

# Rekombinacija virusnih genomskih RNA

---

Lecher, Alen

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:389299>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Alen Lecher

# **Rekombinacija virusnih genomskih RNA**

Završni rad

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa molekularne biologije na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dijana Škorić.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Rekombinacija virusnih genomskih RNA

Alen Lecher

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*U ovome radu opisuju se temeljna saznanja o rekombinaciji virusnih genomskih RNA u svrhu isticanja važnosti istraživanja mehanizama te biološkog značaja i evolucijskih posljedica toga fenomena. RNA-rekombinacija u virusa može dovesti do pojava novih sojeva i varijanti koji mogu imati teške posljedice na ljudsko zdravlje, poljoprivredu i ravnotežu ekosustava, stoga je evaluacija opasnosti i razvoj novih metoda za predviđanje budućeg tijeka evolucije RNA-virusa putem rekombinacije genomskih virusnih RNA od velikog značaja. Razjašnjavanje mehanizama rekombinacije virusnih genomskih RNA te uključenost različitih domaćinskih faktora je, stoga, jedan od prvih i najvažnijih koraka u utvrđivanju utjecaja rekombinacije na evoluciju RNA-virusa. Osim rekombinacije, u radu je kratki osvrt i na preraspodjelu dijelova segmentiranih virusnih RNA-genoma te posljedice toga fenomena.*

Ključne riječi: izbor kopije, izmjena kalupa, RdRp, lom i religacija, preraspodjela  
(21 stranica, 11 slika, 0 tablica, 23 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: prof. dr. sc. Dijana Škorić

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

## Recombination of Viral Genomic RNAs

Alen Lecher

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

*In this thesis, the fundamental findings regarding recombination of viral genomic RNAs are described for the purposes of accentuating the importance of investigating these mechanisms and biological, as well as evolutionary consequences of this process. RNA recombination in viruses can bring about the appearance of new strains and variants which can, in turn, have serious effects on human health, agriculture, and the balance of ecosystems. Therefore, the evaluation of the risks and development of novel methods of predicting the future trajectories of RNA virus evolution via genomic RNA recombination is of utmost importance. The elucidation of mechanisms underlying recombination of viral genomic RNA and the involvement of various host factors is, therefore, one of the first and most important steps in determining the effects of recombination on the evolution of RNA viruses. Besides recombination, this thesis also briefly touches upon reassortment of segmented viral RNA genomes and its consequences.*

Keywords: copy-choice, template switching, RdRp, breakage and rejoining, reassortment  
(21 pages, 11 figures, 0 tables, 23 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Dijana Škorić, PhD

# SADRŽAJ

<b>1. Uvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Mehanizmi rekombinacije ovisni o replikaciji .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Defektna interferirajuća RNA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Mehanizam izbora kopije .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Modeli mehanizma izbora kopije .....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. Nehomologna replikativna rekombinacija .....</b>	<b>9</b>
<b>3. Mehanizam loma i religacije.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Sustav replikaze faga Q<math>\beta</math> .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. Nereplikativna RNA rekombinacija koja zahtijeva proteine</b>	<b>12</b>
<b>4. Domaćinski faktori uključeni u RNA rekombinaciju .....</b>	<b>13</b>
<b>4.1 Faktori koji inhibiraju RNA rekombinaciju .....</b>	<b>13</b>
<b>4.2. Faktori koji pospješuju RNA rekombinaciju .....</b>	<b>14</b>
<b>5. RNA rekombinacija retrovirusa .....</b>	<b>14</b>
<b>6. Preraspodjela genomskih segmenata .....</b>	<b>15</b>
<b>7. Biološki značaj i evolucijske posljedice .....</b>	<b>16</b>
<b>8. Zaključak .....</b>	<b>18</b>
<b>9. Literatura.....</b>	<b>19</b>
<b>10. Životopis.....</b>	<b>21</b>

## 1. UVOD

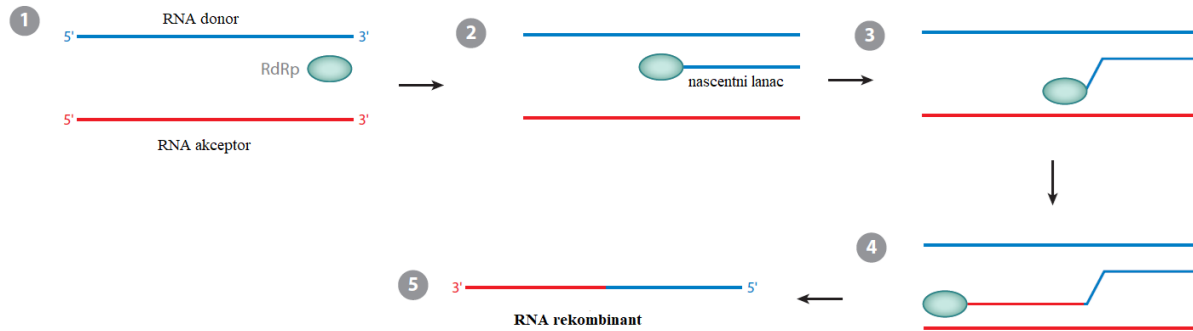
Poznato je da RNA-virusi brzo mutiraju, prvenstveno zbog velike sklonosti pogreškama virusne RNA-ovisne RNA polimeraze (RNA dependant RNA polymerase, RdRp) (Dolan i sur. 2018). Gomilanje velikog broja mutacija može biti loše za virusni genetički fitnes, stoga rekombinacija RNA može poslužiti kao mehanizam za popravak genoma (Lai 1992a). Pojava homologne RNA-rekombinacije prvi put je opisana ranih 1960-ih u poliovirusu (Gmyl i Agol 2005). Dokazi za RNA-rekombinaciju kasnije su demonstrirani i za koronavirus te (+)RNA biljne viruse na primjeru virusa mozaika ovsika (brome mosaic virus, BMV) (Lai 1992b). U početku se smatralo da se rekombinacija odvija samo kod RNA-virusa s (+) genomom i to samo tijekom sinteze (–) lanca, ali pronađeni su dokazi za nehomolognu rekombinaciju u (–) RNA virusima, virusima s dvolančanim RNA-genomom te pojava homolognih rekombinacije u rotavirusima i hantavirusima (Sztuba-Solińska 2011). Pokazano je i da virusna RNA različitih sojeva može rekombinirati i da je rekombinacija moguća čak i s molekulama RNA domaćina (Sztuba-Solińska 2011), što je jedan od načina kako se mogu razviti opasni novi sojevi virusa. Za razliku od DNA-rekombinacije, smatra se da se rekombinacija RNA odvija prvenstveno mehanizmom izbora kopije (eng. copy-choice) koji je ovisan o replikaciji. U suštini, RdRp započinje sintezu na tzv. akceptorskom kalupu RNA te zbog zastoja u replikaciji disocira s kalupa u kompleksu s novonastalim RNA-lancem nakon čega se veže za tzv. donorski kalup, na mjestu koje može, ali ne mora, biti homologno dijelu novosintetiziranog RNA-lanca. Replikacija se nastavlja dok se ne razvije rekombinantna molekula RNA (Gmyl i Agol 2005). Postoje indicije i da se RNA-rekombinacija može odvijati mehanizmima neovisnima o replikaciji putem loma i ponovnog međusobnog povezivanja dva lanca RNA, ali nije poznato koliko je ovaj način rekombinacije zastupljen u prirodi i njegov značaj za evoluciju RNA-virusa (Gmyl i sur. 1999). Osim eliminacije loših mutacija, biološko značenje RNA-rekombinacije uključuju promicanje evolucije RNA-virusa što je pokazano na primjeru djece cijepljene protiv različitih serotipova poliovirusa gdje je došlo do pojave rekombinanata serotipa 2 i 3 koji zbog selekcijskog pritiska ubrzo postaju dominantni sojevi (Lai 1992a). Osim toga, može doći i do konvergencije virusnih sekvenci, a samim time i gubitka seroloških barijera, zatim do pojave defektnih interferirajućih RNA, delecija, duplikacija i insercija gena iz domaćina (Lai 1992a). Očito je da je virusna RNA-rekombinacija od velikog značaja za ljudsko zdravlje i poljoprivredu

zbog mogućnosti pojave novih, opasnijih patogenih virusnih rekombinanata, stoga je istraživanje mehanizama rekombinacije bitno kako bi se dobio uvid u mogućnost predviđanja rekombinacijskih događaja te povijest evolucije različitih rekombinantnih sojeva. Rekombinacija je značajno učestalija u jednolančanih (+)RNA-virusa te gotovo sveprisutna u toj skupini (Bentley i Evans 2018).

## **2. MEHANIZMI REKOMBINACIJE OVISNI O REPLIKACIJI**

Kirkegaard i Baltimore (1986) su demonstrirali da rekombinacija ovisi o replikaciji tijekom sinteze negativnog lanca u poliovirusu na način da su u uvjetima koji selektivno onemogućuju replikaciju jednog roditeljskog virusa uveli drugi virus superinfekcijom čija je mogućnost replikacije očuvana. Pokazali su da u procesu rekombinacije dolazi do toga da RdRp mijenja kalup na temelju kojeg sintetizira novi lanac što se naziva mehanizmom izbora kopije. To rezultira nastankom rekombinantne RNA (Slika 1.). Osim toga, još jedan važan dokaz da je RNA-rekombinacija ovisna o replikaciji proizlazi iz činjenice da tijekom aberantne nehomologne rekombinacije TCV-a (turnip crinckle virus) dolazi do nasumične ugradnje nukleotida bez kalupa na mjestu ukriženja (Lai 1992b). Nadalje, pokazano je i kako RdRp visoke točnosti pokazuju smanjenu učestalost rekombinacije u odnosu na RdRp sklone pogreškama budući da neispravna ugradnja nukleotida potiče usporavanje polimerizacije RNA-lanca što povećava vjerojatnost disocijacije s kalupa (Bentley i Evans 2018). Čak i dodatak ribavirina koji smanjuje točnost polimeraze u poliovirusu dovodi do većeg prinosa rekombinantne RNA (Bentley i Evans 2018). Uvođenje mutacija koje smanjuju točnost replikacije pomoću RdRp dovodi do povećane frekvencije rekombinacije (Finglerowicz i sur. 1996).

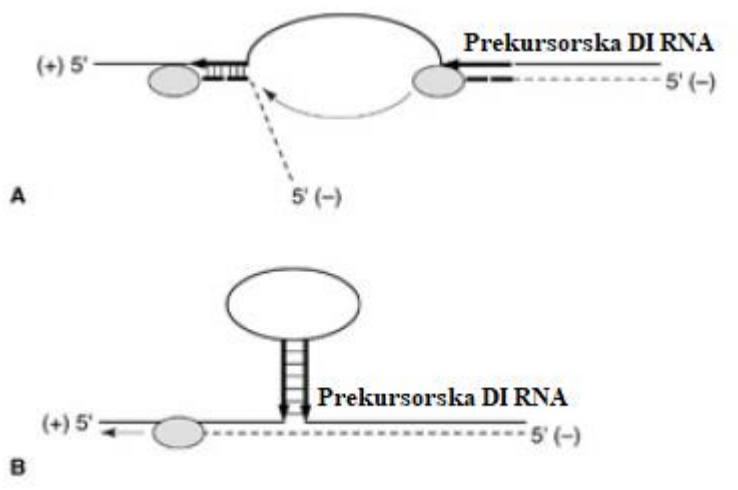




**Slika 1.** RNA-rekombinacija mehanizmom izbora kopije (Preuzeto i prilagođeno iz Sztuba-Solinska i sur. 2011).

## 2.1. DEFEKTNA INTERFERIRAJUĆA RNA

Defektna interferirajuća RNA (DI RNA) nastaje kada RdRp “skače” (Slika 2.) unutar kalupa RNA, tj. disocira i veže se za nova mjesta prepoznavanja (npr. promotore) prilikom čega nastaju delecije do te mjere da genom može biti smanjen za 80 do 90% u odnosu na roditeljski, tj. normalni virusni genom (Chen i Nagy 2003). Dakle riječ je o nehomolognoj rekombinaciji. DI RNA nemaju gen za replikazu stoga se natječu s roditeljskom RNA za replikaciju (Simon i Bujarski 1994). Pretpostavlja se da se rekombinacija RNA odvija prema sličnom mehanizmu samo što se replikacija nastavlja na mjestu prepoznavanja na drugoj molekuli RNA.



**Slika 2.** Mehanizam nastanka DI RNA djelovanjem replikaze. Do delecije može doći ili zbog (A) homologije dviju sekvenci pri čemu polimeraza skače s jednog mjesta homologije na drugo, ili zbog (B) komplementarnosti sekvenci pri čemu nastaje dovoljno stabilna ukosnica koja se ne odmata ni replicira (preuzeto i prilagođeno iz Bujarski 1999). Siva elipsa predstavlja RNA-ovisnu RNA-polimerazu, pune linije su RNA kalup, a iscrtkane linije su novosintetizirani lanac.

## 2.2. MEHANIZAM IZBORA KOPIJE

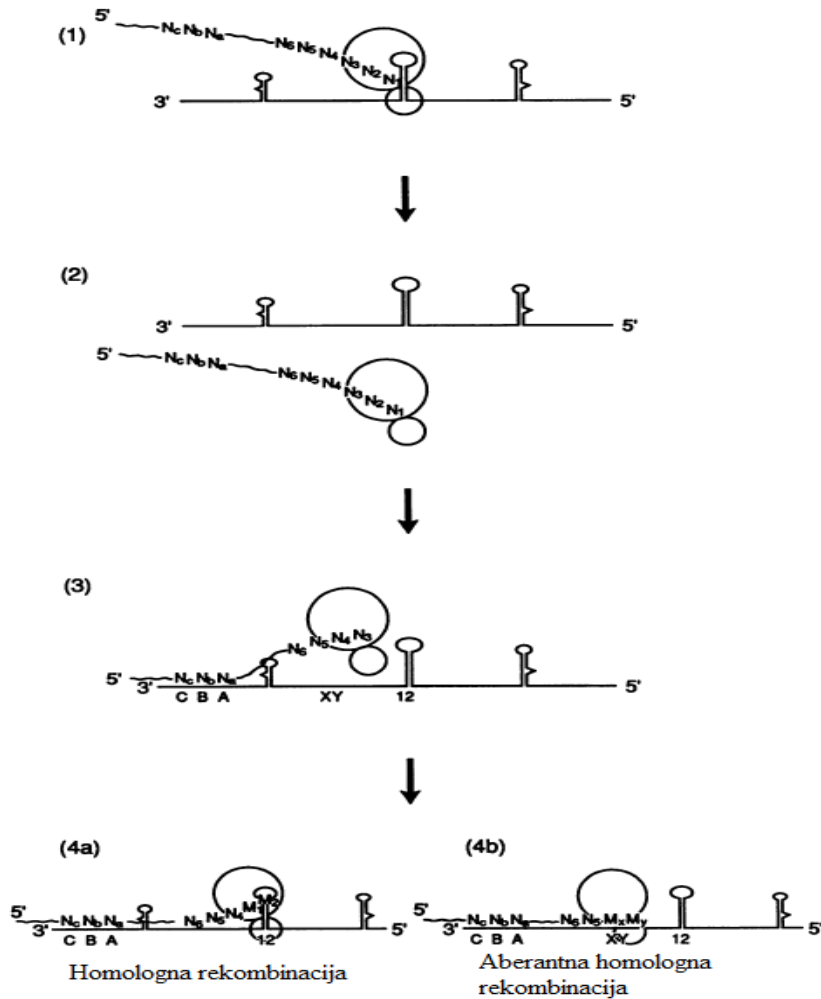
Sinteza RNA smatra se diskontinuiranim procesom zbog niske procesivnosti RdRp. Prilikom nailaska RNA-polimeraze na regije snažne sekundarne strukture može doći do usporenja sinteze što može rezultirati disocijacijom RNA-polimeraze i transkripta. Oni se zatim mogu vezati za isti ili neki drugi kalup te nastaviti RNA-replikaciju, što u potonjem slučaju rezultira rekombinantnom RNA (Lai 1992a). Temperatura može utjecati na sekundarnu strukturu RNA što može promijeniti vjerojatnost disocijacije transkripcijskog kompleksa, odnosno vezanja nascentne RNA na akceptorski kalup (Gmyl i Agol 2005). Moguće je i da novonastali lanac disocira na mjestima bogatima bazama A i U zato što na tim mjestima polimeraza često proklizava i neispravno ugrađuje nukleotide. To dovodi do usporavanja replikacije i povećava vjerojatnost za izmjenu kalupa (Nagy i Simon 1997). Disocijacija može biti i posljedica razgradnje donorskog kalupa (Gmyl i Agol 2005) ili terminatorskih sekvenci, primjerice takve su U-bogate regije uzvodno od ukosnice na nascentnom lancu (Nagy i Simon 1997). Ukosnice su često povezane s mjestima učestale rekombinacije kod porodice *Tombusviridae* (Bentley i Evans 2018). Dostupnost NTP-ova također igra značajnu ulogu s obzirom da je učestalost rekombinacije veća pri oskudici NTP-ova (Kim i Kao 2001). Druga molekula RNA mora biti dovoljno blizu RNA-polimerazi da bi došlo do razmjene kalupa i mora postojati nekakva posebna struktura kao što su motivi za vezanje RNA-polimeraze ili replikativni *cis*-element, kao što su promotori ili pojačivači replikacije, kako bi se za nju vezao kompleks polimeraze i transkripta. To znamo jer se mjesta rekombinacije često poklapaju smjestima kompleksne sekundarne RNA-strukture, najčešće uzvodno od ukosnice (Lai 1992b; Bentley i Evans 2018). RNA-sinteza u većini RNA-virusa se odvija u membranskim odjeljcima gdje se molekule RNA gomilaju. Stvaranje heterodupleksa kod komplementarnih molekula RNA također može omogućiti približavanje dviju molekula RNA (Lai 1992b). Jedan od

mogućih razloga zašto su u poliovirusu učestalije rekombinacije tijekom sinteze negativnog lanca RNA je činjenica da je pozitivan lanac RNA prisutan u puno većem broju kopija (Lai 1992b).

Moguća su dva načina na koje dolazi do izmjene kalupa: nascentni lanac disocira i s kalupa i RdRp te se veže na drugi kalup na temelju komplementarnosti. Druga i vjerojatnija mogućnost je da RdRp u kompleksu s nascentnim lancem disocira te zamijeni kalup na temelju zajedničkih sekundarnih struktura kalupa, dok se vezanje lanca nascentne DNA s novim kalupom odvija uzvodno od transkripcijskog kompleksa, pri čemu može doći do djelomičnog nukleolitičkog cijapanja RNA (Lai 1992b).

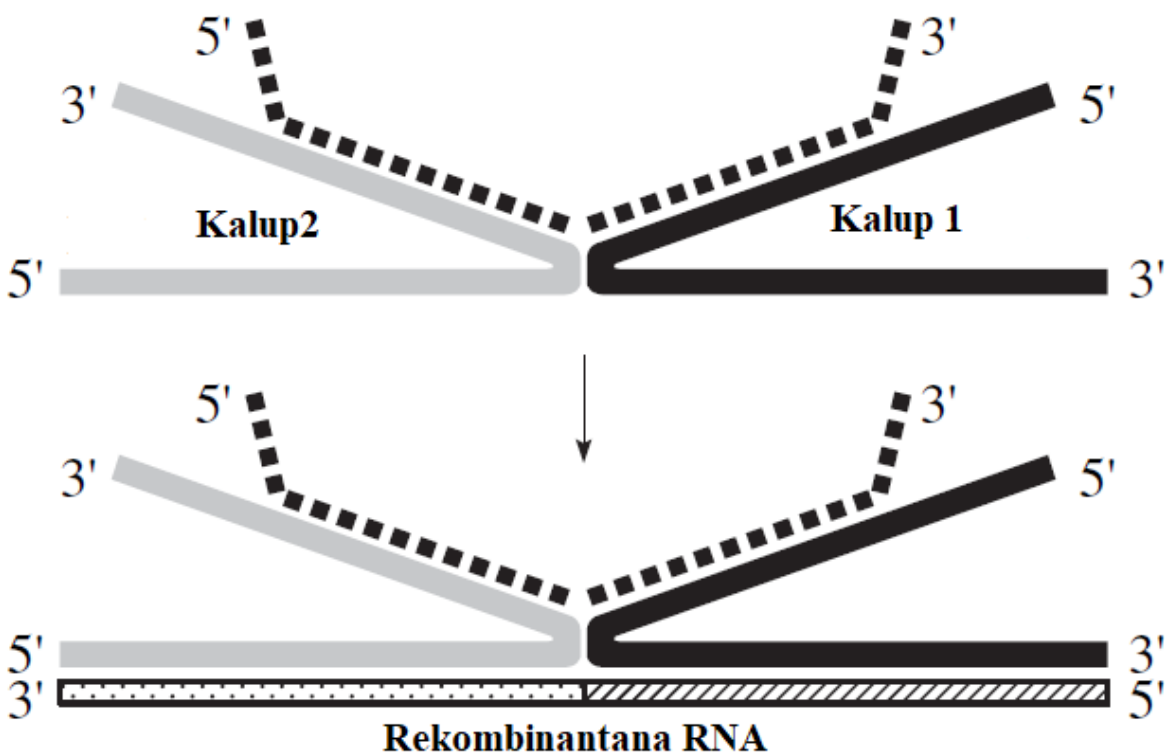
### **2.3. MODELI MEHANIZMA IZBORA KOPIJE**

Prema jednom modelu kojeg je predložio Lai (1992b) zorno prikazanom na Slici 3., dolazi do disocijacije RdRp s nascentom RNA na mjestu snažne sekundarne strukture. Nascentna RNA se veže za akceptorski kalup RNA uzvodno od transkripcijskog kompleksa. Sam transkripcijski kompleks prepoznaje na akceptorskom kalupu sekundarnu strukturu identičnu onoj s donorskog kalupa što rezultira homolognom rekombinacijom, odnosno rekombinacijom na usporedivim mjestima donorskog i akceptorskog kalupa RNA. Međutim, ukoliko se kompleks veže za različitu sekundarnu strukturu, dolazi do aberantne homologne rekombinacije prilikom čega nastaju duplikacije ili delecije. Može doći i do djelomične razgradnje 3'-kraja nascentne RNA endo- ili egzonukleazama prije nego se nastavi replikacija na akceptorskom kalupu. To znači da se mjesta rekombinacije se ne moraju podudarati s mjestima snažne sekundarne strukture RNA. Samo vezanje RNA odvija se uzvodno od transkripcijskog kompleksa i vjerojatno igra ulogu u njegovom usmjeravanju na akceptorski kalup. Na mjestima ukriženja također se mogu pojaviti i nukleotidi nasumično ugrađeni bez kalupa zbog nepreciznosti prilikom ponovne inicijacije replikacije na novom kalupu.



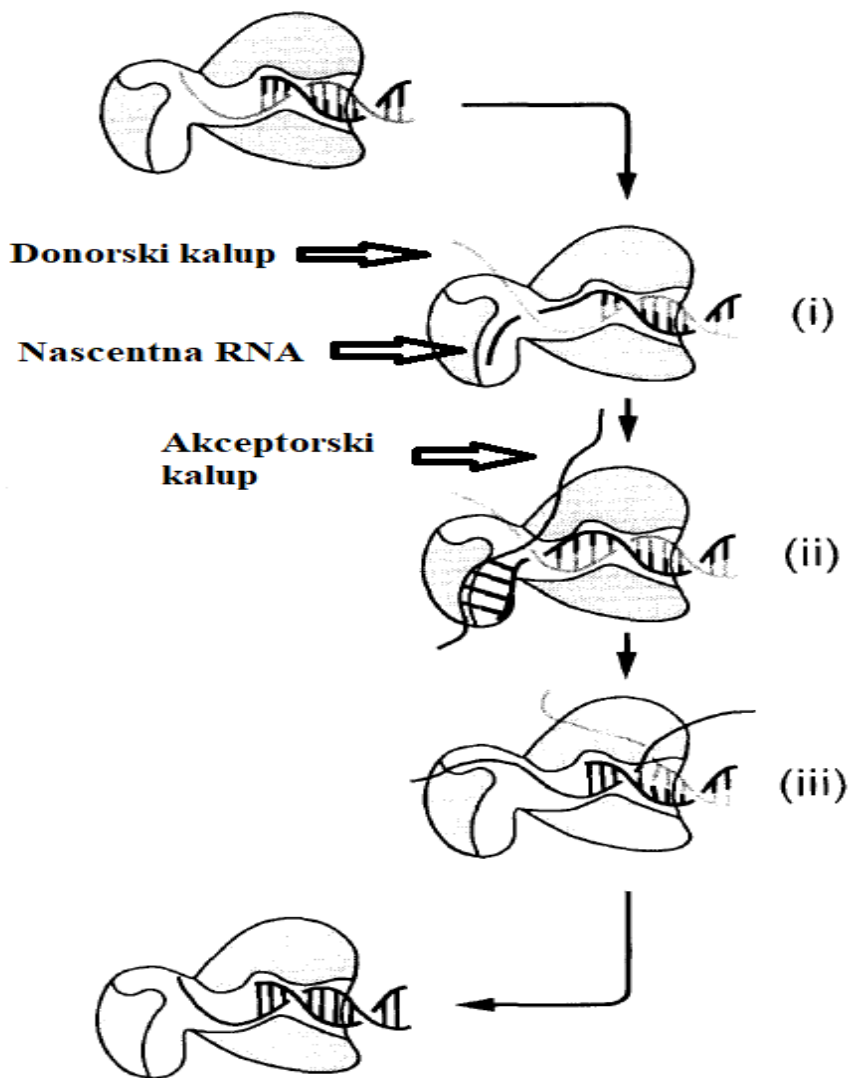
**Slika 3.** Model izbora kopije prema Lai. (1) Transkripcijski kompleks je usporen na mjestu sekundarne strukture prilikom čega dolazi do njegove (2) disocijacije s donorskog kalupa RNA. (3) Nascentni lanac RNA veže sa za akceptorski lanac RNA uzvodno od transkripcijskog kompleksa prilikom čega može doći do skraćivanja 3'-kraja nascentnog lanca što može objasniti nasumičnost mjesta ukriženja. (4a) Ukoliko se transkripcijski kompleks veže za sekundarnu strukturu sličnu onoj na donorskoj RNA na usporedivom mjestu, dolazi do homologne rekombinacije. (4b) Ako se kompleks veže za drugo mjesto nastupa aberantna homologna aberacija (Preuzeto i prilagođeno iz Lai 1992b).

Prema jednom drugom, procesivnom mehanizmu (Slika 4.), dvije molekule RNA koje služe kao kalupi mogu biti pridružene komplementarnim vezanjem za treću molekulu RNA. Kada RdRp prijeđe s jednog kalupa RNA na drugi, nastaje rekombinantna RNA-molekula (Gmyl i Agol 2005).



**Slika 4.** Model RNA-rekombinacije gdje treća molekula RNA (označena iscrtanim linijama) podupire dva kalupa RNA (Preuzeto i prilagođeno iz Gmyl i Agol 2005).

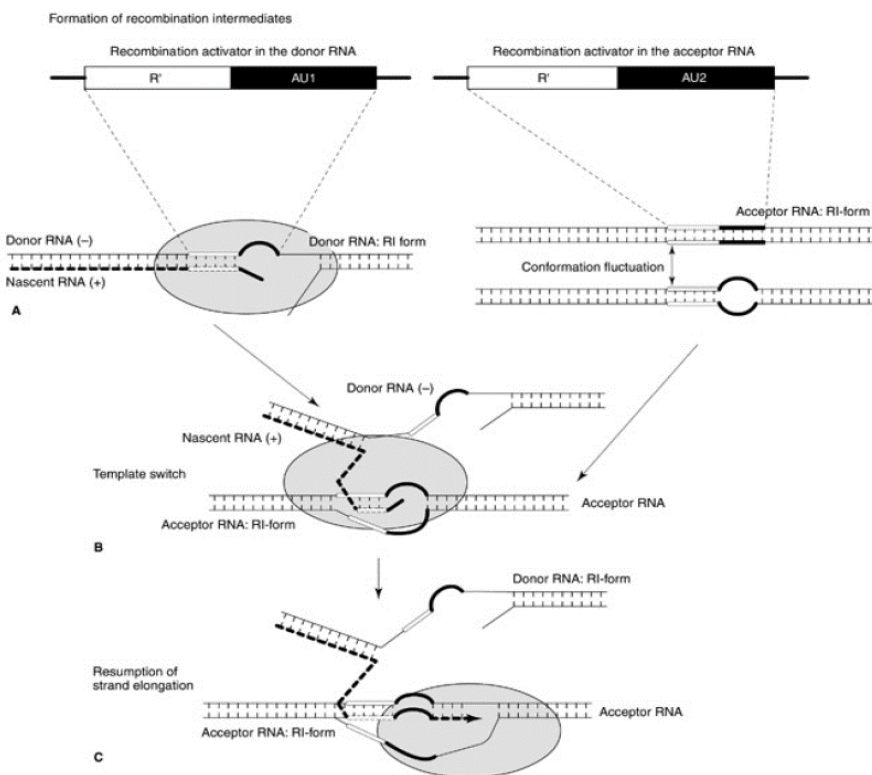
Treći, također procesivni model (Slika 5.), prema kojemu 3'-kraj nascentne RNA proklizava i djelomično se odvaja od donorskog kalupa. Akceptorski kalup se zatim komplementarno veže za slobodni 3'-kraj nascentne RNA i zajedno se povlače prema mjestu polimerizacije dok se donorski lanac disocira (Jarvis i Kirkegaard 1991). Iako se ovaj proces čini značajno kompleksnijim od neprocesivnih mehanizama, zapravo je kinetički efikasniji i smatra se da nedostatak lektorirajuće aktivnosti RdRp pridonosi procesivnoj izmjeni kalupa (Jarvis i Kirkegaard 1991).



**Slika 5.** Predloženi procesivni model rekombinacije RNA (Preuzeto i prilagođeno iz Jarvis i Kirkegaard 1991).

Na slici 6. prikazan je još jedan procesivan model homologne rekombinacije prema Nagy i Bujarski (Bujarsky 1999) koji se vjerojatno odvija prilikom sinteze pozitivnog lanca s BMV (brome mosaic virus) RdRp na kalupu negativnog lanca. Rekombinacijski aktivatori sadrže AU-bogate sekvence koje zbog slabijih međusobnih veza između A i U i posustajanja RdRp dovode do disocijacije 3'-kraja nascentnog lanca s RdRp, dok na akceptorskoj RNA, kod AU bogate sekvence nastaje struktura nalik balončiću. Disocirani nascentni 3'-kraj RNA hibridizira s homolognom sekvencom rekombinacijskog aktivatora u akceptorskom RNA-kalupu pri čemu struktura balončića igra

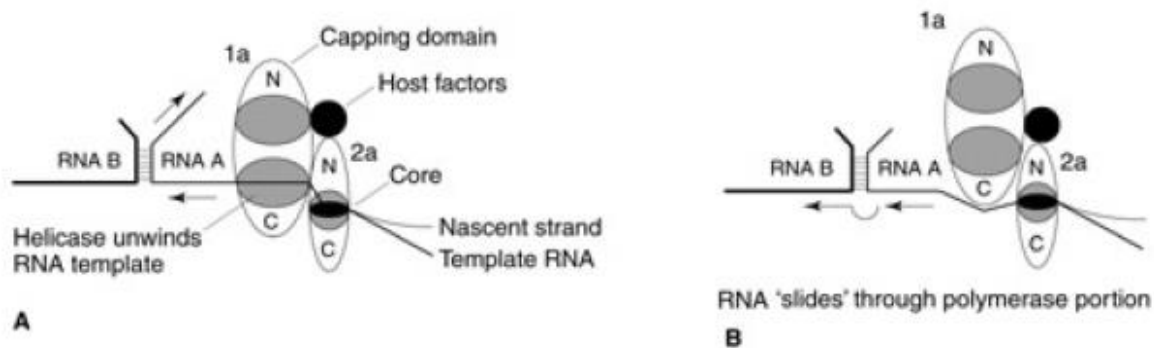
značajnu ulogu. Hibridiziranje regije uzvodno od balončića stabilizira strukturu i replikacija se nastavlja na akceptorskom kalupu, dok je donorski istisnut.



**Slika 6.** Model procesivne homologne rekombinacije tijekom sinteze pozitivnog lanca uz BMV (brome mosaic virus) RdRp (preuzeto iz Bujarski 1999). Siva elipsa je BMV RNA-ovisna RNA-polimeraza,

## 2.4. NEHOMOLOGNA REPLIKATIVNA REKOMBINACIJA

Nagy i Bujarski (1993) su fragment BMV RNA1 u obrnutoj (eng. antisense) orijentaciji ugradili u nekodirajuću regiju BMV RNA3 što je rezultiralo velikim brojem nehomolognih rekombinanata s ukriženjem na hibridnoj regiji. Ukoliko helikaza ne razmoti heterodupleks (Slika 7. A), dolazi do prelaska RdRp s jednog kalupa na drugi što može biti popraćeno nasumičnom ugradnjom nukleotida bez kalupa. Ako je hibridizacija RNA na lijevom kraju slabija, mjesta ukriženja će biti učestalija u srednjem dijelu heterodupleksa zato što će helikaza razmotati manje stabilne dijelove heterodupleksa (Nagy i Bujarski 1993).

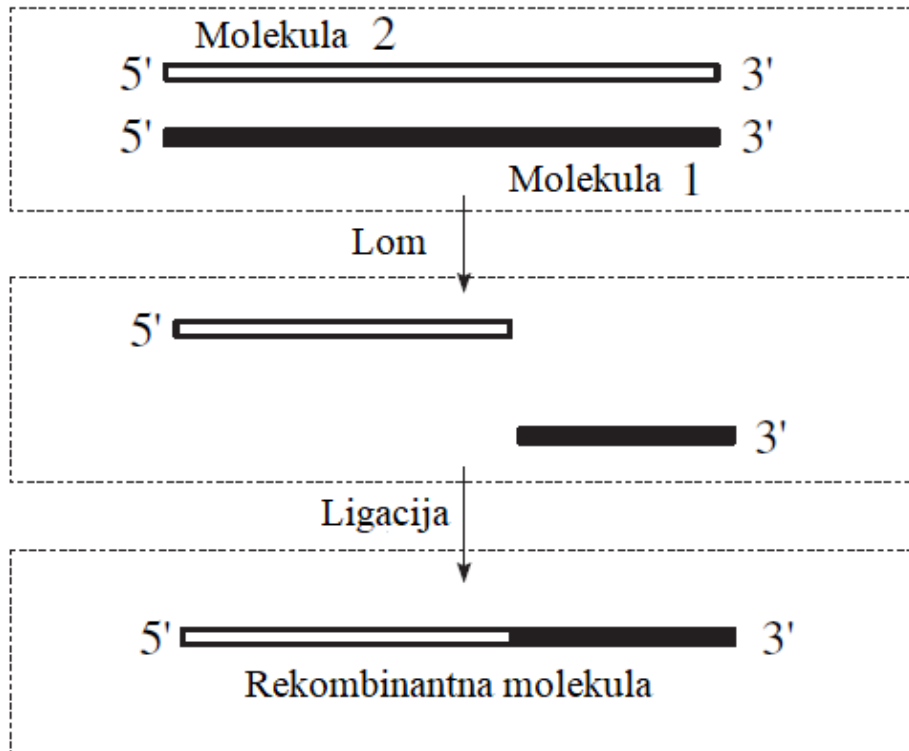


**Slika 7.** Nehomologna rekombinacija odvija se ukoliko (B) helikaza nije vezana za kalup RNA te ne dolazi do (A) razdvajanja heterodupleksa koji drži dva kalupa zajedno (preuzeto iz Bujarski 1999).

### 3. MEHANIZAM LOMA I RELIGACIJE

Znatno manje istražen mehanizam loma i religacije podrazumijeva lom jedne molekule RNA i religaciju na drugu molekulu RNA ( Slika 8.). U ovom mehanizmu mogu sudjelovati Q $\beta$ -replikaza, razni domaćinski faktori, ribozimi ili strukture nalik ribozimima u sklopu rekombinirajuće RNA, proteini pa čak i sama RNA u prisustvu iona Mg<sup>2+</sup> neovisna o bilo kojim drugim faktorima. U potonjem slučaju stopa rekombinacije je izrazito niska (Chetverin 1999; Gallei i sur 2004; Gmyl i sur 2020).

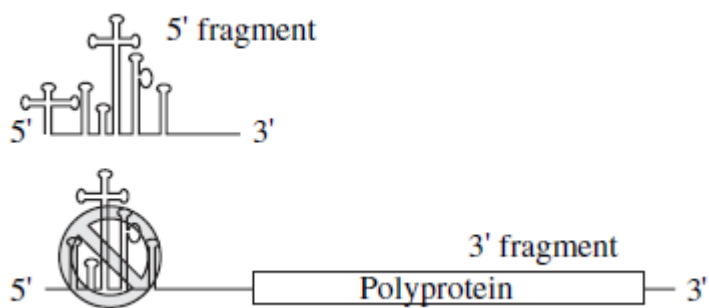




**Slika 8.** Opća shema rekombinacije RNA prema modelu loma i religacije (preuzeto i prilagođeno iz Gmyl i Agol 2005).

### 3.1. Sustav replikaze faga Q $\beta$

Kako bi se istražila mogućnost rekombinacije čiji mehanizam ne uključuje izmjenu kalupa, korišten je sustav bez stanica koji je sadržavao visoko pročišćenu Q $\beta$ -replikazu, NTP-ove i određene fragmente koji su bili komplementarni, ali nisu mogli biti eksponencijalno replicirani. 5'-fragmentu (Slika 9.) nedostajala je kodirajuća regija, a 3'-fragmentu cis-elementi nužni za replikaciju. U takvom sustavu došlo je do pojave rekombinanata koji sadrže i 5'-cis elemente i 3'-kodirajuću regiju koje je Q $\beta$ -replikaza mogla eksponencijalno replicirati. Smatra se da je nastanak rekombinanta posljedica napada 3'-hidroksilne grupe kataliziranog Q $\beta$ -replikazom 5'-fragmenta na fosfodiestersku vezu 3'-fragmenta budući da su svi produkti sadržavali cjeloviti 5'-fragment i dio 3'-fragmenta. Ovakva rekombinacija i dalje nije neovisna o replikaciji s obzirom da je za nju potrebna Q $\beta$ -replikaza (Gmyl i Agol 2005).



**Slika 9.** Fragmenti korišteni u sustavu Q $\beta$ -replikaze. 3'-fragmentu nedostaju cis-elementi potrebni za replikaciju i transkripciju, dok 5'-fragmentu nedostaje kodirajuća regija (preuzeto iz Gmyl i Agol 2005).

### 3.2. NEREPLIKATIVNA RNA REKOMBINACIJA KOJA ZAHTIJEVA PROTEINE

Proučavanje nereplikativne rekombinacije prvo se provodilo u poliovirusu. Korišten je fragment kojemu nedostaje kodirajuća regija u kombinaciji s fragmentom čiji su cis-elementi u 5NTR (5'-netranslatiranoj regiji virusnog genoma) eliminirani ili inaktivirani. U stanicama najčešće dolazi do njihove nehomologne rekombinacije čime se ponovno uspostavlja cjeloviti funkcionalni virusni genom (Gmyl i Agol 2005). Međutim, replikativna rekombinacija mehanizmom izbora kopije ne može se u potpunosti isključiti. To je zbog mogućnosti bazalne ekspresije gena za RdRp, budući da je prisutan u cijelosti u 3'-fragmentu (Gallei i sur 2004). U odvojenom eksperimentu, korišten je par fragmenata s prekidom unutar okvira čitanja RdRp kako bi se još uvjerljivije dokazalo da rekombinacija ne ovisi o replikaciji (Gmyl i Agol 2005). 5'-fragment je morao sadržavati 3'-fosfatnu skupinu, 3'-fragment 5'-hidroksilnu skupinu kako bi došlo do povezivanja krajeva. Nisu

još poznate RNA-ligaze koje mogu povezati takve krajeve, ali pretpostavlja se da se krajevi na neki način obrađuju domaćinskim faktorima prije konačne međusobne ligacije (Gmyl i Agol 2005).

RNA ima sposobnost spontano rekombinirati sama sa sobom u prisustvu iona  $Mg^{2+}$  u milimolarnim koncentracijama. Fragmenti rekombiniraju internno, dakle neovisno o slobodnim hidroksilnim skupinama. Stopa ovakve rekombinacije je samo  $10^{-9}$  rekombinacijskih događaja po nukleotidu po satu (Chetverin 1999).

#### **4. DOMAĆINSKI FAKTORI UKLJUČENI U RNA REKOMBINACIJU**

Serviene i sur. (2004) Su na temelju niza izolata kvasaca s delecijom jednog gena (*knockout* mutanti), pokrivajući time 80 % genoma kvasca, utvrditi utjecaj pojedinih faktora na stopu rekombinacije tombusvirusa (tomato bushy stunt virus, TBSV).

##### **4.1 FAKTORI KOJI INHIBIRAJU RNA- REKOMBINACIJU**

U ovom eksperimentalnom sustavu identificirano je pet gena čije odsustvo dovodi do povećanja stope rekombinacije što znači da ti geni, kada su aktivni, inhibiraju RNA-rekombinaciju. Tri gena utječu na razgradnju RNA u smjeru 5'–3', a to su *XRNI*, *CTLI* i *MET22/HAL2*. U ovim *knockout* mutantima pojavile su se rekombinantne RNA s delecijama na 5'-krajevima. Štoviše, došlo je do gomilanja RNA s prekrojenim 5'-krajevima, potencijalnim intermedijerima u RNA-rekombinaciji. Rekombinantne molekule su bile stabilnije u delecijском muatntu za *XRNI*, zbog inhibicije brze razgradnje RNA u smjeru 5'–3'. Proteini Met22p/Hal2p utječu na aktivnost Xrn1p regulacijom razine inhibitora Xrn1p, pAp. Ctl1p cijepa 5'-fosfatanu skupinu na RNA čime pospješuje aktivnost Xrn1p, a Ubp3p čini Xrn1p stabilnijim u stanicama. Slični geni su vjerojatno prisutni i u biljkama budući da je 5'–3'-nukleaza nalik Xrnp1 prisutna u biljci *Arabidopsis thaliana*, a Hal2p homolog je kloniran iz riže (Serviene i sur. 2004). Pretpostavlja se da je glavni mehanizam djelovanja navedenih faktora putem brze i potpune 5'–3'-razgradnje RNA od strane Xrnp1. U odsustvu tih faktora razgradnja je sporija i gomilaju se djelomično razgrađeni RNA-fragmenti sposobni za rekombinaciju (Serviene i sur. 2004).

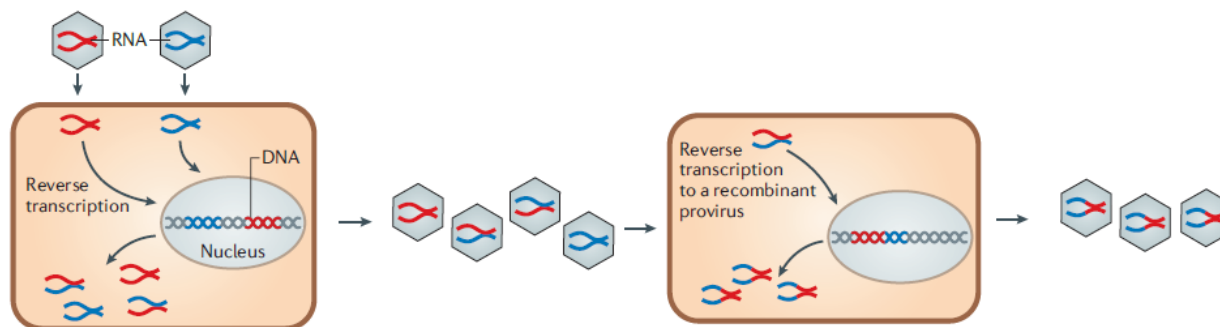
## 4.2. FAKTORI KOJI POSPJEŠUJU RNA-REKOMBINACIJU

Četiri domaćinska gena kvasca, *PEP7*, *IPK1*, *CHO2* i *DCII* najvjerojatnije potiču rekombinaciju jer njihova delecija rezultirala je supresijom RNA-rekombinacije. Smatra se da je njihov utjecaj povezan s međustaničnim prijenosom virusnih i domaćinskih proteina prema mjestu rekombinacije i lipidnim sastavom membranskih odjeljaka koji sadrže virusne replikaze (Serviene i sur. 2004).

Sve to upućuje na zaključak da virusi koji ko-inficiraju stanice različitih organizama s faktorima koji pospješuju rekombinaciju ili imaju utišanu ekspresiju gena za domaćinske faktore koji suprimiraju RNA-rekombinaciju mogu lakše rekombinirati i doprinijeti evoluciji RNA virusa. Drugim riječima moguće je da u prirodi postoje posebni sojevi ili mutanti različitih organizama koji djeluju povoljno na rekombinaciju virusne genomske RNA čime možda utječu na brzinu njihove evolucije.

## 5. RNA-REKOMBINACIJA U RETROVIRUSA

Retrovirusi sadrže dvije identične jednolančane molekule genomske RNA koje čine dimer u virionu. Tijekom koinfekcije dva različita soja u istoj stanici dolazi do reverzne transkripcije i ugradnje provirusne dvolančane DNA oba soja zasebno. Prilikom pakiranja u virione RNA jednog soja može se, kao u slučaju preraspodjele segmentiranih genoma, pakirati s RNA drugog soja u tzv. heterozigotne virusne čestice. Kada takvi virioni inficiraju drugu stanicu, zbog neprocesivne prirode reverzne transkriptaze, dolazi do izmjene kalupa između RNA dva različita soja pri čemu se u jezgrinu DNA ugrađuje rekombinantni provirus. U novim virionima se sada pakiraju dvije identične rekombinantne molekule RNA (Simon-Loriere i Holmes 2011). Proces je zorno prikazan na slici 10. Rekombinacija retrovirusa može pridonijeti promjeni u prepoznavanju antigena, izbjegavanju imunskog odgovora domaćina i razvoju novih varijanti (Simon-Loriere i Holmes 2011).



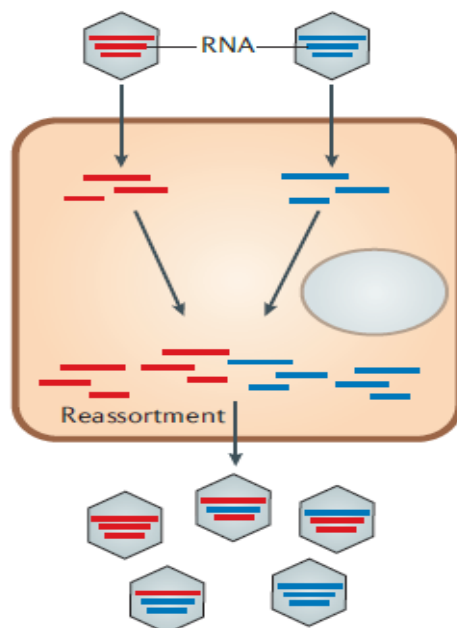
**Slika 10.** Rekombinacija genomske RNA retrovirusa (preuzeto i prilagođeno iz Simon-Loriere i Holmes 2011).

## 6. PRERASPODJELA GENOMSKIH SEGMENTATA

Osim rekombinacije, preraspodjela genomskih segmentata kod RNA-virusa sa segmentiranim genomom također dovodi do povećane genske varijabilnosti. Temelji se na zajedničkom pakiranju genomskih segmentata u virione tijekom koinfekcije različitih virusnih sojeva segmentiranih genoma u istoj stanici ( Slika 10.) (Bentley i Evans 2018). Jedna od mogućih posljedica je promjena domaćina kojeg virus može zaraziti (tzv. prelijevanje u novog domaćina, eng. spill-over). Virus gripe tipa A (IAV) ima genom od 8 segmentata koji kodira barem 10 proteina. Genomski segmenti se mogu preraspodijeliti prilikom koinfekcije različitih sojeva IAV u istoj stanici u različite virione formirajući posve nove sojeve. Takozbog genomske preraspodjele hemaglutinina i neuraminidaze, dva površinska antigena IAV, između virusa gripe ptica i sisavaca koji imaju različite faktore za određivanje specifičnosti prema nekome domaćinu, može doći do pojave novih virusnih sojeva. Ovime su nezaštićeni domaćini izloženi nepoznatim antigenima, a takvu skokovitu promjenu genoma koja rezultira pojavom novog soja nazivamo antigenski pomak. Upravo ti događaji su uzrok opetovanih pandemija gripe. Primjerice H1N1, uzročnik svinjske gripe, je nastao trostrukom preraspodjelom genomskih segmentata ptičjih i svinjskih sojeva IAV (Dolan i sur 2018).

Jedan od načina na koji su se vjerojatno razvili virusi segmentiranih genoma je koinfekcija iste stanice s više virusa čiji su genomi procesom komplementacije postali trajno ovisni jedni o drugima, odnosno postali su segmenti genoma novog virusa (Simon-Loriere i Holmes 2011). Druga mogućnost je da su se segmentirani genomi razvili izravno iz nesegmentiranih posredstvom

DI RNA koje bi zadržale infektivnost zahvaljujući komplementaciji i mogle bi se s vremenom razviti u pojedinačne genomske segmente (Simon-Loriere i Holmes 2011).



**Slika 11.** Preraspodjela genomskih segmenata u pojedinačne virione (preuzeto iz Simon-Loriere i Holmes 2011).

## 7. BIOLOŠKI ZNAČAJ I EVOLUCIJSKE POSLJEDICE

Otkriveni su rekombinanti između tri soja u sklopu primjene oralne atenuirane vakcine protiv poliomijelitisa kod cijepljenih osoba. Najčešće se radi o rekombinatima između virusa serotipa 2 i 3. Oni mogu uzrokovati pojavu bolesti kod cijepljene osobe i dovesti do pojave epidemija poliomijelitisa (Lai 1992a, Lai 1992b). Slično tome, vakcine protiv infektivnog virusa bronhitisa (IBV), koji napada dišne puteve peradi i uzrokuje veliku štetu u peradarstvu, sadrže različite serotipove atenuiranih IBV- sojeva mogu rekombinacijom između sojeva dovesti do pojave nepoželjnih, štetnijih varijanti virusa (Kusters i sur.1990).

Evolucijske prednosti RNA-rekombinacije temelje se na razvoju novih, virusu poželjnih svojstava i eliminaciji loših mutacija te oštećenja u genomu (Worobey i Holmes 1999; Simon-Loriere i Holmes 2011). Virusna RNA može čak rekombinirati i s mRNA domaćina pri čemu može doći do

nastanka patogenih virusa kao u primjeru virusa goveđeg virusnog proljeva (Worobey i Holmes 1999). Virus gripe tipa A je također u rekombinaciji s domaćinskom RNA dao patogeniji soj (Worobey i Holmes 1999). Mutanti faga MS2 mogu nehomolognom rekombinacijom popraviti važne sekundarne strukture, odnosno ukosnice (Worobey i Holmes 1999). Rekombinacija je, također pridonijela proširenju kruga domaćina pojedinih virusa, porastu njihove virulentnosti, izbjegavanju imunskog odgovora domaćina i otpornosti na protuvirusne lijekove (Simon-Loriere i Holmes 2011).

S druge strane, moguće je da je virusna RNA-rekombinacija samo nusprodukt njihove organizacije genoma te da igra ulogu prvenstveno u regulaciji ekspresije gena (Simon-Loriere i Holmes 2011). Primjerice (+)-jednolonačani RNA-virusi koriste subgenomske RNA, pomake u okviru čitanja tijekom translacije i segmentaciju genoma. (-)-jednolančani RNA-virusi imaju bolju kontrolu genske ekspresije na razini transkripcije budući da transkripcijom nastaje veći broj mRNA čija se translacija zasebno regulira (Simon-Loriere i Holmes 2011). Kod (+)-jednolančanih koronavirusa, subgenomska *antisense* RNA nastaje diskontinuiranom transkripcijom, odnosno mehanizmom izbora kopije na način da se vodeća sekvenca s krajnjeg 5'-kraja genomske RNA prva transkribira te se transkripcija nakon prekida nastavlja nizvodno. Upravo to je upravo razlog za veliku stopu rekombinacije u koronavirusa (Lai 1996). Virusna RNA-rekombinacija se stoga može smatrati nusproduktom procesivnosti RdRp koja ovisi o građi genoma, ali ne pridonosi značajno pojavi novih, poželjnih svojstava ili eliminaciji štetnih gena (Simon-Loriere i Holmes 2011). Virusna evolucija je najvjerojatnije u najvećoj mjeri ovisna o visokoj stopi mutacija zbog nedostatka lektorirajuće aktivnosti RdRp te o činjenici da se virusi umnožavaju u velikom broju stvarajući tzv. kvazivrste (Dolan i sur. 2018).

## 8. ZAKLJUČAK

Rekombinacija virusnih genomskih RNA je proces prisutan u svih RNA-virusa, ali je učestaliji u (+)-jednolančanim RNA-virusima nego u (-)-jednolančanim RNA-virusima te u biljnim RNA-virusima. Mogući mehanizmi rekombinacije su različiti te uključuju procesivne i neprocesivne, mehanizam izbora kopije, koji uključuje izmjenu kalupa, te mehanizam loma i religacije. Osim rekombinantnih RNA-virusa, sličnim mehanizmima nastaju i defektne interferirajuće RNA. U slučaju replikativnih virusnih mehanizama, važnu ulogu igraju sekundarna struktura DNA i homologija (u slučaju homologne rekombinacije), odnosno komplementarnost, u slučaju nehomologne rekombinacije. U potonjem je i helikazna aktivnost od velike važnosti. Sama točnost RdRp tijekom replikacije također je važna budući da svako posustajanje može dovesti do disocijacije transkripcijskog kompleksa i izmjene kalupa. Nereplikativni mehanizmi rekombinacije najvjerojatnije uključuju domaćinske faktore, prvenstveno proteine, koji još nisu sasvim identificirani, ali je dokazano da RNA može čak i spontano rekombinirati u prisustvu iona  $Mg^{2+}$ . Postoje i domaćinski faktori koji mogu pospješiti ili inhibirati rekombinaciju, stoga određeni mutanti nekih domaćina mogu poslužiti kao akceleratori virusne rekombinacije pa možda čak i evolucije RNA-virusa. Osim rekombinacije, virusi sa segmentiranim genomom mogu biti podvrgnuti preraspodijeli segmenata tijekom pakiranja u virusne čestice. Prilikom preraspodjele može doći do posljedica sličnih posljedica RNA-rekombinacije kao što su promjena u prepoznavanju antigena i izbjegavanje imunog odgovora domaćina. Rekombinacija RNA-virusa u oralnim atenuiranim vakcinama s različitim serotipovima virusa može dovesti do oboljenja vakcinirane osobe i pojave epidemija zbog rekombinacije u gastrointestinalnom traktu. Što se tiče samog evolucijskog značaja virusne RNA-rekombinacije, smatra se da ona pridonosi razvoju novih sojeva, eliminaciji virusu nepoželjnih mutacija i popravku virusne genomske RNA. Prema drugim razmatranjima, rekombinacija u RNA-virusima ne doprinosi značajno evoluciji ili popravku genomske RNA, već je nusprodukt organizacije genoma RNA-virusa te potrebe za regulacijom ekspresije gena. Radi rasvjetljavanja točnih mehanizama i značaja rekombinacije u evoluciji RNA-virusa, potrebna su dodatna istraživanja.



## 9. LITERATURA

Bentley, K., Evans, D. J. (2018): Mechanisms and consequences of positive-strand RNA virus recombination. **The Journal of General Virology** 99(10): 1345–1356.

Bujarski J. J. (1999): Recombination of viruses. **Encyclopedia of Virology**, 1446–1453.

Cheng, C. P., Nagy, P. D. (2003): Mechanism of RNA recombination in carmo- and tombusviruses: evidence for template switching by the RNA-dependent RNA polymerase in vitro. **Journal of Virology** 77(22): 12033–12047.

Chetverin A. B. (1999): The puzzle of RNA recombination. **FEBS Letters** 460(1): 1–5.

Dolan, P. T., Whitfield, Z. J., Andino, R. (2018): Mechanisms and concepts in RNA virus population dynamics and evolution. **Annual Review of Virology** 5(1): 69–92.

Figlerowicz, M., Nagy, P. D., Bujarski, J. J. (1997): A mutation in the putative RNA polymerase gene inhibits nonhomologous, but not homologous, genetic recombination in an RNA virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 94(5): 2073–2078.

Gallei, A., Pankraz, A., Thiel, H. J., Becher, P. (2004): RNA recombination in vivo in the absence of viral replication. **Journal of Virology** 78(12): 6271–6281.

Gmyl, A. P., Agol, V. I. (2005): Diverse mechanisms of RNA recombination. **Molecular Biology** 39(4): 529–542.

Gmyl, A. P., Korshenko, S. A., Belousov, E. V., Khitrina, E. V., Agol, V. I. (2003): Nonreplicative homologous RNA recombination: promiscuous joining of RNA pieces? **RNA** 9(10): 1221–1231.

Jarvis, T. C., Kirkegaard, K. (1991): The polymerase in its labyrinth: mechanisms and implications of RNA recombination. **Trends in Genetics** 7(6): 186–191.

Kim, M. J., Kao C. (2001): Factors regulating template switch in vitro by viral RNA-dependent RNA polymerases: Implications for RNA–RNA recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 98(9): 4972–4977.

Kirkegaard, K., Baltimore, D. (1986): The mechanism of RNA recombination in poliovirus. **Cell** 47(3): 433–443.

Kusters, J. G., Jager, E. J., Niesters, H. G., van der Zeijst, B. A. (1990): Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Vaccine** 8(6): 605–608.

Lai M. M. C. (1992a): Genetic Recombination in RNA Viruses. U: Holland J.J. (ur.) Genetic Diversity of RNA viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 176. Springer, Berlin, Heidelberg, 21–32.

Lai M. M. C. (1992b): RNA recombination in animal and plant viruses. **Microbiological Reviews** 56(1): 61–79.

Lai M. M. C. (1996): Recombination in large RNA viruses: Coronaviruses. **Seminars in Virology** 7(6): 381–388.

Nagy, P. D., Bujarski, J. J. (1993): Targeting the site of RNA-RNA recombination in brome mosaic virus with antisense sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 90(14): 6390–6394.

Nagy, P. D., Simon, A. E. (1997): New insights into the mechanisms of RNA recombination. **Virology** 235(1): 1–9.

Serviene, E., Shapka, N., Cheng, C. P., Panavas, T., Phuangrat, B., Baker, J., Nagy, P. D. (2005): Genome-wide screen identifies host genes affecting viral RNA recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 102(30): 10545–10550.

Simon, A. E., Bujarski, J. J. (1994): RNA-RNA recombination and evolution in virus infected plants. **Annual Review of Phytopathology** 32(1): 337-362.

Simon-Loriere, E., Holmes, E. C. (2011): Why do RNA viruses recombine? **Nature Reviews Microbiology** 9(8): 617–626.

Sztuba-Solińska, J., Urbanowicz, A., Figlerowicz, M., Bujarski, J. J. (2011): RNA-RNA recombination in plant virus replication and evolution. **Annual Review of Phytopathology** 49: 415–443.

Worobey, M., Holmes, E. C. (1999): Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. **The Journal of General Virology** 80: 2535–2543.

## 10. ŽIVOTOPIS

Pohađao sam OŠ Lovre pl. Matačića od 1998. koju sam završio s izvrsnim uspjehom 2006. godine kada sam upisao IV. (jezičnu) gimnaziju koju sam pohađao do 2010. Državnu maturu iz biologije sam položio s izvrsnim uspjehom (bio sam 6. u Hrvatskoj) te sam se iste godine prvi puta upisao na Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Upisao sam smjer molekularne biologije na biološkom odsjeku. Tijekom studija sudjelovao sam u laboratorijskom istraživanju učinka nanočestica srebra u sklopu kolegija Metode istraživanja proteina. Također sam istraživao djelotvornost predtretmana sjemenki rajčice kalcijevim kloridom u sklopu kolegija Metabolizam biljaka u stresnim uvjetima. Posjedujem izvrsno znanje engleskog jezika te rudimentarno znanje njemačkog i latinskog. Imam iskustvo s MS Office-om, posebice s programima Word, Excel i PowerPoint. U slobodno vrijeme se bavim amaterskim sviranjem klavijature, izradom glazbenih transkripcija i aranžmana u programu MuseScore, crtanjem te kuhanjem, poglavito poslastica.