RNA VIRUSI I NJIHOVA EVOLUCIJA

Soldo, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:018363

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-04**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

RNA VIRUSI I NJIHOVA EVOLUCIJA

RNA VIRUSES AND RNA VIRUS EVOLUTION

SEMINARSKI RAD

Maja Soldo

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Damjan Franjević

ZAGREB, 2021.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
1.1 NAČINI PROUČAVANJA EVOLUCIJE VIRUSA 2
2. PODRIJETLO VIRUSA 3
2.1. PODRIJETLO RNA VIRUSA 3
2.2 TEORIJE O PODRIJETLU RNA VIRUSA 4
2.3 TEORIJA REGRESIVNE EVOLUCIJE 5
2.4 RNA VIRUSI KAO ODBJEGLI GENETIČKI ELEMENTI 6
2.5 RNA VIRUSI I RNA SVIJET 7
3. RNA VIRUSI 8
3.1 FILOGENETSKI ODNOSI IZMEĐU RNA VIRUSA 9
4. MEHANIZMI EVOLUCIJE RNA VIRUSA 12
4.1 SELEKCIJA I DRIFT 13
4.2 REKOMBINACIJA I REARANŽMAN GENOMA 14
5. KVAZIVRSTE RNA VIRUSA 16
5.1 STOPE MUTACIJA I MULLEROV ZATEZAČ 17
6. MAKROEVOLUCIJA VIRUSA 18
6.1 EVOLUCIJA VELIČINE GENOMA 18
6.2. KORONAVIRUSI I RONIVIRUSI 19
6.3 EVOLUCIJA ORGANIZACIJE GENOMA 20
6.4. PROCES EVOLUCIJE GENOMA 21
7. TAKSONOMIJA VIRUSA 22
7.1 ORTHOMYXOVIRIDAE 23
7.2 PICORNAVIRIDAE 23
7.3 FLAVIVIRIDAE 24
7.4 FILOVIRIDAE 24
7.5 CORONAVIRIDAE 24
7.6 RETROVIRIDAE 25
7.7 PARAMYXOVIRIDAE 25

7.8 RHABDOVIRIDAE 26
8. ZAKLJUČAK 27
9. LITERATURA 28
11. SAŽETAK 29
12. SUMMARY 30

1. UVOD

Virusi su najbrojniji biološki entiteti i najzagonetniji organizmi na Zemlji. Nazivaju se živućim kristalima, iako pravo pitanje je jesu li živi ili ne. Budući da su na granici živog i mrtvog, nazivaju se entitetima, agensima ili česticama. Virusi nemaju vlastiti metabolizam, nisu samoodrživi, ne mogu se samostalno replicirati i evoluirati. Upravo te karakteristike su one koje definiraju žive tvari.

Znanstvenici koji drže da virusi nisu u potpunosti živi smatraju da virusi od stanice domaćina preuzimaju sposobnost reprodukcije i kompleksnu građu. Obzirom na to, kada bi svi živi organizmi nestali sa lica Zemlje, onda bi i virusi uskoro nestali. Nasuprot tome, oni koji drže da su virusi živi, smatraju da navedeni argument iznad ne vrijedi jer je istinit za sve parazite.

Iako su naizgled prilično jednostavni i ne posjeduju mnogo gena, mogu se ponašati jako kompleksno. Riječ virus asocira na bolesti i zaraze. Unatoč njihovoj jednostavnosti, uzrokuju bolesti od kojih umiru milijuni ljudi. Virusne bolesti su toliko česte da ih znamo poimenice: AIDS, gripa, ospice, male boginje, dječja paraliza, bjesnoća.

Upravo to je jedan od glavnih razloga zašto je bitno istraživati evoluciju RNA virusa.

Ipak, virusi imaju i neke dobre strane. Oblikovali su ekosustave i ljudske genome, ubrzali su evoluciju organizama i zaslužni su za otkrivanje gena koji uzrokuju rak.

Biotehnologija, genska terapija i neki oblici terapije matičnim stanicama ovise o virusima, a ti postupci se zajedno provode za pronalazak lijekova za rak, kardiovaskularne bolesti, neurološke poremećaje i mnoge druge bolesti (Jospeh Panno, 2011).

Dakle, iako su virusi najsmrtonosniji neprijatelji ljudima, također su i jako vrijedni saveznici.

Genom virusa čini DNA ili RNA, pa se prema tome klasificiraju na DNA i RNA viruse. U ovom radu bavit ću se opisivanjem RNA virusa i njihove evolucije.

1.1 NAČINI PROUČAVANJA EVOLUCIJE VIRUSA

Postoje tri načina proučavanja evolucije RNA virusa: teorijsko, eksperimentalno i komparativno. Teorijski pristup proučavanja evolucije virusa ima dugu povijest, ukorijenjenu sa ekologijom i populacijskom genetikom. Istražuje posljedice specifičnih evolucijskih ili epidemioloških procesa. Problem teorijskog pristupa je da nužno pretpostavlja idealizirani model virusne biologije koji je ponekad odvojen od točne složenosti evolucijskog procesa u prirodi.

Eksperimentalni pristup je bio dominantan način proučavanja evolucije RNA virusa do danas. Korišten je za otkrivanje mehanizama evolucijskih promjena, posebno kod RNA virusa. Eksperimentalna analiza RNA virusa u velikoj mjeri ovisi o njihovoj brzoj stopi mutacija, tako da se evolucija može pratiti u stvarno vremenu i u raznim staničnim okolišima. Međutim, evolucija *in vitro* se često jako razlikuje od evolucije u prirodi, posebno za sustave koji nisu bakteriofagi (u kojima *in vitro* i *in vivo* se mogu smatrati jednakima). Naprimjer, regije genoma koronavirusa za koje se čini da nemaju nikakvu funkciju *in vitro* ili *in vivo* su zapravo jako važni u prirodi.

U širem smislu, želja da se RNA virusi koriste kao alati za razumijevanje evolucijskih procesa općenito može značiti da su eksperimentalna istraživanja zapravo otkrila vrlo malo o zamršenosti evolucije virusa, nego što bi se mogli nadati.

Komparativni pristup razmatra evolucijski proces u prirodi, genomi se sakupljaju iz stvarnih populacija i koriste se analitički alati s jakom teorijskom osnovom.

Problem komparativnog pristupa može biti doprinos individualni evolucijskih procesa. Taj doprinos može biti problematičan kada je analiza donekle retrospektivna, i također problem su uzorci koji su često mali i pristrani.

Srećom, uspon pirosekvenciranja i srodni metoda doprinijeli su sekvenciranju kompletnih genoma različitih RNA virusa i pružaju nove mogućnosti otkrivanja prirode evolucije virusa. Jedan od glavnih problema u evoluciji RNA virusa danas je više ograničenje podacima nego teorijom (Edward C. Holmes, 2009).

2. PODRIJETLO VIRUSA

Virusi su se pojavili nakon pojave prokariota, najstarijeg oblika stanice, i vjeruje se da su evoluirali iz pokretnih genetičkih elemenata transpozona i bakterijskih minikromosoma plazmida. Obzirom da su mali veličinom, transpozoni i plazmidi bi mogli izaći iz bakterijske stanice te ući i inficirati druge stanice.

S vremenom ovi genetički elementi su stekli proteinski omotač koji štiti njihov genetski materijal i koji im olakšava da inficiraju druge stanice.

Smatra se da su transpozoni evoluirali u viruse eukariota, a plazmidi u viruse prokariota. Bakterijski virusi su se najvjerojatnije pojavili nakon evolucije prvih stanica, prije više od 3 milijarde godina. Virusi koji napadaju životinje također imaju daleku povijest koja se proteže između 500 000 i 600 000 godina unatrag. Humani virusi su bitno mlađi, pojavili su se prije 50 000 godina. Virusne infekcije iz tog razdoblja su vjerojatno bile blage infekcije koje nisu davale vidljive simptome. Virulentni humani virusi su najvjerojatnije evoluirali pojavom poljoprivrede, prije oko 10 000 godina (Joseph Panno, 2011).

2.1. PODRIJETLO RNA VIRUSA

Zaključivanje o podrijetlu i dubokim filogenetskim odnosima između RNA virusa pokazalo se kao najteže za riješiti. Kako su virusi nastali i kako su povezani sa staničnim organizmima je jedna od najzanimljivijih tema u evolucijskoj biologiji, te ima potencijal rasvijetliti ključne trenutke u ranoj povijesti života na Zemlji.

Problem kod utvrđivanja filogenetskih odnosa između divergentnih RNA virusa je taj što RNA virusi ne ostavljaju fosilne ostatke. Najstarija sekvenca RNA virusa je virus gripe tipa A je sačuvan od razorne pandemije 1918. Također, sačuvana je i sekvenca virusa T-stanične leukemije iz uzoraka sakupljenih 1913.

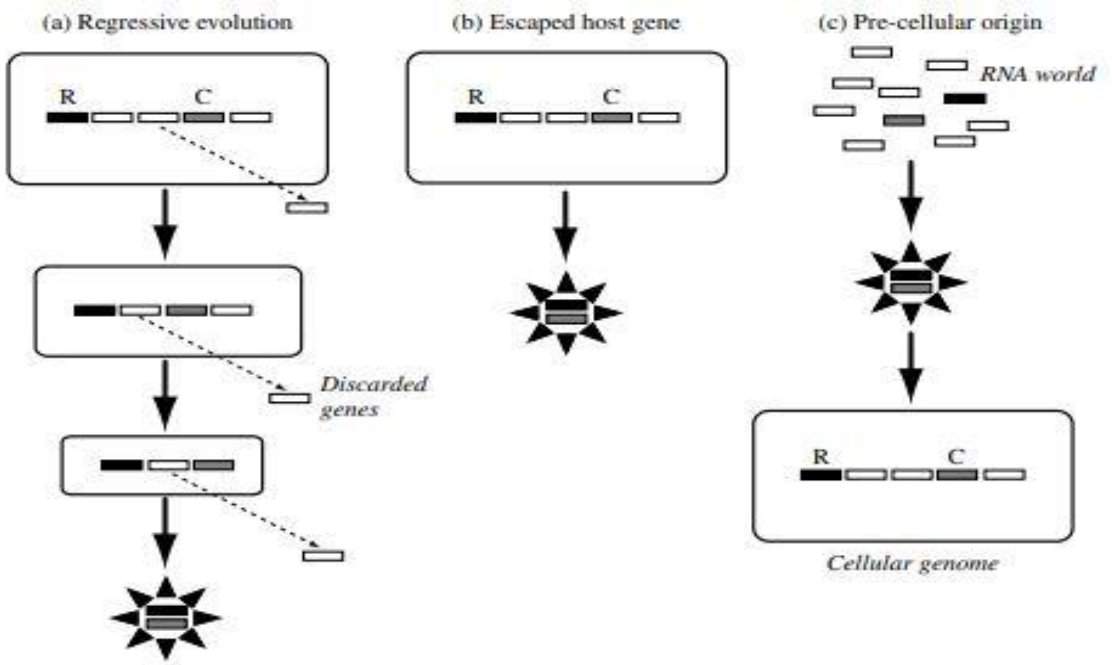
Iako je RNA izolirana i sekvencirana iz starijih virusa, najvjerojatnije iz virusa humane T-stanične leukemije (HTLV-I) iz andske mumije, nije općeprihvaćeno zbog nemogućnosti isključivanja kontaminacije.

Nedostatak fosilnih zapisa znači da je nemoguće odrediti kada su RNA virusi postojali u

prošlosti, ili koristiti fosilne uzorke kao kalibracijske točke određivanja evolucije virusa.
Drugi problem zaključivanja njihovog podrijetla je taj da brzina supstitucije nukleotida RNA virusa osigurava da filogenetski signal jako brzo erodira.
Konačna prepreka s kojom se suočavaju oni koji žele rekonstruirati podrijetlo RNA virusa je rekombinacija gena i ponovni rearanžman. Iz toga se može zaključiti da možda ne postoji samo jedna povijest evolucije do koje se može doći pomoću filogenetskih metoda.
Iako je još uvijek nejasno koliko često su se takvi lateralni procesi događali među divergentnim RNA virusima, vjerojatno su se događali s dovoljnom učestalošću i zato ih treba uzeti u obzir pri istraživanju filogenije (Edward C. Holmes, 2009).

2.2 TEORIJE O PODRIJETLU RNA VIRUSA

Postoji nekoliko teorija o podrijetlu RNA virusa. Problem na koji se nailazi prilikom generiranja teorija o pretku RNA virusa je nedostatak podataka koji bi se mogli podvrgnuti testiranjima. Predložene su tri teorije o podrijetlu RNA virusa, koje mogu sadržavati i neke dodatne modifikacije.
Teorija regresivne evolucije tvrdi da porijeklo RNA virusa leži u staničnim organizmima, najvjerojatnije je riječ o bakterijama. Takvi organizmi su učinkovito parazitirali svog domaćina i postepeno ubacili vlastite gene dok nisu postali ''jednostavni'' organizmi koje danas poznajemo kao viruse. Danas se ova teorija ne favorizira kao najvjerojatnija.
Nakon toga, predložena je teorija odbjeglog gena koja govori da su RNA virusi potomci odbjeglih staničnih gena domaćina. Takvi geni su stekli proteinske omotače i sposobnost autonomne replikacije.
Treća teorija je teorija pre-staničnog života. RNA virusi su potomci predstaničnih oblika RNA s precima starim milijardama godina unatrag, koji su usvojili svoj parazitski način života nekad kasnije (Edward C. Holmes, 2009). Navedene teorije se podjednako odnose i na DNA viruse, ali ovaj rad je nužno koncentriran na raspravu o RNA virusima i njihovom podrijetlu.
Grafički prikaz tri teorije podrijetla RNA virusa je dan na Slici 1.



Slika 1. Teorije o podrijetlu RNA virusa. (a) Teorija regresivne evolucije, koja se danas ne favorizira; (b) Teorija odbjeglog gena, i (c) Pre-stanična teorija, u kojoj su RNA virusi evoluirali iz prve molekule RNA ili RNA-proteinskih sustava. U sva tri slučaja stanice su predstavljene kao zaobljeni pravokutnici, a virusi kao jednostavni sustavi sadrže dva gena, replikazu i gen za kapsidu.
Preuzeto iz The Evolution and Emergence of RNA viruses, Edward C. Holmes 2009

2.3 TEORIJA REGRESIVNE EVOLUCIJE

Teorija govori da su virusi mogli nastati regresivnim ili redukcijskim procesom. Endosimbiotske bakterije koje imaju izrazito povoljan odnos sa svojim domaćinom uspjele su oblikovati svoj genom na način da su odbacile one gene čije funkcije može osigurati stanica domaćin. Primjer takvih bakterija su vrste bakterije *Buchnera* koje inficiraju različite vrste lisnih uši i koje su odbacile više od 70% svog genoma. To znači da je određena vrsta bakterije *Buchnera* doživjela regresivnu evoluciju u jednostavniji oblik. Iako su mnogo jednostavnije, *Buchnera* su ostale još uvijek bakterije. Također, postoje određene bakterije koje su obligatni unutarstanični paraziti, poput vrsta *Chlamydia* i *Rickettsia*, koje su evoluirale od slobodno živućih predaka. Utvrđeno je da mitohondriji eukariotski stanica i vrsta *Rickettsia prowazekii* dijele zajedničkog slobodno

živućeg pretka.

Iako je regresivna evolucija uočena kod nekih bakterija, ne postoje dokazi koji sa sigurnošću govore da je ovaj proces odgovoran za podrijetlo RNA virusa (Edward C. Holmes, 2009).

2.4 RNA VIRUSI KAO ODBJEGLI GENETIČKI ELEMENTI

Druga velika teorija govori da su RNA virusi odbjegli stanični geni, najvjerojatnije molekule mRNA. Takvi odbjegli stanični elementi su stekli sposobnost samorepliciranja i zaštitne proteinske omotače koji su im omogućili neovisno postojanje. To govori da su RNA i DNA virusi postojali nakon prvih staničnih organizama, pa se može reći da je ova teorija post-stanična teorija o podrijetlu virusa. Bez obzira kada je došlo do bijega gena, teorija predviđa da bi geni virusa u konačnici trebali imati svoje pretke u staničnim genomima. Takvi događaji bijega su se mogli dogoditi više puta, što znači da nije nužno da su RNA virusi ili bilo koja druga klasa virusa monofiletskog podrijetla.

Ova teorija može objasniti samo postojanje sličnih osobina među divergentnim virusima, poput prisutnosti proteina kapside ili poddomene palca RNA i DNA polimeraza. Dva dokaza idu u prilog ovoj teoriji. Prvi i najjednostavniji je da su virusi obligatni paraziti čija replikacija ovisi o stanici domaćinu, stoga nikad ne bi mogli postojati izvan stanice domaćina. Drugo, unatoč brojnim pokušajima nemoguće je koristiti podatke o genskom slijedu kako bi se pokazao da su RNA virusi monofiletski (Edward C. Holmes, 2009).

2.5 RNA VIRUSI I RNA SVIJET

Najpopularnija teorija o podrijetlu RNA virusa govori da RNA virusi predstavljaju suvremene potomke RNA svijeta. Smatra se da je RNA svijet postojao prije pojave replikacije veće vjernosti bazirane na molekuli DNA. Postojeći DNA virusi bi mogli biti ostaci prvih DNA replikatora, a retrovirusi potomci prvih molekula koje su bile sposobne za prijelaz između RNA u DNA. Budući da se pretpostavlja da su nastali u zajedničkom okolišu prije pojave staničnih organizama, te mogu dijeliti specifične gene, izravna filogenetska veza između RNA, DNA i retrovirusa može poslužiti kao dokaz za predstaničnu teoriju. Oslanjanje na RNA za replikaciju automatski povezuje današnje RNA viruse i drevni RNA svijet. Pojam RNA svijeta je ključni trenutak u evolucijskoj povijesti između formiranja Zemlje prije nekih 4,5 milijardi godina i pojave prvih fosila prije otprilike 3,5 milijardi godina. Budući da su i prvi fosili relativno složeni, morali su se dogoditi veliki evolucijski prijelazi u prethodnim milijardama godina povijesti Zemlje. Može se reći da neki suvremeni RNA virusi i njihovi viroidi pružaju uvid u te drevne evolucijske događaje. Najizravniji dokaz postojanja RNA svijeta je otkriće katalitičkih molekula RNA koje se nazivaju ribozimi. Ribozimi su male RNA molekule koje uključuju ''hammerhead'' ribozim pronađen u nekim viroidima, HDV ribozim i Neurospora Varkud motiv satelita. Ribozimi su biokemijski jako bitni zbog svoje uključenosti u osnovne stanične procese kao što je procesiranje molekule mRNA i sinteza proteina. Temeljni rad Manfreda Eigena o sustavima rane replikacije implicira da su ribozimi možda pokrenuli proces evolucije prirodnom selekcijom.

Zbog njihove složene sekundarne strukture, nedostatka protein-kodirajućih regija i funkcije ribozima, viroidi predstavljaju odlične kandidate za ostatke najranijih oblika života koji su okupirali RNA svijet. Također, pokazano je da viroidi posjeduju iznimno visoku vrijednost stope mutacija. Međutim, sekvence viroida su toliko različite od drugih organizama, pa je nemoguće točno zaključiti njihovo podrijetlo (Edward C. Holmes, 2009).

3. RNA VIRUSI

Većina virusa ima kristalnu proteinsku strukturu koja ima oblik ikozaedra. Kristalna struktura proteina tvori kapsidu koja sadržava genom virusa. Postoje tri različite vrste virusa: DNA virusi (imaju DNA genom), RNA virusi i retrovirusi. Retrovirusi su posebna vrsta RNA virusa koja pretvara svoj genom u DNA nakon što zarazi stanicu domaćina.

Dodatne značajke razlikuju viruse unutar ove tri vrste: prisutnost ili odsutnost proteinskog omotača, građa kapside i detaljne značajke obzirom na genom.

RNA genomi su uvijek linearni. Uz to, RNA može biti pozitivan (+) lanac što znači da se može izravno iščitati mRNA, ili može biti negativan (-) lanac koji se prevodi u (+) lanac tijekom infekcije.

Virusi koji imaju tek nekoliko gena imaju jednolančanu RNA kao genom, a kako broj gena raste, genom sadrži dvolančanu DNA (Joseph Panno, 2011). Rana evolucija života je prvo uključivala RNA molekule koje su pohranjivale informaciju i bile su katalizatori (ribozimi). Kasnija evolucija je uključivala pojavu DNA molekula, odnosno genetički materijal, i proteine. Molekule RNA su ostale centralne molekule za prevođenje gena u proteine (mRNA), za pravilno funkcioniranje translacijske mašinerije (rRNA i tRNA) i za razne regulatorne funkcije (različite nekodirajuće RNA).

RNA virusi su virusi koji imaju RNA genom i ne uključuju molekulu DNA u mehanizmima replikacije i genske ekspresije. Predstavljaju najbliži postojeći relikt iskonskog RNA svijeta. RNA virusi obuhvaćaju tri od sedam takozvanih Baltimore klasa virusa koje se razlikuju obzirom na prirodu genoma, odnosno oblik nukleinske kiseline koji je pakiran u genom. Baltimore klase odgovaraju različitim strategijama replikacije i genske ekspresije: positive-sense (+) RNA virusi, dvolančani RNA virusi i negative-sense (-) RNA virusi. (+) RNA virusi koriste najjednostavniji mogući mehanizam replikacije i ekspresije jer ista molekula funkcionira i kao genom i kao mRNA. (+) RNA ,oslobođena iz viriona, se direktno koristi za translaciju kako bi se proizveli virusni proteini, što znači da virioni (+) RNA virusa sadrže samo strukturne proteine, uz genom. Suprotno njima, (-) RNA i dvolančani RNA virusi mašineriju za transkripciju i replikaciju pakiraju unutar svojih viriona jer su potrebni da bi se započeo reproduktivni ciklus virusa (Eugene V. Koonin i sur.,2021).

Virusi s RNA genomima su pronađeni u prokariotima, gljivama, životinjama i biljkama (D. C. Reanney, 1982). Oni su najzastupljenija skupina substaničnih parazita. Mnoge virusne bolesti su uzrokovane RNA virusima, a najpoznatiji primjer je pandemija AIDS. Genetska varijabilnost je uočena kod svih proučavanih RNA virusa i njihov potencijal za brzu evoluciju se sve više prepoznaje kao osnova njihove sveprisutnosti i prilagodljivosti (John J. Holland i sur., 1996).

3.1 FILOGENETSKI ODNOSI IZMEĐU RNA VIRUSA

Jako je teško postići napredak u razumijevanju podrijetla RNA virusa zbog poteškoća prilikom određivanja odnosa između njih i smještanja u klasifikacijske sheme (Edward C. Holmes, 2009). RNA virusi čine glavni dio globalnog viroma. Kod prokariota zastupljenost RNA virusa je malena. Samo jedna porodica (+) RNA virusa (*Leviviridae*) i jedna porodica dvolančanih RNA virusa (*Cystoviridae*) je službeno prepoznata. Nijedan (-) RNA virus nije izoliran iz prokariota. Metagenomička istraživanja sugeriraju da je genetička raznolikost i raspon domaćina RNA virusa kod prokariota značajno podcijenjena, te opseg prokariotskog RNA viroma je neusporedivo manji od DNA viroma. Potencijalni uzrok ekspanzije RNA viroma u eukariota može uključivati kompartimentizaciju citosola. Stvaranjem odjeljaka omogućena je zaštita i gostoljubiv okoliš za replikaciju RNA koja je povezana s endoplazmatiskim retikulumom i drugim membranskim odjeljcima.

Suprotno tome, jezgrina ovojnica predstavlja barijeru koja sprječava pristup DNA virusa replikaciji domaćina i transkripcijskoj mašineriji i time djelomično ublažava jaku konkurenciju koju DNA virusi prokariota predstavljaju RNA virusima.

Što se tiče eukariota, dominiraju tri Baltimore klase RNA virusa. Eukarioti su glavni domaćini RNA virusa, posebno biljke i beskralježnjaci. Takvi virusi su izuzetno raznoliki. Istraživanje RNA viroma se u velikoj mjeri odnosilo prema virusima koji inficiraju ljude, stoku i poljoprivredne biljke. Zbog navedenih ograničenja i pristranosti, jako je teško rekonstruirati evolucijsku prošlost RNA virusa.

Međutim, otkriven je gen koji kodira RNA-ovisnu RNA-polimerazu (RdRp). Gen RdRp je univerzalan među RNA virusima, uključujući RNA replikone bez kapsida, ali isključuje nekoliko virusnih satelita. Čak i unutar tri Baltimore klase, genomi virusa ne uključuju potpuno konzervirane gene osim onih koji kodiraju RdRp (Eugene V. Koonin i sur., 2021). Svi pokušaji zaključivanja filogenteskih odnosa među RNA virusima se temelje na analizi sekvence RdRp (Edward C. Holmes, 2009). Gen RdRp i kodirani protein su ciljevi evolucijske analize jer su oni jedini univerzalni gen i kodirani protein povezan s RNA virusima. Takva filogenetska ispitivanja su pokazala da postoji do osam jako kratkih aminokiselinskih motiva koji su konzervirani u svim poznatim RdRp-ovima. Najpoznatiji motiv je Gly-Asp-Asp (GDD) i njegove varijante, smješten unutar konzervirane strukture poddomene dlana. Filogenetska stabla usredotočena oko navedenih konzerviranih motiva su korištena za izradu shema klasifikacije višeg reda za RNA viruse. Prva istraživanja su predložila tri supergrupe jednolančanih(+) RNA virusa, iako je svaka sadržavala viruse s vrlo različitim organizacijama genom. Koronavirusi, pikornavirusi i potivirusi su zajedno smješteni u supergrupu I, a karmovirusi, flavivirusi i pestivirusi, zajedno s bakteriofagima su smješteni u supergrupu II. Supergrupa III sadrži alfaviruse i timoviruse. Kasnijim istraživanjima predloženo je šest supergrupa: alfavirusi, karmovirusi, koronavirusi, flavivirusi, pikornavirusi i sobemovirusi, od kojih svaka sadrži viruse s približno sličnom organizacijom genoma.

Druga filogenetska ispitivanja razmatrala su evolucijski odnos između supergrupa jednolančanih (+)RNA virusa, jednolančanih (-)RNA virusa i dvolančanih RNA virusa, s posebnim naglaskom na determinaciju skupine koja je prva divergirala. Internacionalni komitet za taksonomiju virusa (eng. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)) je službeno odredio nekoliko grupa RNA virusa višeg reda: Mononegavirales i Nidovirales. Mononegavirales je skupina kojoj pripadaju četiri porodice nesegmentiranih jednolančanih RNA virusa: Bornaviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae i Rhaboviridae. Porodice Arteriviridae, Coronaviridae i Roniviridae pripadaju skupini Nidovirales i to su jednolančani (+)RNA virusi. Predložen je i poredak Picornavirales koji obuhvaća porodice Picornaviridae, Comoviridae, Dicistroviridae, Marnaviridae i Sequiviridae, zajedno s nekim neraspoređenim virusnim rodovima.

Glavni razlog zašto se nije uspostavila klasifikacija RNA virusa višeg reda je nedostatak statističkih podataka, kao i korištenje nesofisticiranih metoda za filogenetsku analizu.
Nedavna istraživanja otkrila su revolucionarni razvoj u metagenomici virusa čime je se uvelike proširilo znanje o raznolikosti RNA virusa i pružila neviđena količina podataka o sekvencama za istraživanje evolucije RNA virusa. Najvažniji događaj je bila masovna ekspanzija viroma beskralježnjaka, ponajviše zbog sekvenciranja metatranskriptoma različitih holobionata.
Naknadna filogenetska analiza otkrila je nepoznate linije (+)RNA i (-)RNA virusa i potaknula preispitivanje klasifikacije RNA virusa višeg reda, kao što su supergrupe RNA virusa.
RNA viromi gljivica i prokariota također su se značajno proširili, ali ne tako opsežno kao beskralježnjaci. Preispitani su evolucijski odnosi između i unutar tri Baltimore klase RNA virusa preko analize dostupnih genomskih i metagenomskih sekvenci. Istraživana je i evolucija proteina kapside (SJR-CP), dominantni tip kapsidnog proteina među RNA virusima.
Rezultati su otkrili monofiliju RNA virusa i očigledno podrijetlo od dvolančanih RNA virusa koji su evoluirali iz različitih grana RNA virusa iz najmanje dva neovisna događaja.
Kroz metaviromiku se mogu razjasniti mnogi aspekti evolucije RNA viroma. Rekonstrukcija prvih događaja u povijesti ostaje nerazjašnjena, pogotovo jer je gen RdRp jedini univerzalni gen RNA virusa i kao takav može poslužiti kao kalup za rekonstrukciju evolucijskih događaja (Eugene V. Koonin i sur., 2021).

4. MEHANIZMI EVOLUCIJE RNA VIRUSA

Evolucija virusa je rezultat mutacija i rekombinacija, i podložna je genetičkom driftu i prirodnoj selekciji (Raul Andino i sur., 2018). RNA virusi imaju dvije jedinstvene značajke koje su jako povezane, to su visoka stopa mutacija i mali genom. Stope mutacija RNA virusa su jako visoke i brze, čak za nekoliko redova veličine od stope mutacija DNA virusa. Procjene stope mutacija obuhvaćaju nekoliko redova veličine među RNA virusima i DNA virusima zajedno: od $1,5x10^{-3}$ mutacija po nukleotidu po replikaciji u jednolančanom (+)RNA bakteriofagu Qβ, do $1,8x10^{-8}$ mutacija po nukleotidu po replikaciji dvolančanog DNA virusa herpes simpleks tipa I (HSV-I). RNA virusi koji se repliciraju s genima RdRp imaju izmjerenu stopu mutacije: jedna mutacija po genomu po jednom krugu replikacije. Stoga, mutacija se dogodi prilikom svake replikacije genoma. Iz toga se može zaključiti da su mutacije ključne za evoluciju RNA virusa (Edward C. Holmes, 2009).

Mutacije su izvor genotipske raznolikosti unutar populacije koja evoluira. Geni RdRp su posebno skloni greškama, pokazuju najveću stopu mutacija u prirodi. Posljedično, RNA virusi evoluiraju izuzetno brzo. Što je veća stopa mutacija RNA virusa, to je duljina genoma kraća. Određivanjem vjerojatnosti pojave mutacija u populaciji, stope mutacija služe kao bitni parametri u filogenetskom zaključivanju i populacijskoj genetici. Stope mutacija se mogu odrediti iz fluktuacijskih testova koji se temelje na mjerenju frekvencije reverzije mutantnog fenotipa. Upravo pomoću fluktuacijskih testova otkriveno je da je stopa mutacije u RNA virusima jedna mutacija po genomu po replikaciji.

Geni RdRp pokazuju različite stope mutacija za pojedine nukleotidne supstitucije (A u G, A u U). Napravljen je modificirani fluktuacijski test kako bi se procijenila klasno-specifična stopa mutacija virusa gripe A (IAV), koristeći biblioteku GFP mutanata. Analiza se oslanja na virusima koji kodiraju za nefluorescentne mutante GFP-a koji se mogu revertirati pojedinačnim mutacijama svake klase. Zelena boja će razlikovati fluorescentne mutante od nefluorescentnih mutanata i na taj način se može odrediti stopa mutacije.

Osim mutacija zbog greški prilikom replikacije RdRp, na stopu mutacija virusa utječu i enzimi domaćina, uključujući kompleks za uređivanje poliproteina B (APOBEC) i RNA specifičnu adenozin deaminazu (ADAR). Proteini APOBEC djeluju kao restriktivni faktori za retroviruse i

DNA viruse. Proteini iz obitelji proteina ADAR djeluju direktno na regije dvolančanih RNA tako što deaminiraju adenozin u inozin pri čemu A prelazi u G. Takve mutacije koje rade proteini iz obitelji ADAR su pronađene u brojnim virusima: virus gripe, ospice, Rift Valley virus i Drosophila sigma virus. Također, Ebola virus (EBOV) i ZIKV su potencijalne mete proteina iz ADAR obitelji. Uzroci EBOV-a su pokazali sveprisutnost mutacija A u G (U u C u sense lancu EBOV).
Proteini ADAR snažno djeluju na rast virusa, pokazuju i antivirusno i provirusno djelovanje, ovisno o sustavu o kojem je riječ. Svi podaci o aktivnosti ADAR-a i utjecaju na evoluciju virusa se još uvijek sakupljaju, ali svi podaci sugeriraju da je ADAR vrlo vjerojatan izvor raznolikosti RNA virusa (Raul Andino i sur., 2018).

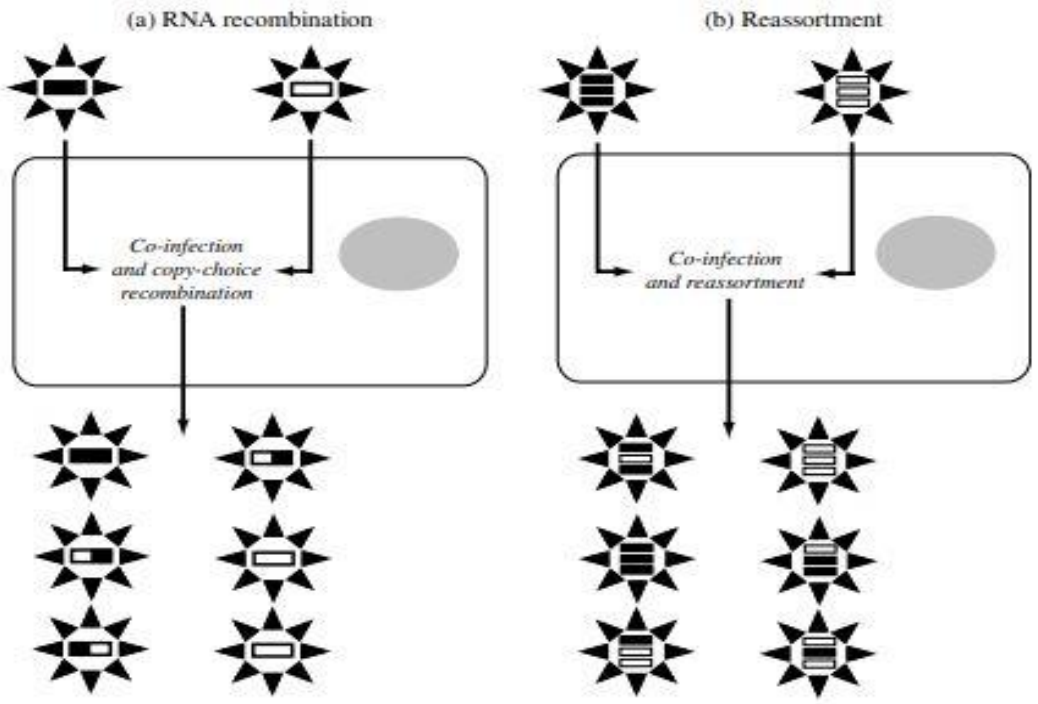
4.1 SELEKCIJA I DRIFT

Svaka mutacija ima karakterističan efekt na ishod replikacije i fitness virusa, odnosno mutacijski fitness efekt. U RNA virusima fitness efekt (W) većine mutacija je štetan (W<1) ili letalan (W=0). Mutacije koje ne utječu, ili jako malo utječu na fitness virusne populacije se karakteriziraju kao neutralni ili gotovo neutralni (W≈1) su relativno rijetke. Mutacije prisutne u genomu, u genotipu određuje fitness ili fenotip genoma. Prirodna selekcija također djeluje na raznolikost fenotipa mutatorskih genoma u populaciji, te doprinosi povećanom fitnessu.
Pozitivna selekcija znači da će se korisne mutacije povećati sve dok se ne fiksiraju. Negativna selekcija uklanja štetne mutacije koje rezultiraju smanjenim fitnessom populacije. Kao takva, prirodna selekcija je jako bitan determinacijski faktor u evoluciji virusnih populacija.
Osim prirodne selekcije, bitan determinacijski faktor je genetički drift. Genetički drift je iznenadna i neočekivana promjena u frekvenciji pojedini gena jedne generacije u odnosu na drugu unutar iste populacije. Kao posljedica genetskog pomaka neki aleli mogu potpuno nestati te se tako smanjuje genetska raznolikost populacije. Smanjenje genetskog pomaka je bitna komponenta za očuvanje genetskih resursa. Genetički drift može dovesti do fiksacije neutralnih i štetnih mutacija u populaciji. Kada veličina populacije počne naglo opadati neutralne i štetne mutacije se mogu popraviti, a rijetki adaptivni oblici se izgube sve dok se ne uvedu ponovno mutacijom u kasnijim generacijama.

Također, veličina populacije se smanjuje tijekom prijenosa virusa u nove domaćine, a pogotovo u nove vrste. Neutralne i štetne mutacije također nastaju genetičkim draftom, srodnim fenomenom gdje se ove mutacije fiksiraju tako što se povežu sa adaptivnim mutacijama (Rau Andino i sur., 2018).

4.2 REKOMBINACIJA I REARANŽMAN GENOMA

U malim populacijama drift vodi do akumulacije neutralnih i štetnih ''hitchhiker'' mutacija. Bez mehanizma koji uklanja štetne mutacije iz populacije, ta populacija će biti nadvladana tim štetnim mutacijama. Rezultat je usporavanje stope evolucije, efekt poznat kao Mullerov zatezač. Mullerov zatezač govori da je nužno da se genom počne prebacivati, odnosno genom se oštećuje zbog slobodnih radikala i kisika, te se zbog toga prebacuje u jezgru, tj. kompartiment. U većim populacijama koje imaju visoke stope mutacija, mnogi adaptivni aleli kocirkuliraju i natječu se međusobno. U takvim slučajevima, rekombinacije je korisna jer kombinira povoljne alele da bi nastali novi genotipovi s boljim fitnessom. Rekombinacija RNA virusa se događa mehanizmom ''copy choice'' replikacije u kojem RdRp povezan s novonastalim transkriptom disocira s jednog kalupa i prelazi na drugi. Kad se to dogodi u istom mjestu, rekombinacija je homologna. Kad se rekombinacija dogodi između različitih mjesta (ili sa staničnom RNA), rekombinacija je nehomologna (Raul Andino i sur., 2018).
Dakle, ovaj oblik rekombinacije može biti homologan tako da se događa između regija sa homolognim sekvencama, ili može biti nehomologan kada se genetički materijal premješta između različitih genomskih regija. I homologna i nehomologna rekombinacija su opisane u raznim RNA virusima (Edward C. Holmes, 2009).



Slika 2. Prikaz kako (a) copy choice rekombinacija RNA i (b) rearanžman tvore nove genetičke kombinacije u RNA virusima. Rearanžman se događa isključivo u virusima sa segmentiranim genomima. Preuzeto iz The Evolution and Emergence of RNA viruses, Edward C. Holmes 2009

Homologna rekombinacija daje vijabilne rekombinante, a nehomolognom rekombinacijom obično nastaju subgenomske vrste RNA koje se nazivaju neispravne interferirajuće (DI) RNA. Takve RNA su pronađene u virusu denge, zaušnjacima, virusu sendai, virusu vezikularnog stomatitisa i virusu bromovog mozaika.

Rearanžmani genoma se događaju u RNA virusima koji imaju segmentirane genome (Raul Andino i sur., 2018). Kada više genotipova inficira jednu stanicu, potomci nasljeđuju razne kombinacije segmenata gena od roditeljske virusne stanice u procesu koji je analogan neovisnoj raspodijeli tijekom mejoze.

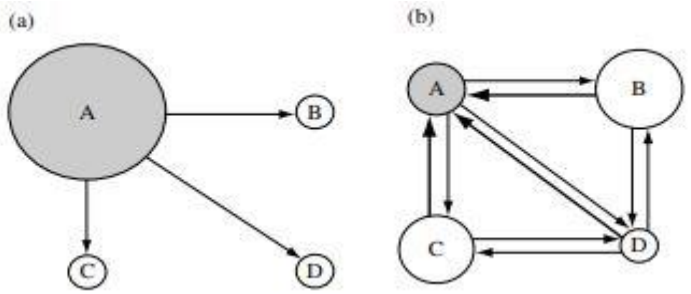
U ovom slučaju, dva virusa koinficiraju jednu stanicu i nastaju potomci koji u svom genomu imaju pakirane segmente od različitih predaka. Kao primjer, reasortant ''7+1'' virusa gripe A ima sedam genomskih segmenata koji imaju porijeklo od jedne roditeljske linije, a preostali segment potječe od neke druge linije. Virusi koji su reasortanti zapravo predstavljaju antigene mnogim populacijama domaćina, što dovodi do širenja pandemije u nezaštićenoj populaciji.

Rearanžman tvori učinkovito sredstvo za istraživanje kombinacija genotipova, uz istovremeno očuvanje epistatskih interakcija unutar segmenata gena (Edward C. Holmes, 2009).

5. KVAZIVRSTE RNA VIRUSA

Davnih 70-tih godina prošlog stoljeća predstavljena je ideja da RNA virusi tvore složene strukture nazvane kvazivrste. Ta ideja je dominirala raspravama o mehanizmima evolucije RNA virusa. Teoriju o kvazivrstama je postavio Manfred Eigel kao matematički model samoreplicirajućih makromolekula kako bi pojasnio evoluciju života u predstaničnom RNA svijetu (Edward C. Holmes, 2009).

Kvazivrste predstavljaju oblak različitih varijanti povezanih mutacijama koje interagiraju na funkcionalnoj razini i zajedno doprinose karakteristikama populacije. Temelj teorije kvazivrsta je klasična populacijska genetika, ali nastoji istražiti posljedice replikacija sklonih greškama. Također, koristi se kako bi opisala evolucijsku dinamiku RNA virusa i mnoge pretpostavke su eksperimentalni potvrđene u modelima sustava (Raul Andino i Adam S. Lauring, 2010).



Slika 3. Kvazivrste. (a) Virusna populacija koja nema strukture kvazivrsta, prirodna selekcija favorizira varijantu A, iz koje mutacijama nastaju varijante B, C i D koja ima najmanju stopu. (b) Kvazivrste između kojih je došli do mutacijskih prespajanja (označeno strelicama u oba smjera) osigurava da virusna populacija evoluira kao jedinstvena cjelina, iako varijanta A ima najveći fitness. Učestalost svake varijante u populaciji prikazana je veličinom kruga.
Preuzeto iz The Evolution and Emergence of RNA viruses, Edward C. Holmes 2009

Većina virusa kodira enzime potrebne za replikaciju vlastite DNA ili RNA. Intrinzična stopa pogreške ili vjernosti replikaze određuje stopu mutacija tog virusa i raspon genetičkih varijacija na koje može djelovati prirodna selekcija. Virusne RNA polimeraze pokazuju nisku vjernost i stopa mutacija iznosi 10^{-4} po nukleotidu, što je za nekoliko redova veličine viša nego kod DNA virusa. Svaka moguća točkasta mutacija i dvostruka mutacija je povezana sa svakim ciklusom replikacije virusa i može se ispoljiti u populaciji u bilo kojem trenutku. Budući da RNA virusi postoje kao oblaci sličnih varijanti koji se kontinuirano regeneriraju mutacijama sličnih sekvenci,

sposobnost da se predvidi ishod infekcije ili terapijske intervencije iz proučavanja izoliranih klonova je limitirana. Bilo koji molekularni klon će se transformirati u kolekciju srodnih sekvenci čim uđe u stanicu. Takve kolekcije, odnosno kvazivrste su organizirane oko glavne sekvence – master sekvence. Master sekvenca se može podudarati sa konsenzus sekvencom neke populacije.

Ako se virusni genom replicira, dati će tisuću potomaka koji se razlikuju otprilike u jednom položaju u genomu. U sljedećim krugovima replikacije stvorit će se složeniji mutanti s varijantama koje se nalaze dalje jedna od druge u prostoru sekvenci. Takvi mutanti tvore oblak kvazivrsta u kojima mutacija generira roj genomskih kandidata. Čim je stopa mutacija povećana, frekvencija će ovisiti o vjerojatnosti da će varijanta biti mutirana *de novo* mutacijom zbog susjednih sekvenci (Raul Andino i Adam S. Lauring, 2010).

5.1 STOPE MUTACIJA I MULLEROV ZATEZAČ

Stopa mutacija tijekom replikacije RNA i retrotranskripcije iznosi 10^{-4} do 10^{-5} supstitucija po kopiranom nukleotidu. Stopa pogreške prilikom replikacije DNA u prokariotskim i eukariotskim stanicama iznosi 10^{-8} do 10^{-11} po paru baza po jednom krugu replikacije. Razlog visoke stope grešaka u RNA virusima je taj što RNA replikaza i reverzna transkriptaza nemaju 3'→ 5' egzonukleaznu aktivnost, odnosno lektorirajuću aktivnost. Nadalje, RNA intermedijeri nemaju dvolančane strukture i zato nemaju mehanizam popravaka neusklađenosti kojeg imaju i koji je učinkovit u dvolančanim molekulama DNA. Stopa mutacija se može povećati i za nekoliko redova veličine kod mutanata koji nemaju mehanizam popravka. Hipermutabilnost je dokumentirana za nekoliko RNA virusa i nekih stanica, kao što su stanice raka kod ljudi.

Struktura kvazivrsta ima brojne implikacije na biologiju RNA virusa.

Najočitija implikacija vezana za virusnu patogenezu je da mutantni rojevi čine ogromne rezervoare varijanti s potencijalno korisnim fenotipovima uslijed promjene u okolišu (tkivno specifične, antigenski promijenjene ili varijante otporne na lijekove).

Druga implikacija vezana za tumačenje virusne evolucije je da unatoč visokoj stopi mutacija i varijacija u spektru mutanata, konsenzus sekvenca može ostati invarijantna za mnoge generacije. Takvi uvjeti predstavljaju populacijsku ravnotežu i objašnjavaju evolucijski zastoj virusa usprkos kontinuiranoj replikaciji virusa. Jedan virus može pokazati zastoj u jednom biološkom kontekstu i brzu evoluciju u drugom.

Treća implikacija strukture kvazivrsta je da predviđa važne učinke uskog grla boce na fitness virusa. Učinak uskog grla boce opisuje smanjivanje ukupnog genskog poola i time reduciranje određenih genskih karakteristika zbog nekih nepogoda, npr. fizičko odvajanje populacije ili neka prirodna katastrofa. Bilo koji genom koji je nasumično sakupljen iz spektra mutanata, sadržavat će štetne mutacije u odnosu na konsenzus. Tada će stvarati potomstvo sa smanjenim fitnessom.

Samo u slučaju kada je kvazivrsta loše prilagođena okolišu ili se prilagođava na novi okoliš, tada će novonastali mutanti imati veliku vjerojatnost povećanog fitnessa u odnosu na ansambl. Smanjenje fitnessa RNA virusa zbog serijskih učinaka uskog grla boce podudara se sa važnim konceptom populacijskoj genetici, a to je Mullerov zatezač.
Mullerov zatezač govori da aseksualne populacije organizama s malom veličinom populacija i visokom stopom mutacija često nastoje uvoditi štetne mutacije. Mutacije koje se uvode su nepovratne, osim ako postoje kompenzacijski mehanizmi poput rekombinacije koji će povratiti inicijalnu klasu genoma koja nema mutaciju (John J. Holland i sur., 1996).

6. MAKROEVOLUCIJA VIRUSA

6.1 EVOLUCIJA VELIČINE GENOMA

Bitno biološko svojstvo RNA virusa su mali genomi. Veličina genoma RNA virusa varira ovisno o stanici domaćina kojeg virus inficira. Najmanja infektivna čestica za koju se smatra da je RNA virus (a ne viroid) je *Ophistoma novo-ulmi* mitovirus 6-Ld koja sadrži 2 343 nukleotida. Postoji jako malo RNA virusa čija je veličina genoma manja od 4 000 nukelotida. Najveći RNA virusi su koronavirusi koji imaju veličinu genoma od približno 30 000 nukleotida. Gledajući RNA viruse u cjelini, prosječna veličina genoma bi bila 10 000 nukleotida. Daleko širi raspon veličine genoma imaju DNA virusi, od 1 758 nukleotida (*Circoviridae*) do 1 181 404 nukleotida (*Acanthamoeba polyphaga mimivirus*).
Bitno je naglasiti da su genomi svih jednolančanih DNA virusa mali, nijedan nije veći od 11 000 nukleotida. Takvo ograničenje veličine genoma sugerira da su jednolančani DNA virusi u svojoj evoluciji jako slični RNA virusima. Veličina genoma dvolančanih DNA virusa je velika jer oni sadržavaju i gene svog domaćina.
Genomi segmentiranih RNA virusa su nešto veći od genoma nesegmentiranih RNA virusa. Reovirusi kao najveći imaju 29 000 nukleotida i 12 segmenata. Izuzetak su *Coronaviridae* i *Roniviridae*, koji su dugi i nesegmentirani.
Postoji više hipoteza o veličini genoma RNA virusa (i jednolančanih DNA virusa). Veličina genoma je ograničena maksimalnom veličinom genoma koja može biti pakirana unutar jednog viriona. Također, posebno je važno topološko ograničenje s kojim se suočavaju svi RNA virusi, a to je odmatanje potencijalno dugih područja dvolančanih RNA tijekom replikacije. Kod RNA virusa sa duljim genomima, ovaj proces je posredovan posebnom helikaznom (HEL) domenom. Potencijalna važnost navedenog ograničenja leži u ideji da u jednolančanim (+)RNA virusima postoji snažna povezanost između prisutnosti HEL domene i veličine genoma koja je veća od 6 000 nukleotida. Može se izvući zaključak da stjecanjem HEL domene dolazi do glavnog prijelaza u virusnoj evoluciji jer je omogućila da se veličine genoma povećaju iznad prethodne

razine praga. Time se generiraju više fenotipske raznolikosti. Najvjerojatnije je da sposobnost odmotavanja dugih molekula RNA igra značajnu ulogu u određivanju veličine genoma, ali ne objašnjava zašto i jednolančani RNA virusi posjeduju male genome.
Veličina genoma može biti ograničena i zahtjevom za brzu replikaciju. Budući da se RNA virusi natječu sa stanicom domaćina i međusobno za stanične metabolite, što je manji genom, onda će se i virus brže replicirati i na taj način ima selektivnu prednost. Iako brza replikacija donosi prednost RNA virusima, teorija ipak ne objašnjava raspon veličine genoma koji imaju dvolančani DNA virusi, iako se može očekivati da će kao obligatni paraziti biti pod znatnim pritiskom da se brzo repliciraju. Uz to, ne postoji jasna veza između stope replikacije i veličine genoma u onih RNA virusa koji su proučeni.
Najvjerojatnije objašnjenje za male veličine genoma RNA virusa je to da je količina genomskog materijala ograničena intrinzičnim procesom replikacije koja je sklona greškama. Ako postoji konstantna stopa mutacija po nukleotidu, što je dulji genom, biti će veći broj štetnih mutacija. Teorija proizlazi iz jednog od najvažnijih aspekata biologije RNA virusa: ''error-prone'' replikacija RNA virusa. Budući da dvolančani DNA virusi imaju visoku vjernost replikacije i znatno nižu stopu mutacija , mogu postići mnogo veće veličine genoma (Edward C. Holmes, 2009).

6.2. KORONAVIRUSI I RONIVIRUSI

Izuzetak u evoluciji genoma su koronavirusi i ronivirusi, koji zajedno s arterivirusima čine red Nidovirales. *Coronaviridae* i *Roniviridae* imaju nesegmentirani jednolančani (+)RNA genom. Veliki su otprilike od 26 000 do 32 000 nukleotida. Njihova veličina genoma premašuje veličine genoma uočenih kod drugih RNA virusa. Kodiraju polipeptid duljine 7 000 aminokiselinskih ostataka, što je dvostruko više od veličine otvorenog okvira čitanja u bilo kojoj drugoj porodici virusa. Genomi koronavirusa i ronivirusa su duplo veći od njima srodnih arterivirusa (13 000 – 16 000 nukleotida). Razlog tome je što koronavirusi i ronivirusi imaju iznimno veliki gen replikazu (>20 000 nukleotida) koji se sastoji od više funkcionalnih domena. Jedne od takvih domena su RdRp i HEL domena. Bitno je izdvojiti i ExoN domenu koja kodira 3c→ 5c egzoribonukleazu. Domena ExoN sadrži neke sličnosti sa staničnim proteinima domaćina iz DEDD superobitelji nukleaza. Takve egzonukleaze su uključene u ''proofreading'' i popravak greški. Ta činjenica govori da su koronavirusi i ronivirusi sposobni smanjiti stopu pogrešaka povezanih sa RdRp pomoću vrste popravka koja vrlo vjerojatno uključuje lektorirajuću aktivnost 3c→ 5c egzoribonukleaze. Na taj način je smanjen nastanak mutacija i omogućena je veća veličina genoma. Važno je napomenuti i da arterivirusi također imaju genome koji su poprilično veći u odnosu na genome nesegmentiranih RNA virusa. Međutim, nisu jasne posljedice navedenih funkcija popravka na evolucijsku brzinu.
Strategija replikacije Coronaviridae i Roniviridae je jedinstvena među RNA virusima upravo zbog

posjedovanja vrlo velikog genoma. Veliki replikazni gen ovih virusa se sastoji od dva velika otvorena okvira čitanja. Također, iako je aktivnost RNA polimeraze koronavirusa posljedica nestrukturiranog proteina 12 (Nsp12) koji sadrži uobičajenu konzerviranu RdRp domenu, također sadrži i drugi RdRp unutar Nsp8, koji su možda nastali iz Nsp12 duplikacijom gena (Edward C. Holmes, 2009).

6.3 EVOLUCIJA ORGANIZACIJE GENOMA

Iako su genomi RNA virusa mali veličinom, njihova očigledna jednostavnost skriva izvanrednu količinu genomske složenosti. Moguće je raspodijeliti organizaciju genoma i strategije replikacije RNA virusa u 6 glavnih kategorija. Te kategorije ističu temeljne biološke razlike među virusima koji imaju dubok utjecaj na njihovu evoluciju.
Tih 6 kategorija su: 1) jednolančani (-)RNA nesegmentirani, 2) jednolančani (-)RNA segmentirani, 3) jednolančani (+)RNA nesegmentirani, pojedinačni poliprotein, 4) jednolančani (+) nesegmentirani, subgenomske RNA, 5) jednolančani (+)RNA nesegmentirani, ribosomski okvir čitanja i 6) jednolančani (+)RNA segmentirani virusi.
Budući da su dvolančani RNA virusi slični jednolančanim (-)RNA virusima, jer se transkripcija događa prije translacije i obuhvaćaju i segmentirane i nesegmentirane genome, zajedno čine jednolančane (-)RNA viruse.
Navedene kategorije predstavljaju raznoliki niz organizacije genoma koji se najjednostavnije može objasniti na način da svaka kategorija predstavlja neovisno podrijetlo kao odbjegli stanični gen (Edward C. Holmes, 2009).

6.4. PROCES EVOLUCIJE GENOMA

Jako je bitno proučiti evolucijske procese kojima su genomi zapravo nastali. U tom smislu jako bitnu ulogu ima prirodna selekcija u odnosu na genetički drift u molekularnoj evoluciji. Utvrđeno je da jako bitne značajke organizacije genoma u eukariota i prokariota, kao što su broj dupliciranih gena, mobilnih elemenata i introna, su zapravo rezultat sasvim nasumičnih procesa. Također, ne postoji puno dokaza da je genetički drift imao veliku ulogu u oblikovanju genoma RNA virusa.

RNA virusi, čak i oni s najvećim genomima, sadrže malo nefunkcionalne intergenomske DNA, pseudogene ili introne. Upravo zbog toga, evolucijska strategija koju RNA virusi provode je korištenje ograničeno genoma sa što većom učinkovitošću. Na primjer, prisutna je opće tendencija grupiranja strukturnih gena u jednu regiju virusnog genoma, a nestrukturiranih gena u drugu. Obzirom da mnogi jednolančani (+)RNA virusi kodiraju za jedan pojedinačni polipeptid, teško je zamisliti kako bi genetički drift mogao utjecati na evoluciju genoma u takvim uvjetima. Postoje četiri načina evolucijske promjene koji objašnjavaju raspon struktura genoma kod RNA virusa. Mogu nastati kao dugoročni rezultat jednostavne divergentne evolucije koja proizlazi iz nakupljanja točkastih mutacija iz zajedničkog genoma pretka. Genom pretka je također već sadržavao gene jezgre koji su potrebni RNA virusima (na primjer gen RdRp i geni za kapsidu). Drugi način nastanka je česta upotreba preklapajućih okvira čitanja ili nastaju serijom duplikacija gena. Četvrti način nastanka uključuje LGT događaje , odnosno događaje koji uključuju genetički materijal drugih RNA virusa ili genom domaćina, što je jako slično načinu na koji bakterije generiraju genomsku raznolikost (Edward C. Holmes, 2009).

7. TAKSONOMIJA VIRUSA

Populacije virusa su veoma raznolike, i zato su sposobne inficirati veliki broj stanica. Prokarioti i eukarioti imaju vlastite viruse. Virus prokariota je lambda virus koji je karakterističan samo za bakteriju *Escherichia coli*. Virusi eukariota su specifični za stanice i za vrste obzirom da inficiraju različite višestanične organizme.

Prema Internacionalnom komitetu za taksonomiju virusa (ICTV) postoji više od 5 000 vrsta bakteriofaga unutar 13 porodica i 4 000 životinjskih i biljnih virusa unutar 56 porodica. Bakteriofagi su virusi koji inficiraju bakterije. Većina bakteriofaga su DNA virusi, a genom je kružni, linearni, jednolančani ili dvolančani. Kapsida je ikozaedarska sa ili bez šupljeg repa. Od 13 porodica bakteriofaga, samo dvije porodice su RNA virusi: *Leviviridae* i *Cystoviridae*.

Biljni virusi su najčešće u obliku štapića ili filamenta. Za razliku od bakteriofaga, više od 75% biljnih virusa imaju RNA genom. Porodice biljnih virusa koje imaju RNA genom su: *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, *Chrysoviridae*, *Closteroviridae*, *Luteoviridae*, *Potyviridae* i *Virgaviridae*. Svi RNA genomi su linearni, osim dva DNA genoma koja su kružna kod porodica *Geminiviridae* i *Nanoviridae*. Biljni virusi imaju manje od desetak gena i jako su maleni. Ovise o vektorima kako bi uspješno završili svoj životni ciklus jer biljke imaju staničnu stijenku koja predstavlja zaštitnu barijeru protiv virusne infekcije.

Virusi koji napadaju ljudsko tijelo postoje u različitim oblicima i veličinama. Razlog takvoj složenosti je složenost eukariotskih domaćina. Virusi su raspoređeni u 24 porodice, od kojih 14 čine porodice virusa koje uzrokuju humane zarazne bolesti. Genom može biti linearni dvolančani, linearni jednolančani ili kružni dvolančani. Svi RNA genomi su linearni, ali postoje određene varijacije obzirom na točan oblik RNA. Unutar ovih 14 porodica, postoji 6 porodica DNA virusa: *Herpesviridae*, *Adenoviridae*, *Parvoviridae*, *Hepadnaviridae*, *Papillomaviridae* i *Poxviridae*.

RNA virusi koji uzrokuju humane zarazne bolesti pripadaju 8 porodica: *Orthomyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Flaviviridae*, *Filoviridae*, *Coronaviridae*, *Retroviridae*, *Paramyxoviridae* i *Rhabdoviridae* (Joseph Panno, 2011).

7.1 ORTHOMYXOVIRIDAE

Riječ je o porodici virusa gripe. U cijelome svijetu, gripa je odgovorna za milijune smrtnih slučajeva. Postoje tri soja ovih virusa koji se nazivaju A, B i C.
Virus gripe je sferična omotana čestica prosječne veličine od 100 nm. Genom se sastoji od 8 kromosoma jednolančane (-) RNA, ukupne veličine 13 600 nukleotida. Virus se sastoji od 9 različitih strukturnih proteina, proteina matriksa, nukleokapsidnih proteina i RNA polimeraze. Omotač se sastoji od dva glikoproteina koji se zovu hemaglutinin (HA) i neuraminidaza (NA). Oba glikoproteina imaju važnu ulogu u ciklusu infekcije. Hemaglutinin prepoznaje i veže se za receptor na staničnoj površini, a neuraminidaza navodi virus u dišnom traktu da dođe do ciljnih stanici. Četiri podtipa HA (H1, H2, H3 i H4) i dva NA podtipa (N1 i N2) koja su specifična za ljude. Ovi podtipovi generiraju veliki broj varijanti poput H1N1, H2N5, H5N1, itd.
Obzirom da je genom virusa gripe segmentiran, odnosno ima 8 kromosoma, postoji jako puno varijacija ovog virusa. To je razlog zašto su potrebna nova cjepiva svake godine.
Ako je stanica zaražena s dvije ili više varijanti virusa gripe, genomi se mogu miješati i može nastati novi virusni soj. Taj soj može biti virulentniji od ostalih sojeva i može biti otporan na postojeća cjepiva (Joseph Panno, 2011).

7.2 PICORNAVIRIDAE

Porodica *Picornaviridae* uključuje poliovirus i ostale viruse koji uzrokuju meningitis, konjunktivitis, miokarditis, određene oblike hepatitisa i prehladu.
Ovi virusi su relativno mali, veličine 30 nm, sa genomom koji se sastoji od jednolančane (+) RNA. Veličina genoma varira od 7 200 do 8 400 nukleotida i kodira 7 proteina, od kojih su četiri bitna za izgradnju kapside.
Pikornavirusi se vežu za imunoglobulinske receptore na staničnoj membrani i na taj način uzrokuju konformacijsku promjenu kapside. Dolazi do ubrizgavanja virusnog genoma u citoplazmu, te dolazi do početka životnog ciklusa. RNA se prevodi pomoću ribosoma domaćina u veliki prekursorski protein koji će daljnjim procesiranjem dati sve strukturne i enzimatske virusne proteine. Na ovaj način nastaje i RNA polimeraza koja je zaslužna za replikaciju virusnog genoma.
Virusi izlaze iz stanice pucanjem membrane, i na taj način ubija stanicu. Cijeli životni ciklus traje oko pet do deset sati (Joseph Panno, 2011).

7.3 FLAVIVIRIDAE

Ovi virusi su dio ekološke skupine, poznati kao arbovirusi. Prenose se na ljude preko člankonožaca (krpelji i komarci) i glodavaca. Virus žute groznice i groznice Zapadng Nila se prenose preko komarca. Genom virusa je jednolančana (+) RNA , sastoji se od 1 100 nukleotida. Kodira 9 proteina, od kojih su tri nalaze u omotaču.
Flavivirusi ulaze u stanicu endocitozom. Nakon što se genom otpusti u citoplazmu, prevodi se pomoću ribosoma domaćina u veliki prekursorski protein koji se cijepa virusnim proteazama i proteazama domaćina . Na taj način nastaju svi virusni proteini.
Replikacija genoma se događa u citoplazmi, a virioni napuštaju stanicu egzocitozom (Joseph Panno, 2011).

7.4 FILOVIRIDAE

Virusi iz porodice *Filoviridae* se također prenose komarcima i krpeljima. Virusi Marburg i Ebola pripadaju ovim virusima i najpoznatiji su članovi ove porodice. Izazivaju groznicu koja je gotovo uvijek smrtonosna. Lako se prenose i s njima je jako opasno raditi.
Filovirusi su pleomorfni, pojavljuju se kao veliki zmijoliki oblici širine 80 nm i dužine 1 000 nm. Genom je jednolančana (-) RNA veličine 1 900 nukleotida.
Životni ciklus ovih virusa je neistražen (Joseph Panno, 2011).

7.5 CORONAVIRIDAE

Koronavirusi su veliki virusi promjera 120 do 160 nm. Pojedinačni kromosom, koji je najveći među RNA virusima, se sastoji od 3 200 nukleotida jednolančane (+) RNA. Unutar genoma pakirani su posebni virusni proteini u obliku helikalne nukleokapside.
Virus se sastoji od sedam proteina, od kojih su četiri strukturna proteina. Virus u stanicu ulazi endocitozom, nakon čega se kapsida razara oslobađajući genom u citoplazmu. Ribosomi stanice domaćina prevode dovoljnu količinu virusne DNA za proizvodnju RNA polimeraze virusa koja će sintetizirati virusnu mRNA i i učinkovito replicirati virusni genom.
Životni ciklus koronavirusa je neobičan jer se nukleokapsida formira u citoplazmi, i zatim ju preuzima Golgijev kompleks. Zreli virioni izlaze iz Golgijevog kompleksa unutar transportnih vezikula (mjehurića) koje ih nose do stanične membrane. Nakon što se vezikule spoje sa staničnom membranom, oslobađaju se zreli virioni (Joseph Panno, 2011).

7.6 RETROVIRIDAE

Retrovirusi su posebna skupina RNA virusa koja pretvara svoj RNA genom u DNA prilikom ciklusa infekcije. DNA verzija virusnog genoma je integrirana u kromosom domaćina gdje se prepisuje kako bi se proizvele virusne mRNA. Primjer retrovirusa je virus humane imunodeficijencije (HIV). Genom se sastoji od dva identična dijela RNA koji kodira devet preklapajućih gena. Geni Gag, Pol i Env su zajednički svim retrovirusima. Enzim zaslužan za pretvaranje RNA genoma u DNA naziva se reverzna transkriptaza. Ova skupina se naziva retrovirusima upravo zbog ovog enzima koji omogućava da se promijeni uobičajeni smjer biosintetskog puta DNA u RNA.

Retrovirusi procesiraju svoju mRNA kako bi proizveli više od jednog proteina iz bilo kojeg gena. Tada se sintetizira prekursorska mRNA i razdvaja se na pola kako bi nastala dva različita proteina. Gen Env kodira za dva proteina ovojnice, a gen Gag za protein matriksa i protein jezgre. Gen Pol kodira reverznu transkriptazu, koja je inače RNA-ovisna DNA polimeraza. Odnosno, polimeraza koristi RNA kao kalup kako bi sintetizirala komplementarni lanac DNA. Retrovirusi imaju jednostavnu strukturu i mali genom, ali pripadaju najpoznatijim virulentnim patogenima. Životni ciklus retrovirusa je složen. Kada retrovirus inficira stanicu, jezgra kapside puca i RNA genom se ispušta u citoplazmu. Odmah djeluje enzim reverzna transkriptaza kako bi se RNA prevela u DNA. Zatim se virusni geni transkribiraju i prepisuje se cijela duljina virusne DNA kako bi se proizvelo što više kopija kromosoma virusne RNA. Ciklus završava tako da se na kraju dobije lipidni dvosloj koji okružuje retrovirus, dok su proteini omotača virusnog podrijetla. Bitna značajka životnog ciklusa retrovirusa je da ne dolazi do puknuća membrane, stoga virus ne ubija stanicu kada izađe (Joseph Panno, 2011).

7.7 PARAMYXOVIRIDAE

Virusi iz ove porodice su odgovorni za infekcije dišnih putova, odnosno ospice i zaušnjake. Ospice i zaušnjaci su bili jako prisutni kod dojenčadi i djece prije pojave modernih cjepiva. Paramiksovirusi imaju jednolančani genom kojeg čine 1 500 nukleotida. Imaju šest do osam strukturnih proteina. Virusi ulaze u stanicu tako što se spoje sa membranom, te se nukleokapsida izravno oslobađa u citoplazmu. Genom jednolančane (-) RNA se konvertira u mRNA pomoću virusne RNA polimeraze koja se nalazi u nukleokapsidi. Zbog toga, nije potrebno da virusni genom uđe u jezgru stanice.

Životni ciklus ovih virusa se odvija u citoplazmi. Ribosomi domaćina translatiraju mRNA, a

proteini omotača se dodatno dorađuju kroz endoplazmatski retikulum i Golgijev kompleks (Joseph Panno, 2011).

7.8 RHABDOVIRIDAE

Virusi ove porodice uzrokuju neurološku bolest bjesnoću. Ljudi se mogu zaraziti virusom bjesnoće ako ih ugrize zaražena životinja (pas, šišmiš,..).
Genom virusa je jednolančana (-) RNA , i velik je 1 200 nukleotida. Virus se sastoji od pet proteina, uključujući RNA-ovisnu RNA polimerazu koja se nalazi u kapsidi.
Životni ciklus započinje tako što se virus veže za acetilkolin receptor na stanicama neurona središnjeg živčanog ciklusa. Vezani virus ulazi u stanicu endocitozom, nakon čega se njegov genom zajedno sa RNA polimerazom otpušta u citoplazmu. Enzim RNA polimeraza sintetizira virusnu mRNA i replicira genom virusa. Proteini se glikoziliraju u Golgijevom komplesku te se onda talože u citoplazmi. Novosintetizirani proteini virusa i RNA genom formiraju nukleokapside (Joseph Panno, 2011).

8. ZAKLJUČAK

RNA virusi se međusobno jako razlikuju po svojoj strukturi i funkciji. Međutim, postoje osobine virusa koje su zajedničke svim virusima. Virusi inficiraju stanicu tako da se vežu na specifične receptore na membrani. Kada virusna čestica uđe u stanicu, razara se kapsida i na taj način se virusni genom oslobađa u citoplazmu. Replikacija virusnog genoma je regulirana ekspresijom virusnih gena. Sastavni dijelovi virusa se sastavljaju i otpuštaju kao virioni iz stanice. Broj virusnih čestica u zaraženom organizmu je jako visok. Također, jedna zarazna čestica može proizvesti u prosjeku 100 000 kopija u danu. Veličine genoma se kreću između 3 i 30 kilobaza, zbog čega je broj gena po genomima malen. Zajedničko svim RNA virusima je da pokazuju iznimno visoke stope mutacija. Sve navedene značajke su jako bitne za razumijevanje evolucije RNA virusa. Visoke stope mutacija i snažna dinamika veličine populacija izdvaja RNA viruse od ostalih organizama i pruža pristup kojim se možda može razumjeti njihova evolucija.

RNA virusi koriste razne evolucijske strategije i zato se mogu odlično prilagoditi promjenama okoliša ili sustava u kojem se nalaze. Ako virus inficira organizam, virus mora evoluirati u svim selektivnim okruženjima, odnosno svim tkivima i stanicama u tom organizmu. Zbog toga je jako bitan evolucijski kapacitet virusa kako bi došlo do uspješne infekcije. Virusi predstavljaju ogroman teret ljudskoj civilizaciji upravo zbog te njihove sposobnosti brze evolucije i prilagodbe svim okolišima.

Kroz ovaj rad navedeno je nekoliko pristupa i načina istraživanja evolucije i biologije RNA virusa, prisutan je i snažan utjecaj kroz istraživanja metaviromike kako bi pridonijeli što boljem razumijevanju tog svijeta. Međutim, i dalje nedostaje dio koji bi objasnio odnose između (+) RNA, (-) RNA, dvolanačane RNA i retroelemenata. Potrebna su poboljšanja u raznim istraživanjima, kao na primjer opsežno istraživanje divergentnih proteina kao što je protein RdRp. Potrebna su i poboljšana istraživanja u metagenomici kako bi se otkrile i nove skupine virusa koje trenutno predstavljaju nepoznanicu RNA metagenoma.

9. LITERATURA

Panno J. (2011): VIRUSES: The Origin and Evolution of Deadly Pathogens, The new biology, str. 14-15; 31-54

Holmes E. C. (2009): The Evolution and Emergence of RNA Viruses, Oxford University Press, Oxford, str.1-3; 15-22; 29; 37; 87-88; 104-112

Wolf Y. I., Kazlauskas D., Iranzo J., Lucia-Sanz A., Kuhn J. H., Krupovic M., Dolja V. V., Koonin E. V. (2021): Origins and Evolution of the Global RNA Virome

Reanney D. C. (1982): The Evolution of RNA Viruses

Domingo E., Escarmis C., Sevilla N., Moya A., Elena S. F., Quer J., Novella I. S., Holland J. J. (1996): Basic concepts in RNA virus evolution

Dolan P. T., Whitfield Z. J., Andino R. (2018): Mechanisms ans Concepts in RNA Virus Population Dynamics and Evolution

Lauring A. S., Andino R. (2010): Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses

11. SAŽETAK

Virusi su najbrojniji biološki entiteti na Zemlji. Genom virusa je DNA ili RNA. RNA virusi podrazumijevaju i posebnu skupinu, retroviruse koji pretvaraju svoj genom u DNA kao dio ciklusa infekcije.
Animalni virusi su najkompleksniji jer inficiraju eukariote koji imaju najbolje razvijen imunološki sustav.
Postoje tri načina proučavanja evolucije RNA virusa: teorijsko, eksperimentalno i komparativno. Jedan od glavnih problema u istraživanju evolucije RNA virusa je više ograničenost podacima nego teorijom.
Jedan gen koji kodira RNA-ovisnu RNA polimerazu se naziva gen RdRp i univerzalan je među RNA virusima. Svi pokušaji o zaključivanjima filogenetskih odnosa među RNA virusima se temelje na analizama RdRp sekvenci.

KLJUČNE RIJEČI: RNA virusi, evolucija RNA virusa, retrovirusi, teorija regresivne evolucije, teorija odbjeglog gena, pre-stanična teorija, gen RdRp, selekcija, genetički drift, rekombinacija, rearanžman genoma, Mullerov zatezač, kvazivrste

12. SUMMARY

Viruses are the most common biological entities on Earth. Viruses have either DNA or RNA genome. RNA viruses also consists of a special group, the retroviruses, that convert their genomes to DNA as part of the infection cycle.
Animal viruses are the most complex, because they are infecting eukaryote organisms that have a very effective immune system.
There are three ways in which study of RNA virus evolution has proceeded: the theoretical, the experimenal and the comparative.
Many of the major problems in studying RNA virus evolution are limited more by data than theory.
A single gene encoding an RNA-dependent RNA polymerase is universal among RNA viruses and is called RdRp. All of attempts to infer the phylogenetic relationships of RNA viruses are based on the analysis o RdRp sequences.

KEYWORDS: RNA viruses, RNA virus evolution, retroviruses, the regressive evolution theory, the escaped gene theory, the pre-cellular life theory, RdRp gene, selection, genetic drift, recombination, reassortment, Muller's ratchet, quazispecies