arhetip varijanta (Berger, 2003., Ault i Stoner, 1993.). Rearanžirana varijanta nastaje iz arhetip forme kao posledica značajnijih adaptivnih promena poput delecija ili duplikacija celih ili delimičnih blokova NCRR (Sharma i sar., 2007.). Danas prisutna hipoteza je da su rearanžirane forme NCRR neopodne za započinjanje i/ili razvoj neuroloških oboljenja, koja se dovode u vezu sa reaktivacijom JCV pre svega do nastanka PML. Dok se arhetip varijanta NCRR skoro uvek otkriva u urinu kako zdravih tako i imunosuprimiranih pacijenata i nije infektivna za kuturu ćelija, rearanžirana varijante su otkrivene u moždanom tkivu i drugim organima obolelih od PML-a, ali ne i u urinu (Marshall i Major, 2010., Sabath i Major, 2002., White i Khalili, 2011.). Pošto su identične rearanžirane varijante NCRR otkrivene u likvoru i krvi obolelog od PML-a, a u urinu arhetip varijanta (Pfister i sar., 2001.), pretpostavka je da pre nastanka PML, JCV migrira iz krvi do CNS-a i da se rearanžiranje najverovatnije odigrava u krvi tj. u B limfocitima uz pomoć enzima Rag1 i Rag2 koji vrše rearanžiranje imunoglobulinskog gena (Monaco i sar., 1996., Dorries i sar., 1994.).

U ovom istraživanju sve NCRR analizirane sekvence u obe grupe ispitanika imale su arhetip formu sa manjim međusobnim razlikama kao posledica tačkastih mutacija i delecija pojedninačnih nukleotida. Kao najvarijabilniji delovi NCRR pokazali su se blokovi B, C i F u okviru kojih se nalaze vezujuća mesta za transkripcione faktore NF i Sp-1 familije. Pošto su u ovom istraživanju svi uzoci bili urini, otkrivanje samo arhetip varijante NCRR je u skladu sa rezultatima predhodnih studija (Marshall i Major, 2010., Sabath i Major, 2002., White i Khalili, 2011.).

Na osnovu polimorfizma u okviru BC receptorskog domena VP1 gena BKV, svi BKV izolati su klasifikovani u četiri subtipa. Iako su se ispitanici uključeni u ovo istraživanje razlikovali u kliničkom statusu, distribucija subtipova je bila slična u obe grupe: HIV-inficirani pacijenti i ispitanici kontrolne grupe. Predhodna istraživanja

su već pokazala da klinički status ispitanika ne utiče na distribuciju BKV subtipova i subgrupa (Chen i sar., 2006.).

Neke studije su pokazale povezanost između distribucija BKV subtipova i migracije stanovništva. Hipoteza o koevolucije BKV i ljudske populacije ima svoje uporište u trenutnoj geografskoj distribuciji BKV subtipova i subgrupa (Yogo i sar., 2009., Zhong i sar., 2009.). U okviru subtip I, koje je široko rasprostranjen u celom svetu, razlikuju se četiri subgrupe (Ia, Ib1, Ib2 i Ic) sa jedinstvenom geografskom distribucijom: Ia je dominantan u Africi, Ib1 u Južnoj i Istočnoj Aziji, Ib2 u Evropi, a Ic u Severnoj Aziji (Ikegaya i sar., 2006., Takasaka i sra., 2004., Zheng i sar., 2007.). Subtip IV je podeljen na šest subgrupa (IVa1, IVa2, IVb1, IVb2, IVc1, IVc2) (Nishimoto i sar., 2007.) i sve subgrupe izuzev IVc2 su dominantne među stanovnicima Istočne Azije, dok je subgrupa IVc2 rasprostanjena u Evropi i Severnoistočnoj Aziji (Nishimoto i sar., 2007.). Subtipovi II i III se jako retko otkrivaju među BKV izolatima bilo gde u svetu (Nishimoto i sar., 2007., Zheng i sar., 2007.).

Među ispitanicima obe grupe ovog istraživanja dominantan BKV subtip je bio subtip I, praćen subtipom IV. Subtipovi II i III nisu otkriveni. U okviru subtipa I, subgrupa Ib2 je najčešće otkrivan tip BKV kako među HIV-inficiranim pacijentima (42%) tako i među ispitanicima kontrolne grupe (55%). Subgrupa Ib2 je karakteristika Evropljana kao i njihovih potomaka i najčešći je otkriven tip BKV u Evropi (Yogo i sar., 2009.). Ovakav obrazac distribucije BKV subtipova, gde je subtip I najčešći i praćen subtipom IV, odgovara distribuciji BKV subtipova na Evropskom kontinentu (Zheng i sar., 2007., Krumbholz i sar., 2006., Ikegaya i sar., 2006.).

Klinički značaj određivanja subtipova i subgrupa BKV jos uvek nije utvrđen, ali se smatra da postoji moguća povezanost između određenih BKV subtipova i specifičnih oboljenja (Tremolada i sar., 2010., Matsuda i sar., 2011.). Na primer, Matsuda i sar., (2011) su utvrdili pozitivnu korelaciju između infekcije sa BKV subtipovima II, III i IV i povećanog rizika za nastanak BKV-udružene nefropatije.

Genetičke karakteristike domaćina i varijabilnost VP1 regiona i NCRR virusa u kombinaciji sa imunosupresivnim stanjem mogu dovesti do selekcije agresivnijih

formi BKV koji imaju najbolju šansu da se šire po organizmu domaćina i dovode do infekcije i drugih organa osim bubrega (Sharma i sar., 2007.).

Pored toga što je značajan za utvrđivanje subtipova i subgrupa, BKV VP1 gen je često mesto za nastanak tačkastih mutacija. Mutacije u ovom regionu mogu da izmene biološke karakteristike virusa u korist agresivnijih varijanti BKV (Dugan i sar., 2007., Tremolada i sar., 2012., Bauer i sar., 1995.). Sekundarna T ćelijska imunodeficijencija, glavna karakteristika HIV infekcije, je ključni faktor u reaktivaciji BKV koja dovodi do povećanog obima replikacije. Veliki obim replikacije BKV kod HIV-inficiranih pacijenata povećava stopu replikacione greške DNK polimeraze i stvara povoljnu sredinu za nastanak tačkastih mutacija (Darbinyan i sar., 2004., Hirsch i Steiger, 2003.).

BKV VP1 se sastoji od pet spoljašnjih receptorskih domena (BC, CD, EF, GH, HI) i β -ploča (β -C, β -D, β -E, β -F) koje povezuju domene. Ranije studije su pokazale da BC i HI domeni imaju ključne uloge u vezivanju virusa za receptor na površini ćelije (Dugan i sar., 2007.) Mutacije u VP1, posebno u spoljašnjim domenima, mogu dovesti do stvaranja novih varijanti BKV sa izmenjenim tropizmom (Neu i sar., 2013.).

U ovom istraživanju, aminokiselinske izmene otkrivene su u obe grupe ispitanika u okviru BC receptorskog domena BKV sa izuzetkom par mutacija koje su otkrivene u β -pločama. U kontrolnoj grupi kod 30% ispitanika otkrivene su samo tri mutacije (Y89N, Q117K i V120G) jedinstvene za svakog ispitanika u okviru β -pločavan receptorskih domena. S druge strane, 7 različitih mutacija je otkriveno kod 34,5% HIV-inficiranih pacijenata. Šest ovih mutacija je otkriveno u BC receptorskom domenu VP1 i samo jedna u β -pločama. Od 7 otkrivenih mutacija, 3 mutacije (E73K, E82Q i E82D) su bile poznate i objavljene u nekim ranijim studijama (Tremolada i sar., 2010., Krautkrämer i sar., 2009.), dok su preostale 4 (D60H, E61K, F76Y i I121M) prvi put opisane u ovom istraživanju. Najčešća mutacija je bila E82D, otkrivena kod 13 izolata BKV HIV-inficiranih pacijenata u okviru BC domena. Ova mutacija je takođe opisana kao najčešća otkrivena mutacija kod pacijenta sa transplantiranim bubregom (Krautkrämer i sar., 2009.). Svi HIV-

inficirani pacijenti kod kojih su otkrivene mutacije su imali manje od 200 CD4+ ćelija. Dugan i sar., (2007) su na osnovu rezultata svojih istraživanja predložili teoriju da mutacije na pozicijama 73 i 82 ne utiču na virusnu replikaciju, dok mutacije na pozicijama 61, 64, 65 i 69 dovode do nestabilnosti kapsida i defektnog vezivanja virusa za ciljnu ćeliju *in vitro*.

dN vrednosti BC receptorskih domena kod HIV-inficiranih pacijenata su bile više od dN vrednosti za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona, ukazujući da je ovaj deo genoma pod većim uticajem selekcionog pritiska imunskog odgovora.

VP1 je jedina strukturna komponenta intaktnog viriona koja je direktno dostupna imunskom sistemu i mutacije u VP1 mogu da izmene imunološke karakteristike BKV. Upravo region VP1 kapsida poliomavirusa se nalazi pod jakim selektivnim pritiskom što dovodi od nakupljanja mutacija u epitopima VP1 kapsida i izbegavanja dejstva neutrališućih antitela (Pastrana i sar., 2012.). Ove mutacije mogu biti posledica delovanja nekoliko faktora kao što su imunosupresivno stanje u kombinaciji sa genetičkim faktorima virusa i domaćina, a veoma su važne imajući na umu krucijalnu ulogu BC domena u životnom ciklusu BKV.

Pored VP1 gena, NCRR je drugi region u genomu BKV koji ima ulogu u interakciji virus domaćin i regulaciji virusne transkripcije. Klinički izolati BKV obično sadrže tačkaste mutacije, delimične i/ili potune delecije i/ili duplikcije u okviru P, Q, R i S blokova koji čine nekodirajući kontrolni region (NCRR) BKV (Moens i Van Ghelue, 2005., Sharma i sar., 2007.). Postoje dve osnovne varijante NCRR: arhetip i rearanžirana. Smatra se da arhetip varijanta BKV dovodi do primarne infekcije, uspostavljanja latencije u bubrezima i da se izlučuje putem urina u toku reaktivacije. Rearanžirane varijante BKV, za koju se smatra da nastaje od arhetip varijante, imaju povećan broj vezujućih mesta za transkripcione faktore u okviru NCRR i mogu dovesti do selektivne prednosti rearanžiranih varijanti zbog povećanog obima replikacije i izmenjenog tkivnog tropizma. Takođe, rearanžirane forme su otkrivene i u urinu upućujući na to da i ove varijante mogu imati ulogu u transmisiji virusa u populaciji (Heritage i sar., 1981., Apperley i sar., 1987.).

Obe varijante NCRR BKV se mogu otkriti i kod zdravih i kod imunosuprimiranih pacijenata kako u urinu tako i u drugim biološkim tečnostima i organima. Prisustvo rearanžiranih formi kod zdravih je moguće objasniti delovanjem selekcionog pritiska na koji virus odgovara izmenom genetičke strukture kako bi se adaptirao na nove uslove sredine (Sharma i sar., 2007.). Kod zdravih osoba, rearanžirane forme uglavnom imaju delecije u R bloku. Delecije u R bloku mogu dovesti do gubitka vezujućih mesta za transkripcione faktore NF-1 familije kao i modifikacije Sp-1 vezujućih mesta što sve zajedno utiče na efikasnost virusne transkripcije (Degener i sar., 1999.). Barcena-Panero i sar., (2012) su u likvoru neuroloških pacijenata otkrili i arhetip i rearanžirane forme čija je struktura bila veoma slična strukturi BKV izolata pacijenata bez neuroloških oboljenja. Izgleda da rearanžirane forme NCRR BKV nisu neophodan uslov za virusnu replikaciju u nervnom tkivu i nastanku BKV-udruženih neuroloških oboljenja. Ova hipoteza je u skladu sa rezultatima predhodnih istraživanja gde je utvrđeno da rearanžirane forme nisu neophodne za nastanak hemoragijskog cistitisa i poliomavirus-udružene nefropatije (Boldorini i sar., 2005., Carr i sar., 2006., Randhawa i sar., 2003., Sharma i sar., 2007.).

U ovom istraživanju u uzorcima urina obe grupe ispitanika utvrđeno je prisustvo arhetip varijante NCRR BKV što je u skladu sa predhodnim studijama (Moens i Rekvig, 2001.). Arhetip varijanta NCRR je ona varijanta koja liči na sekvencu BKV ww izolata i ima bazičnu arhitekturu P68Q39R63S63. Samo promene manjeg obima su otkrivene u NCRR poput pojedinačnih delecija i insercija kao i brojne nukleotidne izmene. Osamdeset odsto izolata HIV-inficiranih pacijenata imalo je nukleotidne izmene, delecije i insercije u NCRR, dok su promene manjeg obima u NCRR otkrivene kod 50% izolata ispitanika kontrolne grupe. Kao najvarijabilniji blokovi pokazali su se R i S blok. Kod 70% izolata u S bloku su otkrivene tačkaste mutacije, dok su kod 56,6% otkrivene u R bloku. Pošto u ovom istraživanju HIV-inficirani pacijenti nisu imali BKV-udružena oboljenja otkrivanje samo arhetip varijante sa minimalnim promenama u vidu tačkastih mutacija kao posledica „zamora“ DNK polimeraze zbog povećanog obima replikacije je u skladu sa podacima iz literature (Moens i Rekvig, 2001.).

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima a na osnovu rezultata istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

- Kod HIV-inficiranih pacijenata BK virurija iznosila je 50,8%, dok je JC virurija iznosila 43,8%. BK i JC virurija su se statistički značajno češće otkrivale u grupi HIV-inficiranih pacijenata u odnosu na ispitanike kontrolne grupe.
- U obe ispitivane grupe JC virurija je bila češća kod muškog pola. Godine starosti imale su uticaj na frekvenciju JC i BK virurije i frekvencija je rasla sa godinama starosti.
- Utvrđena je statistički značajna razlika u stepenu BKV virurije među CDC kliničkim kategorijama. BK virurija je značajno češća kod HIV-inficiranih pacijenata koji pripadaju C kliničkoj kategoriji.
- Kod HIV-inficiranih pacijenta koji su bili na terapiji didanozinom BK virurija je bila češća u odnosu na pacijente koji nisu primali ovaj lek.

- Među izolatima obe ispitivane grupe su identifikovana dva subtipa BKV: I i IV, iz čega se zaključuje da klinički status ispitanika ne utiče na distribuciju BKV subtipova i subgrupa. Distribucija u našoj zemlji je u skladu sa geografskom distribucijom u Evropi.
- Kod HIV-inficiranih pacijenata mutacije u BC receptorskom domenu VP1 gena BKV su bile češće i utvrđena je statistički značajna razlika u odnosu na ispitanike kontrolne grupe.
- Imunosupresija utiče na distribuciju genotipova JCV. U kontrolnoj grupi ispitanika najčešći genotipovi JCV su bili genotip 1 (43,2%), 2 (29,7%) i 4 (27,1%), što je u skladu sa poreklom i istorijom srpskog naroda. U grupi HIV-inficiranih dominantan genotip je 2 (42%), 1 (34%) i 4 (24%).
- Struktura NCRR svih izolata JCV i BKV odgovara arhetip varijanti NCRR JCV i BKV uz minimalne promene, koje nisu uticale na bazičnu strukturu.
- Kod HIV-inficiranih pacijenata vrednosti dN i dS receptorskih domena JCV i BKV u bile nekoliko puta više od dN i dS vrednosti za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona JCV kao i BKV, ukazujući da je ovaj deo genoma pod većim selekcionim pritiskom. Međutim, u svim ispitivanim grupama pozitivna selekcija nije utvrđena.

7. LITERATURA

Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol* 1996;34:159-164.

Agostini HT, Deckhut A, Jobes DV, Girones R, Schlunck G, Prost MG, i sar. Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. *J Gen Virol* 2001;82:1221-1231.

Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Singer EJ, Baumhefner RW, Stoner GL. JC virus type 2B is found more frequently in brain tissue of progressive multifocal leukoencephalopathy patients than in urine from controls. *J Hum Virol* 1998a;3:200-206.

Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. JC virus Type 1 has multiple subtypes: three new complete genomes. *J Gen Virol* 1998;79:801-805.

Agostini HT, Yanagihara R, Davis V, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. Asian genotypes of JC virus in Native Americans and in a pacific island population: markers of viral evolution and human migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14542-14546.

Ahsan N, Shah KV. Polyomaviruses: an overview. *Graft* 2001;5:9-18.

Akhgari S, Mohraz M, Azadmanesh K, Vahabpour R, Kazemimanesh M, Aghakhani A, i sar. Frequency and subtype of BK virus infection in Iranian patients infected with HIV. *Med Microbiol Immunol* 2015 Jul 4. [Epub ahead of print] doi 10.1007/s00430-015-0426-x.

Apperley JF, Rice SJ, Bishop JA, Chia YC, Krauz T, Gardner SD, i sar. Late onset hemorrhagic cystitis associated with urinary excretion of polyomavirus after bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987;43:108-112.

Ault GS, Stoner GL. Human polyomavirus JC promoter/enhancer rearrangement patterns from progressive multifocal leukoencephalopathy brain are unique derivatives of a single archetypal structure. *J Gen Virol* 1993;74:1499-1507.

Barcena-Panero A, Echevarria JE, Van Ghelue M, Fedele G, Royuela E, Gerits N i sar. BK polyomavirus with archetypal and rearranged non-coding control regions is

present in cerebrospinal fluids from patients with neurological complications. *J Gen Virol* 2012;93:1780-1794.

Barouch D, Harrison S. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J Virol* 1994;68:3982–3989.

Barouch DH, Faquin WC, Chen Y, Koralnik IJ, Robbins GK, Davis BT. BK virus-associated hemorrhagic cystitis in a Human Immunodeficiency Virus-infected patient. *Clin Infect Dis* 2002;35:326-329.

Bauer PH, Bronson RT, Fung SC, Freund R, Stehle T, Harrison SC i sar. Genetic and structural analysis of a virulence determinant in polyomavirus VP1. *J Virol* 1995;69:7925-7931.

Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Vallely PJ, Cleator GM, Khoo SH. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridisation. *J Clin Virol* 2004;29:224–229.

Berger JR, Houff S. Progressive multifocal leukoencephalopathy: lessons from AIDS and natalizumab. *Neurol Res* 2006;28:299-305.

Berger JR. Progressive multifocal leukoencephalopathy in acquired immunodeficiency syndrome: Explaining the high incidence and disproportionate frequency of the illness relative to other immunosuppressive conditions. *J NeuroVirol* 2003;9:38–41.

Binet I, Nickleit V, Hirsch HH, Prince O, Dalquen P, Gudat F, i sar. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renalgraft dysfunction and graft loss. *Transplant* 1999;67:918–922.

Boldorini R, Veggiani C, Turello E, Barco D, Monga G. Are sequence variations in the BK virus control region essential for the development of polyomavirus nephropathy? *Am J Clin Pathol* 2005;124:303–312.

Boldorini R, Zorini EO, Vigano P, Nebuloni M, Mena M, Monga G. Cytologic and biomolecular diagnosis of polyomavirus infection in urine specimens of HIV-positive patients. *Acta Cytol* 2000;44:205–210.

Carr MJ, McCormack GP, Mutton KJ, Crowley B. Unique BK virus non-coding control region (NCCR) variants in hematopoietic stem cell transplant recipients with and without hemorrhagic cystitis. *J Med Virol* 2006;78:485-493.

Carswell S, Alwine J. Simian virus agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein. *J Virol* 1986;60: 1055–1061.

Centers for Disease Control. Revised Surveillance Case Definitions for HIV Infection Among Adults, Adolescents, and Children Aged <18 Months and for HIV Infection and AIDS Among Children Aged 18 Months to <13 Years. *MMWR* 2008;57:1-8.

Chang D, Liou ZM, Ou WC, Wang KZ, Wang M, Fung CY, i sar. Production of the antigen and the antibody of the JC virus major capsid protein VP1. *J Virol Methods* 1996;59:177-187.

Chen NN, Chang CF, Gallia GL, Kerr DA, Johnson EM, Krachmarov CP, i sar. Cooperative action of cellular proteins YB-1 and Pur alpha with the tumor antigen of the human JC polyomavirus determines their interaction with the viral lytic control element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1087–1091.

Chen Q, Zheng HY, Zhong S, Ikegaya H, He HX, Wei W, i sar. Subtype IV of the BK polyomavirus is prevalent in East Asia. *Arch Virol* 2006;151:2419-2429.

Chen XS, Stehle T, Harrison SC. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J* 1998;17:3233–3240.

Chima SC, Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Lucas SB, Stoner GL. Progressive multifocal leukoencephalopathy and JC virus genotypes in West African patients with acquired immunodeficiency syndrome: a pathologic and DNA sequence analysis of 4 cases. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:395-403.

Chowdhury M, Kundu M, Khalili K. GA/GC-rich sequence confers Tat responsiveness to human neurotropic virus promoter, JCVL, in cells derived from central nervous system. *Oncogene* 1993;8:887-892.

Cubukcu-Dimopulo O, Greco A, Kumar A, Karluk D, Mittal K, Jagirdar J. BK virus infection in AIDS. *J Am J Surg Pathol* 2000;24:145-149.

Cui X, Wang JC, Deckhut A, Joseph BC, Eberwein P, Cubitt CL, i sar. Chinese strains (Type 7) of JC virus are afro-asiatic in origin but are phylogenetically distinct from the Mongolian and Indian strains (Type 2D) and the Korean and Japanese strains (Type 2A). *J Mol Evol* 2004;58:568-583.

Daniel DC, Kinoshita Y, Khan MA, Del Valle L, Khalili K, Rappaport J, i sar. Internalization of exogenous human immunodeficiency virus-1 protein, Tat, by KG-1 oligodendrogloma cells followed by stimulation of DNA replication initiated at the JC virus origin. *DNA Cell Biol* 2004;23:858-867.

Daniel DC, Wortman MJ, Schiller RJ, Liu H, Gan L, Mellen JS, i sar. Coordinate effects of human immunodeficiency virus type 1 protein Tat and cellular protein Puralpha on DNA replication initiated at the JC virus origin. *J Gen Virol* 2001;82:1543-1553.

Darbinyan A, Siddiqui KM, Slonina D, Darbinian N, Amini S, White MK, Khalili K. Role of JC virus agnoprotein in DNA repair. *J Virol* 2004;78:593-600.

Degener AM, Pietropaolo V, Di Taranto C, Jin L, Ameglio F, Cordiali-Fei P, I sar. Identification of a new control region in the genome of the DDP strain of BK virus isolated from PBMC. *J Med Virol* 1999;58:413-419.

Dhar R, Lai CJ, Khoury G. Nucleotide sequence of the DNA replication origin for human papovavirus BKV: sequence and structural homology with SV40. *Cell* 1978;13:345-358.

Doerries K. Latent and persistent polyomavirus infection. U: *Human Polyomavirus: Molecular and Clinical Perspectives*, Khalili K, Stoner GL Eds. pp. 197-235. Wiley-Liss, New York, 2001.

Dorries K, Vogel E, Gunther S, Czub S. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* 1994;198:59–70.

Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Gosert R, Wali RK, Munivenkatappa R, i sar. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: A prospective evaluation. *Transplantation* 2007;84:323–330.

Dropulic LK, Jones RJ. Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:11–18.

Dubois V, Moret H, Lafon ME, Brodard V, Icart J, Ruffault A, i sar. JC virus genotypes in France: molecular epidemiology and potential significance for progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 2001;183: 213-217.

Dugan A, Eash S, Atwood WJ. A N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor of BK virus. *J Virol* 2005;79:14442–14445.

Dugan AS, Gasparovic ML, Tsomaia N, Mierke DF, O'Hara BA, Manley K i sar. Identification of amino acid residues in BK virus VP1 that are critical for viability and growth. *J Virol* 2007;81:11798-11808.

Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:865-876.

Egli A, Binggeli S, Bodaghi S, Dumoulin A, Funk GA, Khanna N, i sar. Cytomegalovirus and polyomavirus BK posttransplant. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:72–82.

Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, i sar. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* 2009;199:837-846.

Elphick G, Querbes W, Jordan J, Gee G, Eash S, Manley K, i sar. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* 2004;306:1380–1383.

Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ, Gallo RC, Wong-Staal F. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 1990;345:84-86.

Ferrante P, Mediati M, Caldarelli-Stefano R, Losciale L, Mancuso R, Cagni AE i sar. Increased frequency of JC virus type 2 and of dual infection with JC virus type 1 and 2 in Italian progressive multifocal leukoencephalopathy patients. *J Neurovirol* 2001;7:35-42.

Ferenczy MW, Marshall LJ, Nelson CD, Atwood WJ, Nath A, Khalili K, i sar. Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:471-506.

Fernandez-Cobo M, Agostini HT, Britez G, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. Strains of JC virus in Amerind-speakers of North America (Salish) and South America (Guarani), Na-Denespeakers of New Mexico (Navajo), and modern Japanese suggest links through an ancestral Asian population. *Am J Phys Anthropol* 2002;118:154-168.

Fogazzi GB, Cantu M, Saglimbeni L. 'Decoy cells' in the urine due to polyomavirus BK Infection: easily seen by phase-contrast microscopy. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1496-1498.

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (BK) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1971;1:1253-1257.

Gee GV, Tsomaia N, Mierke DF, Atwood WJ. Modeling a sialic acid binding pocket in the external loops of JC virus VP1. *J Biol Chem* 2004;279:49172-49176.

Gorrill T, Feliciano M, Mukerjee R, Sawaya BE, Khalili K, White MK. Activation of early gene transcription in polyomavirus BK by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J Gen Virol* 2006;87:1557-1566.

Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, Egli A, Ramos E, Drachenberg CB, Hirsch HH. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med* 2008;205:841-852.

Goudsmit J, Baak ML, Sletterus KW, Van der Noordaa J. Human papovavirus isolated from urine of a child with acute tonsillitis. *Br Med J* 1981;283:1363-1364.

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

Guo J, Kitamura T, Ebihara H, Sugimoto C, Kunitake T, Takehisa J, I sar. Geographical distribution of the human polyomavirus JC virus types A and B and isolation of a new type from Ghana. *J Gen Virol* 1996;77:919-927.

Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999;41:95-98.

Harris KF, Christensen JB, Radany E, Imperiale MJ. Novel mechanisms of E2F induction by BK virus large T antigen: requirement of both the pRb binding and J domains. *Mol Cell Biol* 1998;18:1746-1756.

Hatwell JN, Sharp PM. Evolution of human polyomavirus JC. *J Gen Virol* 2000;81:1191-1200.

Hedquist BG, Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Nennesmo I, Sundelin B I sar. Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology* 1999;106:129-132.

Heritage J, Chesters PM, McCance DJ. The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. *J Med Virol* 1981;8:143-150.

Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, i sar. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 2002;347:488-496.

Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003;3:611-623.

Hou J, Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy:JC virus induced demyelination in the immune compromised host. *J Neurovirol* 2000;6:S98-S100.

Houff SA, Berger JR. The bone marrow, B cells, and JC virus. *J Neurovirol* 2008;14:341-343.

Ikegaya H, Saukko PJ, Terti R, Metsarinne KP, Carr MJ, Crowley B i sar. Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations. *J Gen Virol* 2006;87:3201-3208.

Imperiale MJ. Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives. U: *The Human Polyomaviruses: An Overview*. Khalili K, Stoner GL Eds. pp.53-71. Wiley-Liss, New York, 2001.

Jiang M, Abend J, Johnson S, Imperiale MJ. The role of polyomaviruses in human disease. *Virol* 2009;384:266-273.

Jin L, Gibson PE, Knowles WA, Clewley JP. BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. *J Med Virol* 1993;39:50-56.

Jobes DV, Chima SC, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus. *J Gen Virol* 1998;79:2491-2498.

Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, i sar. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol* 2011;156:1627-1634.

Johnson T, Nath A. Immune reconstitution inflammatory syndrome and the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 2011;24:284-290.

Kaniowska D, Kaminski R, Amini S, Radhakrishnan S, Rappaport J, Johnson E, i sar. Cross-interaction between JC virus agnoprotein and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Tat modulates transcription of the HIV-1 long terminal repeat in glial cells. *J Virol* 2006;80:9288-9299.

Kato A, Sugimoto C, Zheng HY, Kitamura T, Yogo Y. Lack of disease-specific amino acid changes in the viral proteins of JC virus isolates from the brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol* 2000;145:2173–2182.

Khalili K, White MK, Lublin F, Ferrante P, Berger JR. Reactivation of JC virus and development of PML in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2007;68:985-990.

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2011.

Kmiecik D, Debicki S, Trzeciak WH. Occurrence rate and genotype distribution of the JC virus (JCV) in a sample from the polish population. *J Med Virol* 2008;80:1079-1083.

Knowles WA, Gibson PE, Gardner SD. Serological typing scheme for BK-like isolates of human polyomavirus. *J Med Virol* 1989;28:118-123.

Knowles WA, Pillay D, Johnson MA, Hand JF, Brown DW. Prevalence of long-term BK and JC excretion in HIV-infected adults and lack of correlation with serological markers. *J Med Virol* 1999;59:474-479.

Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DW, i sar. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol* 2003;71:115-123.

Knowles WA. Discovery and epidemiology of the human polyomavirus BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv Exp Med Biol* 2006;577:19-45.

Krautkrämer E, Klein TM, Sommerer C, Schnitzler P, Zeier M. Mutations in the BC-loop of the BKV VP1 region do not influence viral load in renal transplant patients. *J Med Virol* 2009;81:75-81.

Krumbholz A, Zell R, Egerer R, Sauerbrei A, Helming A, Gruhn B, i sar. Prevalence of BK virus subtype I in Germany. *J Med Virol* 2006;78:1588-1598.

Kunitake T, Kitamura T, Guo J, Taguchi F, Kawabe K, Yogo Y. Parent-to-child transmission is relatively common in the spread of the human polyomavirus JC virus. *J Clin Microbiol* 1995;33:1448–1451.

Lafon ME, Dutronc H, Dubois V, Pellegrin I, Barbeau P, Ragnaud JM, i sar. JC virus remains latent in peripheral blood B lymphocytes but replicates actively in urine from AIDS patients. *J Infect Dis* 1998;177:1502-1505.

Ledesma J, Muñoz P, Garcia de Viedma D, Cabrero I, Loeches B, Montilla P. BK virus infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis* 2012;31:1531-1535.

Lednicky JA, Vilchez RA, Keitel WA, Visnegarwala F, White ZS, Kozinetz CA i sar. Polyomavirus JCV excretion and genotype analysis in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2003;17:801–807.

Lee KW, Lee HH, Lee DS, Kim SJ, Joh JW, Oh HY, i sar. Polymerase chain reaction for the diagnosis of human polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2004;36:2116–2117.

Li PP, Naknanishi A, Tran MA, Ishizu K, Kawano M, Phillips M, i sar. Importance of VP1 calcium binding residues in assembly, cell entry, and nuclear entry of simina virus 40. *J Virol*, 2003;77:7527-7538.

Ling PD, Lednicky JA, Keitel WA, Poston DG, White ZS, Peng R, i sar. The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults:A14-month longitudinal study. *J Infect Dis* 2003;187:1571-1580.

Liu CK, Wei G, Atwood WJ. Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an Nlinked glycoprotein containing terminal alpha 2–6 linked sialic acids. *J Virol* 1998;72:4643–4649.

Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol* 2006;80:1361-1366.

Machado DM, Fink MC, Pannuti CS, de Menezes Succi RC, Machado AA, do Carmo FB. Human polyomaviruses JC and BK in the urine of Brazilian children and adolescents vertically infected by HIV. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011;106:931-935.

Markowitz RB, Thompson HC, Mueller JF, Cohen JA, Dynan WS. Incidence of BK virus and JC virus viremia in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected subjects. *J Infect Dis* 1993;167:13-20.

Marshall LJ, Major EO. Molecular regulation of JC virus tropism: insights into potential therapeutic targets for progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010;5:404-417.

Marzocchetti A, Wuthrich C, Tan CS, Tompkins T, Bernal-Cano F, Bhargava P, i sar. Rearrangement of the JC virus regulatory region sequence in the bone marrow of a patient with rheumatoid arthritis and progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 2008;14:455-458.

Matlubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 1994;68:8056-8063.

Matos A, Duque V, Beato S, da Silva JP, Major E, Meliço-Silvestre A. Characterization of JC human polyomavirus infection in a Portuguese population. *J Med Virol* 2010;82:494-504.

Matsuda Y, Qazi Y, Iwaki Y. A Rapid and efficient method BK polyomavirus genotyping by high-resolution melting analysis. *J Med Virol* 2011;83:2128-2134.

Mengel M, Marwedel M, Radermacher J, Eden G, Schwarz A, Haller H, i sar. Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1190-1196.

Miranda JJ, Takasaka T, Zheng HY, Kitamura T, Yogo Y. JC virus genotype profile in the Mamanwa, a Philippine Negrito tribe, and implications for its population history. *Anthropol Sci* 2004;112:173-178.

Miyamura T, Jikuya H, Soeda E, Yoshiike K. Genomic structure of human polyoma virus JC: nucleotide sequence of the region containing replication origin and small-T-antigen gene. *J Virol* 1983;45:73–79.

Moens U, Johansen T, Johnsen JI, Seternes OM, Traavik T. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes* 1995;10:261-275.

Moens U, Rekvig P. Molecular biology of BK virus and clinical and basic aspects of BK virus renal infection. U: Human Polyomaviruses: Molecular And Clinical perspectives, Volume 1. Khalili K, Stoner GL Eds. pp. 359–408. Wiley-Liss, New York, 2001.

Moens U, Van Ghelue M. Polymorphism in the genome of nonpassaged human polyomavirus BK: Implications for cell tropism and the pathological role of the virus. *Virology* 2005;331:209–231.

Monaco MC, Atwood WJ, Gravell M, Tornatore CS, Major EO. JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. *J Virol* 1996;70:7004–7012.

Nali LHS, Centrone CC, Urbano PRP, Penalva De Oliveira AC, Vidal JE, Miranda EP, I sar. High prevalence of the simultaneous excretion of polyomaviruses JC and BK in the urine of HIVinfected patients without neurological symptoms in Sao Paulo, Brazil *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2012;54:201-205.

Neu U, Allen SA, Blaum BS, Liu Y, Frank M, Palma AS, i sar. A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets BK polyomavirus. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003688.

Nickeleit V, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: an update on an escalating threat. *Transpl Int* 2006;19:960–973.

Nickeleit V, Singh HK, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003;12:599–605.

Nishimoto Y, Zheng HY, Zhong S, Ikegaya H, Chen Q, Sugimoto C, i sar. An Asian origin for subtype IV BK virus based on phylogenetic analysis. *J Mol Evol* 2007;65:103–111.

Padgett B, Zu Rhein G, Walker D, Echroade R, Dessel B. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1971;1:1257–1260.

Pagani E, Delbue S, Mancuso R, Borghi E, Tarantini L, Ferrante P. Molecular analysis of JC virus genotypes circulating among the Italian healthy population. *J Neurovirol* 2003;9:559-566.

Pastrana DV, Brennan DC, Cuburu N, Storch GA, Viscidi RP, Randhawa PS, i sar. Neutralization serotyping of BK polyomavirus infection in kidney transplant recipients. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002650.

Pho MT, Ashok A, Atwood WJ. JC Virus enters human glial cells by clathrin dependent receptor mediated endocytosis. *J Virol* 2000;74:2288–2292.

Polo C, Pérez JL, Mielnichuck A, Fedele CG, Niubň J, Tenorio A. Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:640-644.

Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008;25:1253-1256.

Raghava S, Giorda KM, Romano FB, Heuck AP, Hebert DN. The SV40 late protein VP4 is a viroporin that forms pores to disrupt membranes for viral release. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002116.

Rambaut A. FigTree 1.3.1. 2010. [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>]

Randhawa P, Zemlicka J, Sauerbrei A, Meier C, Hostetler KY, Beadle JR, I sar. Anti-BK Virus Activity of Nucleoside Analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1519-1521.

Randhawa P, Zygmunt D, Shapiro R, Vats A, Weck K, Swalsky P, Finkelstein S. Viral regulatory region sequence variations in kidney tissue obtained from patients with BK virus nephropathy. *Kidney Int* 2003;64:743-747

Rodrigues C, Pinto D, Medeiros R. Molecular epidemiology characterization of the urinary excretion of polyomavirus in healthy individuals from Portugal-A Southern European population. *J Med Virol* 2007;79:1194-1198.

Rossi A, Delbue S, Mazziotti R, Valli M, Borghi E, Mancuso R i sar. Presence, quantitation and characterization of JC virus in the urine of Italian immunocompetent subjects. *J Med Virol* 2007;79:408-412.

Sabath BF, Major EO. Traffic of JC virus from sites of initial infection to the brain: the path to progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 2002;186:S180-S186.

Sala M, Vartanian JP, Kousignian P, Delfraissy JF, Taoufik Y, Wain-Hobson S, i sar. Progressive multifocal leukoencephalopathy in human immunodeficiency virus type 1-infected patients: absence of correlation between JC virus neurovirulence and polymorphisms in the transcriptional control region and the major capsid protein loci. *J Gen Virol* 2001;82:899-907.

Sanger F, Nichlen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-5467.

Saruwatari L, Sugimoto C, Kitamura T, Ohno N, Sakai E, Shresta P, i sar. Asian domains of four major genotypes of JC virus, Af2, B1-b, CY and SC. *Arch Virol* 2002;147:1-10.

Schaffer K, Sheehy N, Coughlan S, Bergin C, Hall WW. JC virus in the Irish population: significant increase of genotype 2 in immunocompromised individuals. *J Neurovirol* 2006;12:39-46.

Shakiba E, Yaghobi R, Ramzi M. Prevalence of viral infections and hemorrhagic cystitis in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Exp Clin Transplant* 2011;9:405–412.

Shan KV, Ozer HL, Ghazey HN, Kelly TJ. Common structural antigen of papovaviruses of the simian virus 40-polyoma subgroup. *J Virol* 1977;21:179-186.

Sharma PM, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Randhawa PS . Polyomavirus BK non-coding control region rearrangements in health and disease. *J Med Virol* 2007;79:1199-1207.

Stoner G, Jobes D, Fernandez Cobo M, Agostini HA, Chima SC, Ryschkewitsch CF. JC virus as a marker of human migration to the Americas. *Microbes Infect* 2000;2:1905–1911.

Stoner GL, Ryschkewitsch CF. Capsid protein VP1 deletions in JC virus from two AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 1995;1:189-194.

Stubdal H, Zalvide J, Campbell KS, Schweitzer C, Roberts TM, DeCaprio JA. Inactivation of pRB-related proteins p130 and p107 mediated by the J domain of simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* 1997;17:4979–4990.

Sugimoto C, Hasegawa M, Kato A, Zheng HY, Ebihara H, Taguchi F, i sar. Evolution of human polyomavirus JC: implications for the population history of humans. *J Mol Evol* 2002;54:285–297.

Sugimoto C, Ito D, Tanaka K, Matsuda H, Saito H, Sakai H, i sar. Amplification of JC virus regulatory DNA sequences from cerebrospinal fluid: diagnostic value for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol* 1998;143:249–262.

Sugimoto C, Kitamura T, Guo J, Al-Ahdal MN, Shchelkunov SN, Otova B, i sar. Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means for tracing human migrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9191–9196.

Sukov W, Lewin M, Sethi S, Rakowski TA, Lager DJ. BK virus associated nephropathy in a patient with AIDS. *Am J Kidney Dis* 2008;51:e15-e18.

Sundsford A, Flaegstad T, Flø R, Spein AR, Pedersen M, Permin H i sar. BK and JC viruses in human immunodeficiency virus type 1-infected persons: prevalence, excretion, viremia, and viral regulatory regions. *J Infect Dis* 1994;169:485-440.

Sunyaev SR, Lugovskoy A, Simon K, Gorelik L. Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *PLoS Genet* 2009;5:e1000368.

Takasaka T, Goya N, Tokumoto T, Tanabe K, Toma H, Ogawa Y, i sar. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *J Gen Virol* 2004;85:2821-2827.

Takasaka T, Miranda JJ, Sugimoto C, Paraguison R, Zheng HY, Kitamira T, i sar. Genotypes of JC virus in Southeast Asia and the western Pacific: implications for human migrations from Asia to the Pacific. *Anthropol Sci* 2004;112:53-59.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei N, Kimura S. MEGA5. Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-2739.

Tan CS, Korallnik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol* 2010;9: 425-437.

Tremolada S, Delbue S, Castagnoli L, Allegrini S, Miglio U, Boldorini R i sar. Mutations in the external loops of BK virus VP1 and urine viral load in renal transplant recipients. *J Cell Physiol* 2010;222:195-199.

White MK, Khalili K. Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy--revisited. *J Infect Dis* 2011;203:578-586.

White MK, Khalili K. Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy--revisited. *J Infect Dis* 2011;203:578-586.

Yanagihara R, Nerurkar VR, Scheirich I, Agostini HT, Mgone CS, Cui X, i sar. JC virus in the western Pacific suggests Asian mainland relationships and virus association with early population movements. *Hum Biol* 2002;74:473–488.

Yogo Y, Sugimoto C, Zhong S, Homma Y. Evolution of the BK polyomavirus: Epidemiological, anthropological and clinical implications. *Rev Med Virol* 2009;19:185-199.

Zalona AC, Lopes GS, Schrago CG, Gonçalves RT, Zalis MG, Varella RB. Molecular characterization of BK polyomavirus subtypes in renal transplant recipients in Brazil. *J Med Virol* 2011;83:1401-1405.

Zanotta N, Delbue S, Rossi T, Pelos G, D'Agaro P, Monasta L, i sar. Molecular epidemiology of JCV genotypes in patients and healthy subjects from Northern Italy. *J Med Virol* 2013;85:1286-1292.

Zheng HY, Sugimoto C, Hasegawa M, Kobayashi N, Kanayama A, Rodas A, i sar. Phylogenetic relationships among JC virus strains in Japanese/Koreans and Native Americans speaking Amerind or Na-Dene. *J Mol Evol* 2003;56:18–27.

Zheng, HY, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, Ikegaya H, i sar. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect* 2007;9:204–213.

Zhong S, Randhawa PS, Ikegaya H, Chen Q, Zheng HY, Suzuki M, i sar. Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. *J Gen Virol* 2009;90:144-152.

Zhong S, Zheng HY, Suzuki M, Chen Q, Ikegaya H, Aoki N, I sar. Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. *J Clin Microbiol* 2007;45:193-198.

Zurhein G, Chou SM. Particles Resembling Papova Viruses in Human Cerebral Demyelinating Disease. *Science* 1965;148:1477-1479.

Spisak skraćenica korišćenih u tekstu

- ❖ AIDS – engl. Acquired Immune Deficiency Syndrome
- ❖ AK - aminokiselina
- ❖ BKV - BK virus
- ❖ bp – bazni par
- ❖ CDC – engl. Centers for Disease Control and Prevention
- ❖ CTL – citotoksični T limfocit
- ❖ EDTA – etilen-diamino-tetrahlorna kiselina
- ❖ GenBank/EMBL/DDBJ – genska internet baza podataka
- ❖ HAART – engl. Highly active antiretroviral therapy (Visoko aktivna antiretrovirusna terapija)
- ❖ HC – hemoragijski cistitis
- ❖ HIV – virus humane imunodeficijencije
- ❖ ICTV – engl. International Committee on Taxonomy of Viruses
- ❖ JCV – JC virus
- ❖ kbp – kilo bazni par
- ❖ KIV - Karolinska Institute polyomavirus
- ❖ NCBI - National Center for Biotechnology Information
- ❖ NCRN – nekodirajući regulatorni region
- ❖ nt - nukleotid
- ❖ PBS – phosphate-buffered saline (sterilni fiziološki rastvor)

- ❖ PCR – polymerase chain reaction (Reakcija lančanog umnožavanja)
- ❖ PML – Progresivna multifokalna leukoencefalopatija
- ❖ pRb – protein retinoblastoma
- ❖ PVN – poliomavirus udružena nefropatija
- ❖ T-Ag – veliki T antigen
- ❖ VP1 – virusni protein 1
- ❖ VP2 – virusni protein 2
- ❖ VP3 – virusni protein 3
- ❖ WUV - Washington University poliomavirus

Spisak skraćena naziva aminokiselina

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

BIOGRAFIJA

Danijela (Zoran) Karalić rođena je 30. 09.1984. u Ivanjici, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu kao redovan student upisuje školske 2003/04. godine, a završava juna 2010. godine, sa prosečnom ocenom 9,69. U julu 2010. započinje obavezan lekarski staž u Kliničkom centru Srbija nakon koga 1. marta 2011. godine polaže državni ispit.

Doktorske studije Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna medicina upisuje školske 2010/2011. godine.

Od juna 2010. do jula 2011. Danijela Karalić je volontirala u Virusološkoj laboratoriji, Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od 1. jula 2011. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Medicinski značaj genetičke varijabilnosti virusa“ (OI175073). U zvanje istraživač saradnik izabrana je marta 2013. godine odlukom Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Maja 2014. godine izabrana je za saradnika u nastavi na Katedri za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Specijalizaciju iz Medicinske mikrobiologije upisala je u decembru 2014. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Autor je 22 stručna rada iz mikrobiologije, i to 10 *in extenso* i 12 u vidu izvoda sa međunarodnih i domaćih stručnih sastanaka.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a **Karalić Danijela**

broj upisa MM-02/10

Izjavljujem

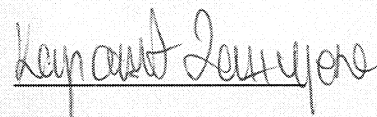
da je doktorska disertacija pod naslovom

**„Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku
varijabilnost kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa“**

- 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 doktoranda

U Beogradu, 16.10.2015.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Danijela Karalić

Broj upisa: MM-02/10

Studijski program: Molekulrana medicina

Naslov rada: "Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa"

Mentor: Doc. dr Ivana Lazarević

Potpisani: Danijela Karalić

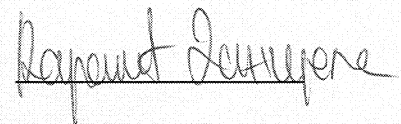
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 16.10.2015.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la 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 odlučio/la.

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 16.10.2015.

