

Struktura genoma i ekspresija gena virusa SARS-CoV-2

Bilić, Nika

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:075144>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Nika Bilić
0058218149

STRUKTURA GENOMA I EKSPRESIJA GENA
VIRUSA SARS-CoV-2
ZAVRŠNI RAD

Predmet: Molekularna genetika

Mentor: doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Struktura genoma i ekspresija gena virusa SARS-CoV-2

Nika Bilić, 0058218149

Sažetak:

Zaraza virusom SARS-CoV-2, nazvana COVID-19, obilježila je posljednje 3 godine. U tom razdoblju novootkriveni korona virus intenzivno se istražuje kako bi se bolje razumjela njegova svojstva i način prenošenja, te pronašle pogodne mete za razvoj učinkovitih antivirusnih lijekova. Genom virusa SARS-CoV-2 koji je kodirajući (+) lanac jednolančane pozitivne ribonukleinske kiseline, a zajedno s proteinima membrane, nukleokapside, omotnice i glikoproteinom šiljka čini virusnu česticu SARS-CoV-2. Genetički materijal u stanicu domaćina ulazi reakcijom glikoproteina šiljka i receptora domaćina angiotensin 1 konvertirajućeg enzima. Nakon ulaska u stanicu, dolazi do translacije RNA virusa prilikom čega nastaje 16 nestrukturnih proteina koji sudjeluju u ostatku životnog ciklusa. Također, formiraju replikacijsko-transkripcijski kompleks koji provodi kontinuiranu i diskontinuiranu transkripciju. Diskontinuirana transkripcija je jedinstveno obilježje korona virusa te se odvija mehanizmom zamjene kalupa, a rezultira subgenomskom RNA čijom ekspresijom nastaju strukturni proteini. Unatoč lektorirajućoj aktivnosti nestrukturnog proteina 14 koji sudjeluje u transkripciji RNA, SARS-CoV-2 karakterizira velik broj mutacija, a time i novih sojeva, među kojima su oni koji izazivaju zabrinutost: alfa, beta, gama, delta i najnoviji, omikron.

Ključne riječi: struktura genoma SARS-CoV-2, ekspresija gena u SARS-CoV-2, replikacijsko-translacijski kompleks, mutacije u genomu SARS-CoV-2

Rad sadrži: 23 stranice, 10 slika, 1 tablicu, 26 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Datum obrane: 18. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Genome structure and gene expression of SARS-CoV-2 virus

Nika Bilić, 0058218149

Abstract:

SARS-CoV-2 infection, or COVID-19, has strongly affected the last three years. During this period, the newly discovered coronavirus was intensively researched in order to better understand its properties and mode of transmission, and to find suitable targets for the development of effective antiviral drugs. SARS-CoV-2 virus has a single-stranded, positive-sense (+) RNA genome which together with membrane, nucleocapsid, envelope, and spike protein, makes viral particles. Interaction of host-cell receptor angiotensin 1 converting enzyme 2 (ACE2) with spike protein leads to the release of virus genetic material into the host cell. After entering the cell, RNA translation occurs, giving rise to 16 nonstructural proteins with an essential role in the rest of the virus life cycle. Also, they form a replication-transcription complex that carries out continuous and discontinuous transcription. Discontinuous transcription is a unique feature of coronaviruses that functions by template switching. It yields a set of subgenomic RNAs used to express structural proteins. Despite the proofreading activity of nonstructural protein 14, SARS-CoV-2 is characterized by many mutations, resulting with new variants, some of which are variants of concern (VOC). These variants are alpha, beta, gamma, delta, and most recent, omicron.

Keywords: structure of the SARS-CoV-2 genome, gene expression in SARS-CoV-2, replication-translation complex, mutations in the SARS-CoV-2 genome

Thesis contains: 23 pages, 10 figures, 1 table, 26 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Marina Svetec Miklenić, PhD, Assistant Professor

Thesis defended: July 18, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. STRUKTURA VIRUSNE ČESTICE SARS-CoV-2	2
2.2. GENOM VIRUSA SARS-CoV-2	3
2.3. ŽIVOTNI CIKLUS VIRUSA.....	4
2.3.1. <i>Ulazak u stanicu i translacija genoma virusa</i>	4
2.3.2. <i>RNA sinteza i diskontinuirana transkripcija</i>	8
2.3.3. <i>Preinake virusne RNA</i>	11
2.3.4. <i>Slaganje viriona i izlazak novonastalih virusa iz stanice</i>	12
2.4. REPLIKACIJSKO-TRANSKRIPCIJSKI KOMPLEKS.....	12
2.5. MUTACIJE U GENOMU VIRUSA SARS-CoV-2.....	14
2.5.1. <i>Soj B.1.1.7. (alfa)</i>	15
2.5.2. <i>Soj B.1.351 (beta)</i>	16
2.5.3. <i>Soj P.1 (gama)</i>	16
2.5.4. <i>Soj B.1.167.2 (delta)</i>	16
2.5.5. <i>Soj B.1.1.529 (omikron)</i>	17
3. ZAKLJUČAK	19
4. POPIS LITERATURE	20

1. UVOD

Korona virusi pripadaju redu *Nidovirales*, porodici *Coronaviridae* i potporodici *Coronavirinae*. Potporodica se nadalje dijeli na četiri roda-alfa korona viruse, beta korona viruse, gama korona viruse i delta korona viruse. Do danas, prepoznato je sedam sojeva korona virusa patogenih za čovjeka, dva alfa korona virusa hCoV-229E i hCoV-NL63 te pet beta korona virusa, hCoV-HKU1, hCoV-OC43, MERS-CoV, SARS-CoV i SARS-CoV-2 (Brant i sur., 2021). Dok hCoV-229E, hCoV-NL63 i hCoV-OC43 uzrokuju simptome slične prehladi, SARS-CoV, MERS-CoV i SARS-CoV-2 su uzročnici teškog akutnog respiratornog sindroma (eng. *severe acute respiratory syndrome*, SARS). SARS-CoV otkriven je 2002. godine u južnoj Kini prilikom čega je izazvao 8437 slučajeva zaraze sa stopom smrtnosti od 10%. MERS-CoV odgovoran je za pojavu bliskoistočnog respiratornog sindroma 2012. godine u Saudijskoj Arabiji s visokom stopom smrtnosti od 34%. SARS-CoV-2 otkriven je krajem prosinca 2019. godine u Wuhanu, Narodnoj Republici Kini. Nakon naglog širenja virusa u više od 150 zemalja, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) proglasila je u veljači 2020. godine zarazu SARS-CoV-2 virusom, nazvanom COVID-19, pandemijom (Bhat i sur., 2021.). Najčešći simptomi COVID-19 su temperatura, kašalj, umor, anosmija (gubitak osjeta njuha) i disgeuzija (poremećaj osjeta okusa), a u težim slučajevima obostrana upala pluća i smrt. U tom trenutku ukupan broj zaraženih iznosio je 79 331, a danas on iznosi 543 642 665 s 6 329 161 smrtnih slučajeva (JHU, 2022.)

Svi patogeni korona virusi smatraju se zoonotskim virusima, odnosno rezultatom prelaska virusa sa životinja na čovjeka, ponekad uz životinju posrednika. Tako beta korona virusi hCoV-OC43 i hCoV-HKU1 najvjerojatnije potječu od glodavaca, a preostali izvor beta korona virusa su najvjerojatnije šišmiši. U slučaju prijelaza SARS-CoV na čovjeka životinja posrednik je bila azijska cibetka, dok kod MERS-CoV je to bila deva. Nakon sekvencioniranja genoma SARS-CoV-2 utvrđeno je 96% podudaranje s korona virusom šišmiša RaTG13 iz južne Kine i 94% podudaranje s korona virusom pangolina upućujući na njegovo porijeklo, no s nepoznatom posrednikom (Brant i sur.,2021.). Poznati humani korona virusi i njihova osnovna svojstva navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Humani korona virusi (preuzeto i uređeno iz Brant i sur.,2021.)

Rod	Soj	Otkriven	Receptor	Simptomi
Alfa korona virus	hCoV-229E	1966.	aminopeptidaza N(CD13)	blagi
	hCoV-NL63	2004.	ACE2	blagi
Beta korona virus	hCoV-OC43	1967.	9-O-acetilat sialična kiselina	blagi
	hCoV-HKU1	2005.	9-O-acetilat sialična kiselina	blagi
	SARS-CoV	2003.	ACE2	teški
	MERS-CoV	2012.	DPP4	teški
	SARS-CoV-2	2020.	ACE2	teški

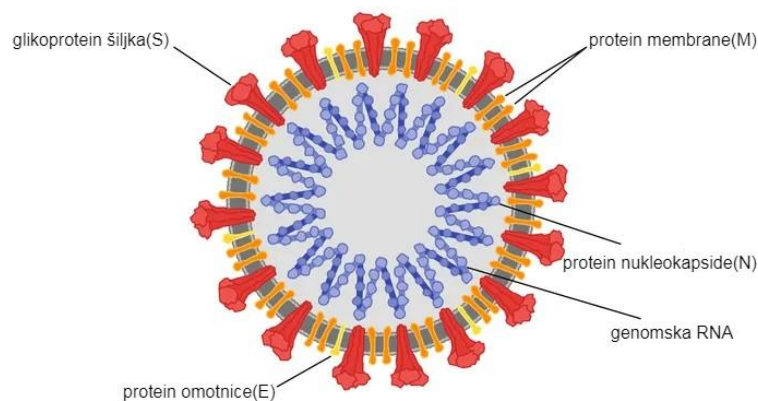
ACE2-angiotensin 1 konvertirajući enzim 2, DPP4-dipeptidil peptidaza 4

Tema ovog rada jest struktura genoma i ekspresija gena u virusu SARS-CoV-2. U teoretskom dijelu rada najprije će ukratko biti objašnjena građa čestice SARS-CoV-2 virusa (poglavljje 2.1.), a zatim će biti opisana struktura njegovog genoma (poglavljje 2.2.). U poglavljju 2.3. biti će obuhvaćeni svi dijelovi životnog ciklusa virusa, dok će poglavljje 2.4. dati detaljniji prikaz replikacijsko-transkripcijskog kompleksa. U posljednjem poglavljju teoretskog dijela rada (poglavljje 2.5.) biti će navedene najistaknutije mutacije i sojevi virusa koji izazivaju zabrinutost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. STRUKTURA VIRUSNE ČESTICE SARS-CoV-2

Struktura SARS-CoV-2 (Slika 1) virusa sačinjena je od četiri strukturalna proteina; glikoproteina šiljka (protein S), proteina omotnice (protein E), proteina membrane (protein M) i proteina nukleokapside (protein N). Protein S služi za interakciju sa stanicom domaćina te za ulazak genetičkog materijala u stanicu, a naziv cijele porodice *Coronaviridae* rezultat je njegovog izgleda i rasporeda na ovojnici koji pod elektronskim mikroskopom podsjeća na krunu (lat. *coronu*). Protein E važan je za patogenost virusa i zajedno s proteinom M služi za morfogenezu virusa i njegovo sastavljanje u stanici, a protein N se veže na genomsku RNA (gRNA) i na taj način čini ribonukleoproteinski kompleks zvan kapsida koji služi za pakiranje genoma u virus.



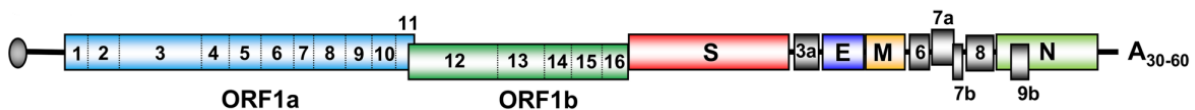
Slika 1. Shematski prikaz SARS-CoV-2 i njegovih strukturnih proteina: glikoproteina šiljka, proteina omotnice, proteina membrane i proteina nukleokapside (preuzeto i prilagođeno iz <https://www.britannica.com/science/2019-nCov>)

2.2. GENOM VIRUSA SARS-CoV-2

Genom virusa strukturiran je u obliku jednolančane kodirajuće (+) ribonukleinske kiseline koja sadrži 29 882, 29 891 ili 29 903 nukleotida čime predstavlja jedan od najdužih genoma među RNA virusima. Zbog visokog udjela adeninskih i uracilnih parova baza od 62 %, genom SARS-CoV-2 nestabilan je pri visokim temperaturama (Brant i sur.,2021.). SARS-CoV-2, kao i ostali humani korona virusi, na svojem 5' kraju ima m⁷G-kapu, a na 3' kraju ima 30 do 60 nukleotida dugačak poli-A rep koji osigurava stabilnost genoma i sprječava staničnu egzoribonukleaznu razgradnju. Virusni genom sastoji se od translirajućih i netranslirajućih dijelova (eng. *untranslated region*, UTR). Netranslirajući dio na 5' kraju genoma dugačak je 265 nukleotida i sadrži 5'-vodeću sekvencu koja djeluje kao regulator transkripcije (eng. *transcription regulatory sequence* TRS_L), ACGAAC i još nekoliko cis-djelujućih elemenata za regulaciju translacije, sinteze subgenomskih molekula RNA i pakiranje virusnog genoma. Netranslirajući dio SARS-CoV-2, koji se nalazi na 3' kraju genoma, dugačak je 337 nukleotida, a sadrži mjesto vezanja replikacijsko-transkripcijskog kompleksa (eng. *replication and transcription complex*, RTC), važnog za iniciranje replikacije i transkripcije lanca RNA (-gRNA). Ovaj dio genoma također sadrži oktanukleotidnu sekvencu 5'-GGAAGAGC-3' s nepoznatom funkcijom koja se nalazi 70 do 80 nukleotida od 3' kraja genoma te neesencijalnu hipervarijabilnu regiju koja je prisutna kod cijele porodice *Coronaviridae*. Kao i drugi korona virusi, SARS-CoV-2 na 3' netranslirajućem dijelu ne sadrži poliadenilacijsku signalnu sekvencu AAUAAA važnu za proces poliadenilacije pomoću poliA polimeraze (Danckwardt i

sur.,2007.). Stoga, poliadenilaciju virusne RNA vjerojatno vrši virusna adeniltransferaza, nestrukturani protein 8 (nsp8).

Kodirajući dio genoma obuhvaća gene za 16 nestrukturanih, 4 strukturalna i 6 pomoćnih proteina. Organiziran je u barem dvanaest okvira za čitanje (eng. *open reading frame*, ORF). Krećući od 5' dijela genoma, ORF1a i ORF1b zajedno zauzimaju oko 70% virusnog genoma. Translacijom ova dva okvira za čitanje nastaju dva poliproteina 1a (pp1a) i 1ab (pp1ab). Njihovim cijepanjem nastaje svih 16 nestrukturanih proteina. ORFa i ORFb djelomično se preklapaju, pa je za ekspresiju ORFb potreban pomak okvira čitanja za -1, no mehanizam pomoću kojeg se ovaj pomak dešava još nije potpuno razjašnjen. Strukturni proteini S, E, M i N te pomoćni proteini 3a, 6, 7a, 7b, 8 i 9b kodirani su ostatkom genoma na 3' kraju. Genom je shematski prikazan na Slici 2.



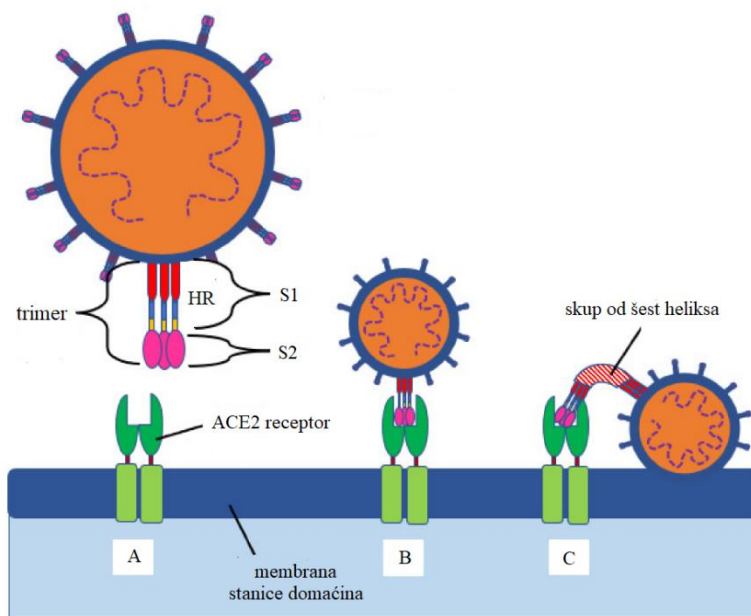
Slika 2. Struktura kodirajućeg dijela genoma SARS-CoV-2 prilikom čega ORF1a i ORF1b označuju okvir čitanja dijela DNA koji kodira za poliproteine 1a i 1ab, S okvir čitanja gena za glikoprotein šiljka, E proteina omotnice, M proteina membrane, N proteina nukleokapside, a 3a, 6, 7a, 7b, 8 i 9b su okviri čitanja pomoćnih proteina. (preuzeto i prilagođeno iz Brant i sur.,2021.)

2.3. ŽIVOTNI CIKLUS VIRUSA

2.3.1. Ulazak u stanicu i translacija genoma virusa

Infekcija virusom SARS-CoV-2 započinje vezanjem viriona na ciljanu stanicu interakcijom glikoproteina šiljka i receptora ACE2 stanice domaćina. Protein S je homotrimerni glikoprotein koji je podijeljen na dvije funkcionalne podjedinice, S1 i S2 (Slika 3.). Podjedinica S1 sadrži N terminalnu domenu (NTD) i C terminalnu domenu koja se veže na receptor (eng. *receptor binding domain*, RBD) koja je odgovorna za prepoznavanje ACE2 receptora domaćina. RBD je ujedno meta imunološkog sustava domaćina. Podjedinica S2 sastoji se od podjedinice fuzijskog proteina (FP), dviju heptapeptidnih domeni 1 i 2 (HR1 i HR2), transmembranske domene i C-terminalnog repa. Podjedinica S1 je dio koji se veže na stanicu domaćina, a podjedinica S2 omogućava fuziju s membranom domaćina. Odmah pri

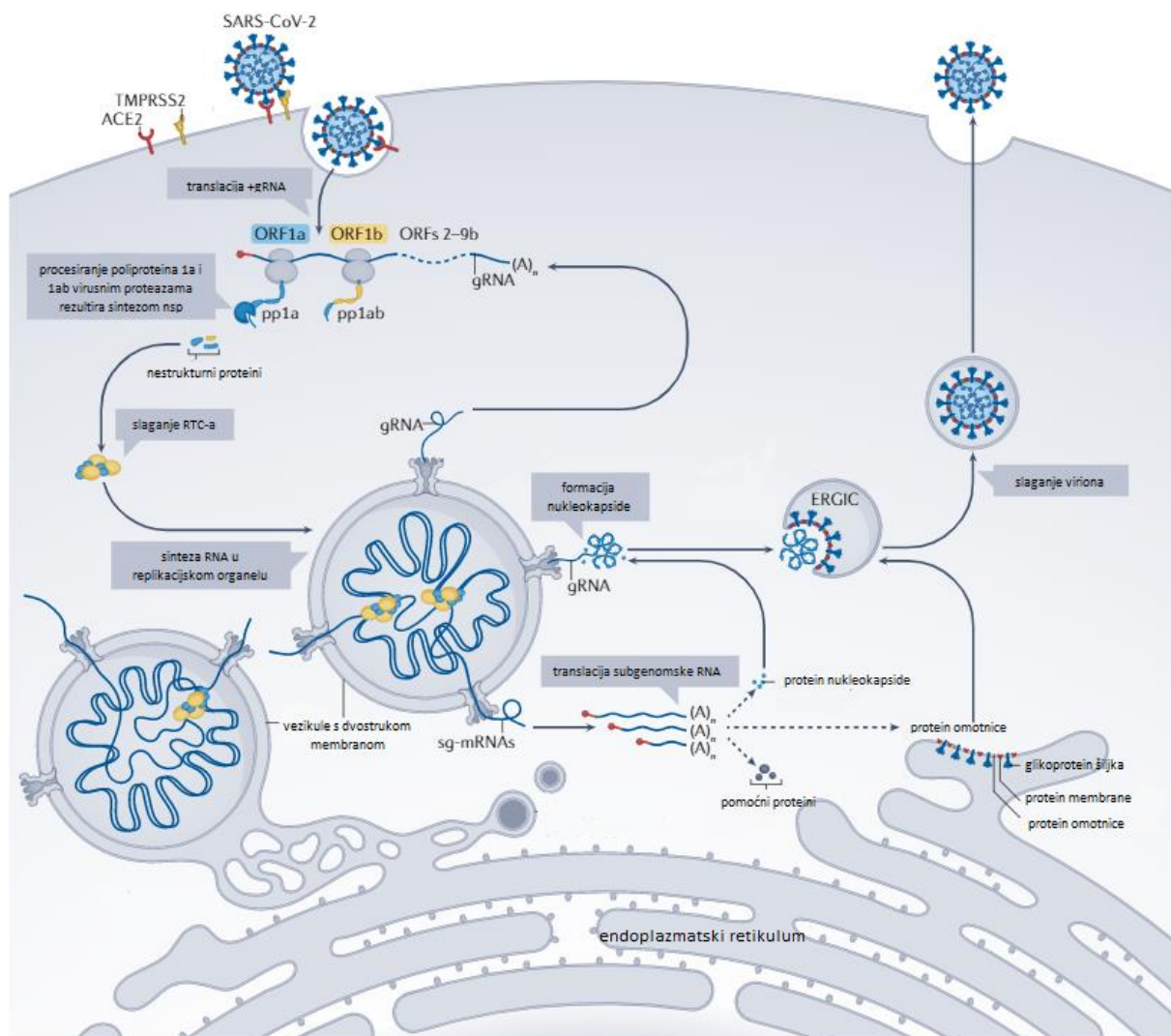
prianjanju virusa uz stanicu domaćina, dolazi do cijepanja glikoproteina šiljka na podjedinicu S1 i podjedinicu S2 pomoću proteaze furin i transmembranske serinske proteaze (TMPRSS2) domaćina koje specifično prepoznaju i cijepaju vezu među dvjema podjedinicama. Do cijepanja proteazom furin dolazi zahvaljujući kratkoj sekvenci PRRAR koja kodira za inserciju četiriju aminokiselina na mjestu polibaznog cijepanja između podjedinica, a koje prepoznaje upravo proteaza furin. Među humanim korona virusima prisutnost sekvence PRRAR je jedinstvena karakteristika SARS-CoV-2, a nedavnim istraživanjem slična sekvenca otkrivena je u korona virusu šišmiša RmYN02 kod kojeg također dolazi do insercije triju aminokiselina na mjestu polibaznog cijepanja proteina S. Upravo ova činjenica ukazuje na važnost proteina S u evoluciji korona virusa i razvoju zoonotičkih svojstava i prilagodbu novom domaćinu (V'kovski i sur.,2021.). Cijepanjem proteina S na dvije podjedinice dolazi do konformacijske promjene u podjedinici S2. Fuzijski protein se pričvršćuje za staničnu membranu nakon čega se HR1 i HR2 domene privlače jedna prema drugoj. Nakon dodira, heptapeptidne domene formiraju skup od šest heliksa koji približavaju membranu virusa i domaćina što uzrokuje spajanje lipidnih dvosloja (Slika 3.). Spajanje osigurava ulazak virusne nukleokapside u citoplazmu domaćina gdje se virusni genom razdvaja od proteina nukleokapside s kojima je bio vezan pomoću staničnih proteaza.



Slika 3. Shematska struktura trimera glikoproteina šiljka s heptapeptidnim domenama (HR) i podjedinicama S1 i S2 (A), te vezanje na ACE2 receptor stanice domaćina (B). Nakon vezanja HR domene formiraju skup od šest heliksa koji približavaju staničnu membranu i

ovojnicu virusa što dovodi do fuzije lipidnih dvosloja (preuzeto i preuređeno iz Shiehzađegan i sur., 2021.)

Oslobađanje genoma SARS-CoV-2 u staničnu citoplazmu domaćina označava početak složenog procesa ekspresije gena i stvaranja novih virusnih čestica. Virusna genomski kodirajuća (+) RNA molekula služi kao mRNA (eng. *messenger RNA*) koju stanica domaćina zamjenjuje za vlastitu i translata ORF1a i ORF1b (Slika 4.). Translacija ovih dvaju ORF-ova rezultira poliproteinom 1a i poliproteinom 1ab. Cijepanjem poliproteina 1a i 1ab pomoću dvaju samoaktivirajućih virusnih proteaza nastaje 16 nestrukturanih proteina; iz poliproteina 1a nastaju nestrukturani proteini 1 do 11, a iz poliproteina 1ab nestrukturani proteini 1 do 10 i 12 do 16. Nestrukturani protein 1 (nsp1) zauzima ribosomalni kanal za vezanje mRNA kako bi inhibirao translaciju proteina domaćina, nsp2 se veže na prohibitin 1 i 2 domaćina, nsp3 je proteaza nalik na papain koja služi za procesiranje virusnih poliproteina, nsp4 i nsp6 omogućuju tvorbu vezikula s dvostrukom membranom (eng. *double membrane vesicles*, DMV) u kojima se odvija sinteza RNA, nsp5 je proteaza nalik na 3C koja također služi za procesiranje virusnih poliproteina, nsp7 i nsp8 su pomoćni faktori RNA ovisne RNA polimeraze (eng. *RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp), nsp8 također funkcionira kao primaza i RNA 3' terminalna adenililtransferaza, nsp9 je RNA vezujući protein, nsp10 je kofaktor nsp14 i nsp16, uloga nsp11 je nepoznata, nsp12 je RNA ovisna RNA polimeraza i nukleotidiltransferaza, nsp13 je helikaza, nsp14 je 3'-5' egzonukleaza s lektorirajućom („*proofreading*“) aktivnošću i ujedno metiltransferaza za formaciju RNA kape, nsp15 je uridin-specifična endoribonukleaza, a nsp 16 je ribozna 2'-O-metiltransferaza koja također služi za formaciju RNA kape (Brant i sur.,2021.) Nestrukturani proteini od 2 do 16 tvore virusni replikacijsko-transkripcijski kompleks (RTC). Za nestrukturane proteine od 2 do 11 smatra se da sudjeluju u procesu regulacije intracelularnih membrana, sprječavanju imunološke reakcije domaćina i omogućavanju kofaktora replikacije. Nestrukturani proteini 12, 13, 14 i 15 sadrže osnovne enzimske funkcije uključene u sintezu RNA, njenu modifikaciju i lektoriranje (V'kovski i sur., 2021.)

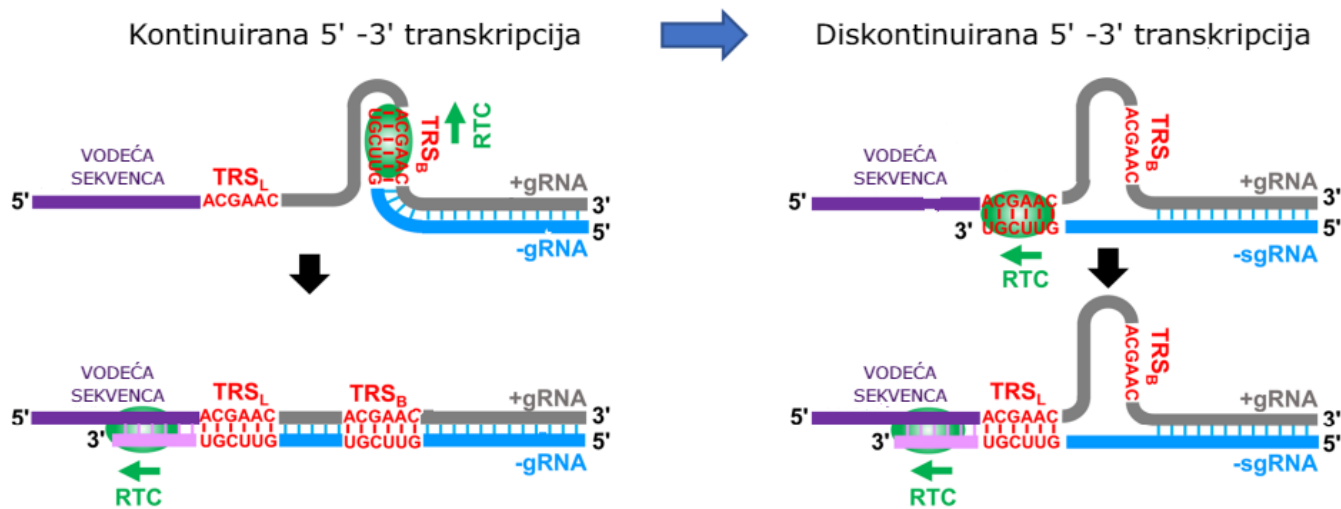


Slika 4. Životni ciklus virusa SARS-CoV-2. Infekcija stanice započinje prepoznavanjem i vezanjem receptor-vezujuće domene proteina S na angiotensin konvertirajući enzim 2 (ACE2) što uzrokuje spajanje lipidnih dvosloja i ulazak virusnog genoma u stanicu domaćina. Oslobađanje genomske RNA dovodi do translacije ORF-ova 1a i ab rezultirajući sintezom nestrukturanih proteina, uključujući i nestrukturane proteine koji tvore replikazu RdRp, odnosno replikacijsko-transkripcijski kompleks (RTC). RTC vrši sintezu -gRNA pomoću kalupa +gRNA kako bi se pripremio genetski materijal za nove virusne čestice, no prilikom sinteze dolazi i do diskontinuirane transkripcije koja rezultira subgenomskim RNA molekulama. Njihovom translacijom nastaju strukturalni proteini S, M, E i N koji se prenose u endoplazmatski retikulum kako bi došlo do njihovog smatanja. Od tamo prelaze u ERGIC gdje dolazi do enkapsulacije +gRNA N proteinom te sinteze omotnice interakcijom proteina M i E. Novoformirani virus izlazi iz stanice egzocitozom (preuzeto i preuređeno iz Malone i sur.,2022.)

2.3.2. RNA sinteza i diskontinuirana transkripcija

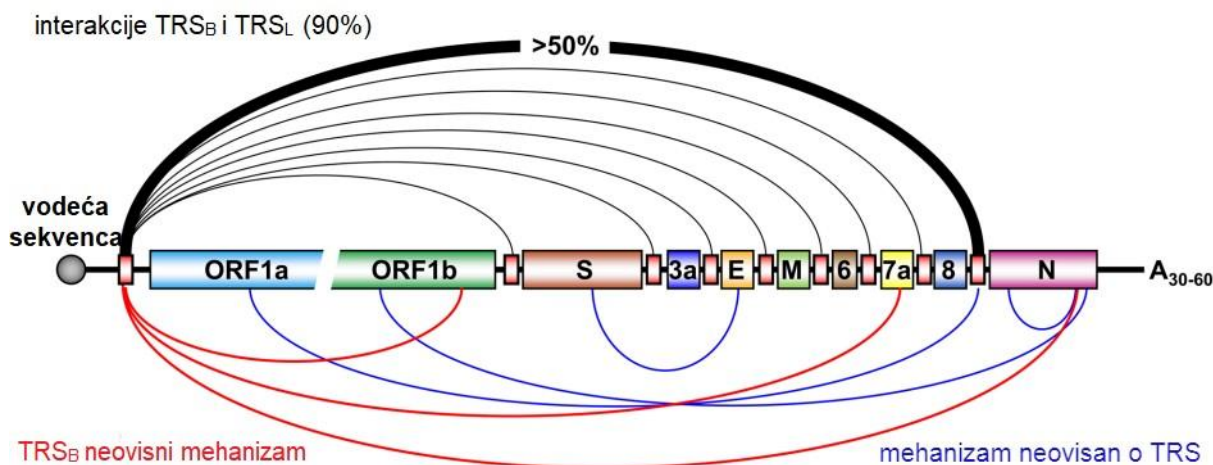
Nastankom replikaze RdRp i formacijom replikacijsko-transkripcijskog kompleksa RTC, sinteza RNA i strukturnih proteina potrebnih za stvaranje novih čestica virusa može započeti. Virusna genomska jednolančana RNA (+gRNA) služi kao mRNA za translaciju nestrukturnih proteina, ali i kao kalup za sintezu nekodirajućeg (-) lanca (-gRNA). Nekodirajući (-) lanac tada služi kao intermedijer (posrednik) jer predstavlja kalup za sintezu novog kodirajućeg (+) RNA lanca. Novonastala +gRNA može se koristiti za stvaranje dodatnih nestrukturnih proteina i replikacijsko-transkripcijskih kompleksa ili se pakira u nove virusne čestice. Sinteza -gRNA odvija se pomoću replikacijsko-transkripcijskog kompleksa (RTC) u vezikulama s dvostrukom membranom kako bi se fizički odvojile RNA molekule od imunoloških senzora u citoplazmi domaćina te spriječio imunološki odgovor (Slika 4.).

Prilikom sinteze -gRNA pomoću kalupa +gRNA, dolazi do prekida kontinuirane 5'-3' transkripcije i početka diskontinuirane transkripcije koja je obilježje korona virusa i većine članova reda *Nidovirales*. Smatra se kako se diskontinuirana transkripcija odvija prema mehanizmu zamjene kalupa (eng. *template switch*). Replikacijsko-transkripcijski kompleks zaustavlja kontinuiranu transkripciju prilikom susreta sa sekvencom koja djeluje kao regulator transkripcije (eng. *transcription regulatory sequence*, TRS). Ova sekvenca nalazi se na virusnom genomskom „tijelu“ (eng. *body*), pa se označava sa indeksom B, TRS_B, a pojavljuje se uzvodno od svakog individualnog gena za strukturni ili pomoćni protein na 3' kraju genoma. Sinteza RNA ponovno započinje od regije TRS susjedne sekvenci koja djeluje kao regulator transkripcije na vodećoj sekvenci (eng. *leader*), TRS_L. TRS_L je kodirana sekvencom ACGAAC i nalazi se oko 70 nukleotida od 5' kraja genoma. Na taj način, mehanizmom zamjene kalupa, dolazi do privremenog odvajanja RTC-a od 3' kraja +gRNA kalupa do ponovnog prihvaćanja na 5' kraju rezultirajući preskokom velikog dijela genoma što je shematski prikazano na Slici 5. Dodatkom negativne kopije vodeće sekvence na sintetiziranu -sgRNA završena je njena sinteza. Nekodirajući lanci subgenomske RNA (-sgRNA) služe kao kalupi za sintezu pozitivnih lanaca (+sgRNA) čijom translacijom nastaju strukturni i pomoćni proteini virusa. Posljedično, sve +sgRNA molekule različitih veličina imaju istu 5' vodeću sekvencu i isti 3' dio genoma. Iako su subgenomske mRNA korona virusa strukturalno policistronske, pretpostavlja se da su funkcionalno monocistronske na način da se samo prvi ORF na 5' kraju, koji je odsutan u slijedećoj manjoj sgRNA, translatira iz svake sgRNA (V'kovski i sur., 2021.).



Slika 5. Mehanizam zamjene kalupa (eng. *template switch*) diskontinuirane transkripcije +gRNA SARS-CoV-2. Detaljno objašnjenje se nalazi u tekstu. (preuzeto i uređeno iz Brant i sur., 2021.)

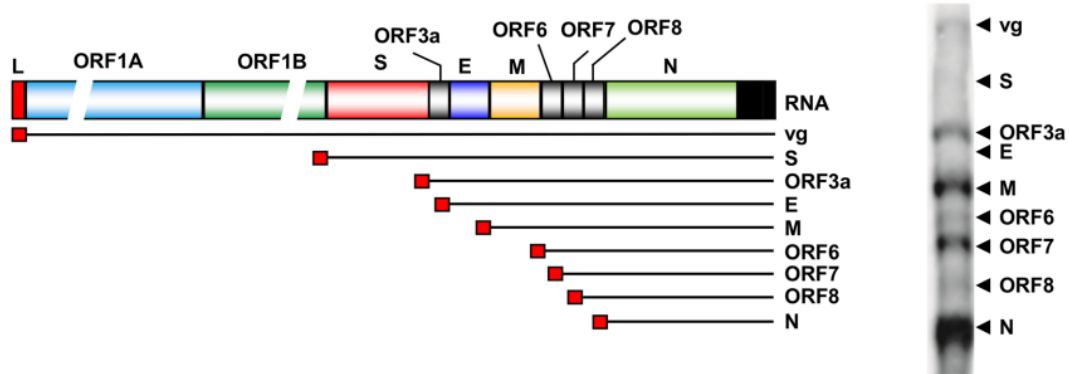
Smatra se kako su -gRNA i -sgRNA manje zastupljene u inficiranim stanicama te kako vjerojatno ne kodiraju za virusne proteine. Iako je većina sgRNA molekula dobivena mehanizmom zamjene kalupa ovisnim o vodećoj sekvenci između TRS_L i TRS_B, manji udio (10 %), sgRNA dobiveno je TRS_B-neovisnim mehanizmom ili čak mehanizmom bez sekvence koja djeluje kao regulator transkripcije (Slika 6.). Ta činjenica ukazuje na iregularne RNA-RNA interakcije koje se mogu dogoditi tijekom mehanizma zamjene kalupa, a potaknute su određenim RNA strukturama ili vezanju virusnih i staničnih faktora (Brant i sur., 2021.)



Slika 6. Dijagram SARS-CoV-2 genoma s okvirima čitanja (obojene kućice) i transkripcijsko regulatornim sekvencama (manje crvene kućice) koje se nalaze uzvodno od svakog okvira

čitanja. Crnom bojom prikazane su interakcije TRS_B i TRS_L koje sudjeluju u sintezi sgRNA u 90% slučajeva, pri čemu je najčešće sintetizirana sgRNA koja kodira za N protein. Crvenom bojom prikazane su interakcije TRS_L pri TRS_B-neovisnim mehanizmom, a plavom bojom spajanje pri mehanizmu neovisnom o TRS (preuzeto i preuređeno iz Brant i sur., 2021.)

Također je uočeno kako se virusne gRNA molekule pune dužine, nastale kontinuiranom transkripcijom, u virusnoj čestici nalaze u znatno manjim količinama naprema subgenomskim RNA molekulama (Brant i sur., 2021.). Razlog tome je što je za formaciju viriona potrebna samo jedna +gRNA molekula, ali ne i sgRNA, kako bi se infekcija novih stanica i razmnožavanje virusa ostvarilo. Brant i sur. (2021.) predložili su mogući uzrok te pojave: RNA transkripcija inicirana replikacijsko-transkripcijskim kompleksom započinje na 3' kraju virusne gRNA i prva TRS na koju nailazi je TRS_B uzvodno od gena za N protein (Slika 6.). RTC se zaustavlja nakon reakcije TRS_B i TRS_L i zahvaća 5' vodeću sekvencu kako bi se dovršila sinteza sgRNA koja kodira za N protein. Ukoliko sinteza RNA prođe kontinuirano kroz prvu TRS_B na koju je RTC naišao, ona se nastavlja do slijedeće TRS_B. Kako bi došlo do transkripcije cijele virusne gRNA, RTC bi trebao preskočiti sve TRS_B koji se nalaze uzvodno od svakog ORF-a. Iz tog razloga, subgenomske RNA koja kodira za N protein ima najviše u inficiranim stanicama, sgRNA koja kodira za protein S malo, a gRNA pune dužine najmanje (Slika 7.).

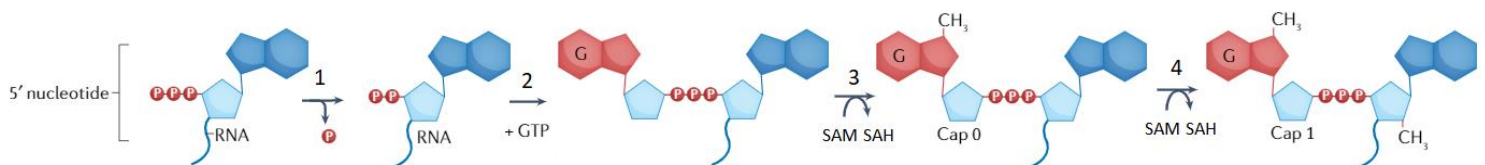


Slika 7. Na dijagramu je prikazan genom SARS-CoV-2 i individualne sgRNA (crne linije) pri čemu crveni kvadrati predstavljaju 5' vodeću sekvencu dobivenu pomoću mehanizma zamjene kalupa. Vg predstavlja virusnu genomsku RNA dobivenu kontinuiranom transkripcijom cijelog genoma. Na desnoj strani prikazan je Northern blot svih RNA ekstrahiranih iz stanica bubrega Afričkog majmuna inficiranih SARS-CoV-2. Iz Northern blot

analize vidljivo je kako sgRNA koja kodira za N protein ima najviše, a vg (virusne genomske RNA) najmanje. (preuzeto iz Brant i sur., 2021.)

2.3.3. Preinake virusne RNA

Za efikasnu translaciju na ribosomima eukariotske stanice kao što je stanica čovjeka, pre-mRNA odnosno primarni transkript podliježe vezanju 7-metilgvanilata na 5' kraj i poliA sekvencije na 3' kraj u jezgri stanice. Zbog sinteze RNA u citosolu stanice eukariotskog domaćina, SARS-CoV-2 koristi vlastite proteine za modifikaciju RNA (Slika 4.). U dodavanju 5'-kape sudjeluju nestrukturni proteini 10, 12, 13, 14 i 16. Prvi korak je hidroliza γ -fosfata s 5'-trifosfata prilikom čega nastaje 5'pp-RNA, a odvija se pomoću RNA trifosfatazne aktivnosti helikaze nsp13 (Slika 8.). Slijedeći korak je kovalentno vezanje gvanozin monofosfata na izloženi 5' β -fosfat RNA za što je odgovorna gvanilil transferazna aktivnost NiRAN domene (eng. *nidovirus RdRp-Associated Nucleotidyltransferase*) RNA ovisne RNA polimeraze, točnije nestrukturnog proteina 12. Bifunkcionalni nestrukturni protein 14 nakon toga vrši metilaciju dušika N7 vezanog gvanina N⁷-metiltransferaznom aktivnošću. Rezultat reakcije je struktura nazvana „kapa 0“ (eng. *cap 0*) ili m⁷GpppN-RNA. Posljednji korak u uspostavljanju 5' kape je metilacija 2'-O skupine riboze prvog nukleotida RNA molekule. Produkt ove reakcije je „kapa 1“ ili m⁷GpppN^m, a provodi ju druga metiltransferaza, nestrukturni protein 16. Obje metiltransferaze koriste S-adenozilmetionin (SAM) kao donor metilne skupine te kao nusprodukt nastaje S-adenozilhomocistein (SAH). Također, za aktivnost obiju metiltransferaza, nsp14 i nsp16, neophodna je stimulatívna podjedinica nsp10.



Nukleotidiltransferazna aktivnost nestrukturnog proteina 12 i metiltransferazna aktivnost nestrukturnog proteina 14 ključne su za virusnu replikaciju stoga predstavljaju mete za antivirusne lijekove (Malone i sur., 2021.)

Slika 8. Vezanje 7-metilgvanilata na 5' kraj genoma SARS-CoV-2. 1 označava RNA trifosfataznu aktivnost nsp13, 2 gvanilil transferaznu aktivnost NiRAN domene, 3 N⁷-metiltransferaznu aktivnost nsp14 i 4 2'-O metiltransferaznu aktivnost nsp16. (preuzeto i uređeno iz Malone i sur., 2021.)

Za sada nije poznat mehanizam poliadenilacije RNA virusa SARS-CoV-2. Novosintetizirana +gRNA ima 30 do 60 parova baza dugačak poliA rep na 3' kraju genoma. Kao što je već

spomenuto u poglavlju 2.2., budući da humani korona virusi ne posjeduju konvencionalnu poli-A signalnu sekvencu AAUAAA koja služi u procesu poliadenilacije pomoću poliA polimeraze te se transkripcija vrši u citoplazmi domaćina, smatra se kako poliadenilaciju provodi nestrukturani protein 8 adenililtransferaznom aktivnošću (Brant i sur., 2021.)

2.3.4. Slaganje viriona i izlazak novonastalih virusa iz stanice

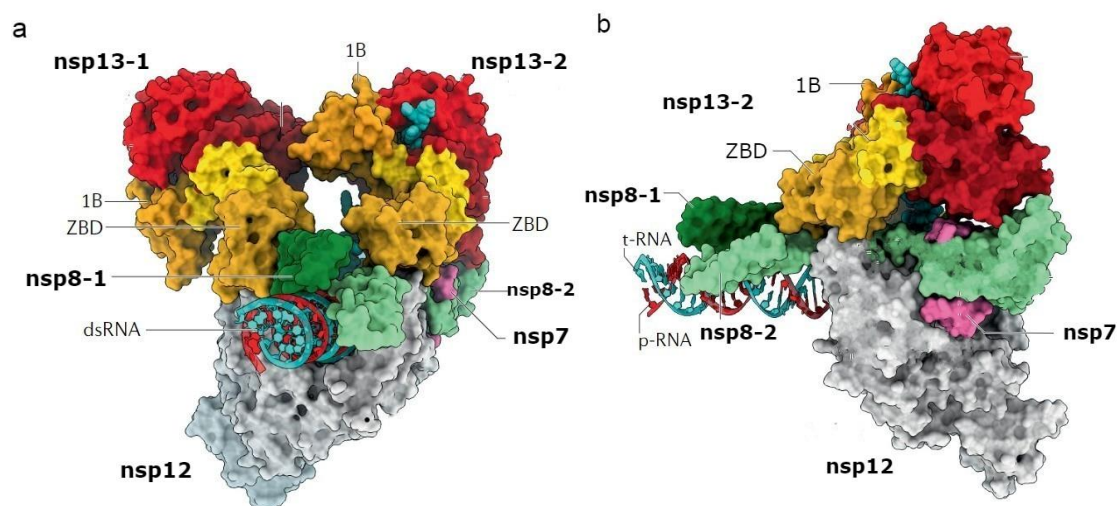
Slijedeći sintezu +gRNA i +sgRNA lanaca, započinje translacija strukturalnih proteina glikoproteina šiljka, proteina omotnice, proteina membrane i proteina nukleokapside te pomoćnih proteina kodirani ORF-ovima 3a, 6, 7a, 7b, 8 i 9b. Nakon translacije strukturalni proteini se unose u endoplazmatski retikulum domaćina (Slika 4.). Endoplazmatski retikulum je sustav plosnatih odjeljaka u citoplazmi biljnih i životinjskih stanica važnih za unutarstanični prijenos tvari topljivih u vodi, a na njegovoj razvedenoj površini odvijaju se procesi izmjene i sinteze (Hrvatska enciklopedija, 2021.). Na površini endoplazmatskog retikuluma odvija se smatanje strukturalnih proteina. Proteini se nakon toga prenose u odjeljak koji se nalazi između endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata (eng. *ER-to-Golgi intermediate compartment*, ERGIC) gdje dolazi do enkapsulacije +gRNA proteinom N. Kako bi se virion konačno formirao, potrebna je sinteza ovojnice koja se također odvija u ERGIC-u. Za sintezu ovojnice potrebna je interakcija između proteina M i proteina E. Protein M ima središnju ulogu u organizaciji slaganja viriona jer usmjerava formaciju ovojnice i osigurava matriks na koji se veže nukleokapsida prije pupanja (Bai, Zhong i Gao, 2021.). Osim interakcije između proteina M i E, uočeno je da su za pravilnu sintezu ovojnice potrebni nestrukturalni proteini nsp3 i nsp4. Oni zakrivljuju novonastale membrane i na taj način omogućuju nastajanje pupova virusa koji će se odvojiti od membrane. Formirana virusna čestica izlazi iz stanice domaćina egzocitozom, pomoću sekretiranih puteva prisutnih u glatkom zidu vezikule koji pomažu u transportu novonastale čestice spajajući je s membranom domaćina (Kaur i sur., 2020.).

2.4. REPLIKACIJSKO-TRANSKRIPCijski KOMPLEKS

Genom virusa SARS-CoV-2 duži je od mnogih virusa i upravo je replikacijsko-transkripcijski kompleks (RTC) odgovoran za prevladavanje teškoća uzrokovanih veličinom genoma. RTC specifično raspoznaje i polimerizira virusnu RNA pritom izbjegavajući imunološku reakciju stanice domaćina. RTC provodi kontinuiranu i diskontinuiranu transkripciju, pri čemu uklađuje odnos između subgenomske RNA i genomske RNA (Wilamowski i sur., 2021.).

Sami kompleks nastaje interakcijama nestrukturnog proteina 12, jedne kopije nestrukturnog proteina 7, dviju kopija nestrukturnog proteina 8 i dviju helikaza; nestrukturnih proteina 13-1 i 13-2 (Slika 9.). Nsp12, odnosno njena srž RdRp domena, je katalitički centar ovog makromolekularnog kompleksa. Na nsp12 domenu vezane su dvije nsp8 jedinice, no zbog asimetrije nsp12, nsp7 je potreban kako bi posredovao interakcijama između nsp8 i nsp12 na jednoj strani. Nsp8 sadrži vrlo dugačak α -heliks koji se izdužuje iz njegove globularne domene i u interakciji je s nsp12 i nsp7. Ova tri nestrukturalna proteina čine centralnu strukturu RTC-a koja je odgovorna za sintezu RNA, a prilikom toga nsp13 je u inaktivnom stanju. Kako bi započela sinteza RNA, nsp13-1 se veže na nsp8-1 i nsp12 svojom domenom za koju se veže cink (eng. *zink-binding domain*, ZBD) i domenom 1B te stabilizira strukturu RTC-a. Ova struktura je potrebna kako bi došlo do vezanja nsp13-2 koja posjeduje helikaznu aktivnost za odmatanje dvostrukog lanca RNA. Nsp 13-2 se veže na nsp8-2 i nsp12 ZBD domenom te stvara dodatni kontakt s nsp8-2 putem 1B domene. Dvije nsp13 molekule se međusobno povezuju svojim 1B domenama (Yan i sur.,2020.) što omogućuje strukturalnu promjenu u nsp13-2 1B domeni i time postizanje potpuno otvorene konformacije kanala u koji se veže RNA.

Odmotana, jednolančana RNA, prolazi kroz kanal u koji se veže RNA nsp13-2 i dolazi do aktivnog mjesta nsp12 nakon čega slijedi sinteza komplementarnog lanca. Sinteza RNA započinje prepoznavanjem supstratnog nukleotida nespecifičnim ionskim vezama između nukleotida i pozitivno nabijenih lizinskih i argininskih ostataka u RdRp domeni. Nukleotid zatim ulazi u aktivno mjesto te ostvaruje Watson-Crick sparivanje baza s RNA kalupom. Za ispravnu orijentaciju nukleotida odgovorna su dva Mg^{2+} iona. Nakon toga slijedi nukleofilni napad 3'-OH skupine RNA na alfa atom fosfora nadolazećeg ribonukleozid-trifosfata i formiranje fosfodieterske veze (Malone i sur.,2022.)



Slika 9. Struktura replikacijsko-transkripcijskog kompleksa (RTC) dobivena kriogenom elektronskom mikroskopijom. Struktura pod (b) predstavlja strukturu (a) zakrenutu za 90 ° u smjeru kazaljke na satu pri čemu je dsRNA dvolančana DNA, t-RNA kalup RNA, a p-RNA predstavlja produktnu RNA. (preuzeto i uređeno iz Malone i sur., 2022.)

2.5. MUTACIJE U GENOMU VIRUSA SARS-CoV-2

Mutacijom se često naziva svaka promjena genetičkog materijala bilo na razini jednog ili više nukleotida, cijelog kromosoma ili cjelokupnog genoma bez obzira na mehanizam nastanka genetičke promjene. Mutacija u genomu korona virusa najčešće nastaje kao posljedica umnažanja virusa u ljudskoj stanici tijekom transkripcije gRNA molekula pomoću replikacijsko-transkripcijskog kompleksa. Učestalost nastanka mutacija ovisi o raznim faktorima kao što su preciznost polimeraze, imunološki odgovor domaćina, stanična okolina i replikacijski mehanizam. Mutacije su jedan od glavnih mehanizama virusne evolucije i pojave varijabilnosti koja omogućava prilagodbu imunološkom sustavu domaćina i antivirusnim lijekovima. SARS-CoV-2 ima učestalost mutacije od $1\text{-}5\cdot 10^{-6}$ po nukleotidu po infekcijskom ciklusu (Amicone i sur., 2022.) što je manje u odnosu na ostale jednolančane RNA viruse kao što je HIV čija učestalost mutacije iznosi 10^{-4} do 10^{-5} mutacija po paru baza po ciklusu (Rawson i sur., 2015.). Razlog tome je lektorirajuća 3'-5' egzonukleazna aktivnost nestrukturnog proteina 14 koji ispravlja pogreške RNA ovisne RNA polimeraze pri transkripciji RNA. Također, faktor koji smanjuje učestalost mutacija je i kratkotrajan vrhunac infekcije SARS-CoV-2 do kojeg dolazi rano pri infekciji što rezultira smanjenjem vremena za *in vivo* virusnu evoluciju u domaćinu prije prijenosa (Fischer i sur., 2021.). Do sada je

otkriven velik broj mutacija genoma i sojeva SARS-CoV-2 pri čemu je većina sojeva po svojim infektivnim svojstvima skoro pa identična izvornom soju otkrivenom u Wuhanu 2019. godine. Takvi sojevi se prenose na isti način, istom brzinom i uzrokuju jednaku težinu bolesti. No, Svjetska zdravstvena organizacija prepoznala je određene sojeve kao sojeve koji izazivaju zabrinutost (eng. *variant of concern*, VOC). Takvi sojevi prenose se lakše, uzrokuju razvoj težih oblika bolesti, otporni su na imunološke reakcije domaćina i/ili smanjuju učinkovitost alata za borbu protiv širenja bolesti kao što su cjepiva i zdravstvene mjere (WHO, 2021.). U trenutku pisanja ovoga rada, 5 sojeva se klasificira kao VOC: B.1.1.7. (alfa), B.1.351. (beta), P.1 (gama), B.1.617.2 (delta) i B.1.1.529 (omikron) nazvani po Pango nomenklaturi (Rambaut i sur., 2020.).

Mutacije proteina S jedan su od glavnih uzroka povećane otpornosti novih sojeva i lakše prenosivosti SARS-CoV-2 virusa. To je posljedica njegove značajne uloge pri prepoznavanju receptora domaćina, ulasku virusnog genoma u stanicu i oslobađanju novih virusnih čestica. Jedna od prvih mutacija proteina S koja je potpuno istisnula divlji tip virusa je mutacija D614G. Prvi put je uočena sredinom 2020. godine, a danas se može pronaći u svim cirkulirajućim sojevima SARS-CoV-2, pa tako i u svim sojevima koji izazivaju zabrinutost, te se smatra da znatno doprinosi infektivnosti virusa (Magazine i sur., 2022.). Mutacija D614G uzrokuje zamjenu aminokiseline aspartata aminokiselinom glicinom u RBD domeni podjedinice S1 glikoproteina šiljka. RBD domena soja s mutacijom D614G uglavnom se nalazi u otvorenoj konformaciji čime je pospješena njena interakcija s ACE2 receptorom, a samim time i infektivnost virusa. RBD sekvenca smatra se najvarijabilnijom sekvencom sklonom mutacijama što predstavlja izazov s obzirom da je upravo ona meta imunološkog sustava čovjeka. Na temelju antigena RBD B stanice proizvode antitijela, no što se antigen RBD više mijenja mutacijama to ga je antitijelima teže prepoznati.

2.5.1. Soj B.1.1.7. (alfa)

Alfa soj predstavlja prvi VOC, a identificiran je u Ujedinjenom Kraljevstvu tijekom rujna 2020. godine. Ovaj soj povezuje se s 70 % do 80 % povećanjem prenosivosti virusa (Liu i sur., 2021.) te povećanim rizikom od smrtnih ishoda kod hospitaliziranih pacijenata uspoređujući s tadašnjim sojevima. Iako se čini da se ovaj soj uspješno neutralizira pomoću antitijela dobivenih cjepivom, njegova povećana prenosivost mogla bi negativno djelovati na grupnu imunost. B.1.1.7 karakterizira 19 nesinonimnih mutacija što uključuje 8 supstitucija ili delecija u sekvenci koja kodira za protein S. Glavni faktor odgovoran za povećanu prenosivost je mutacija N501Y. To je mutacija domene koja se veže na receptor proteina S na

položaju 501 gdje je aminokiselina asparagin zamijenjena aminokiselinom tirozinom, a rezultira povećanjem interakcija te time i afinitetom između RBD i ACE2 receptora (Liu i sur.,2021.). Mutacija koja također karakterizira ovaj tzv. britanski soj, no ne korelira s težinom kliničke slike i ne utječe na efikasnost cjepiva, je Δ69/70 odnosno delecija na položaju 69/70 u proteinu S. Ova mutacija potiče izbjegavanje imunološkog odgovora. Treća biološki važna mutacija ovog soja je P681H. Ova mutacija uzrokuje supstituciju aminokiseline prolin aminokiselinom histidinom na poziciji 681 što uzrokuje konformacijsku promjenu u blizini polibaznog mjesta cijepanja furinom. Pokazano je kako ova mutacija rezultira povećanim cijepanjem furinom što rezultira povećanjem virusnog opterećenja (eng. *viral load*), a time i infektivnosti.

2.5.2. Soj B.1.351 (beta)

Beta soj ili B.1.351 po Pango nomenklaturi (Rambaut i sur., 2020.), prvi put je identificiran u Južnoafričkoj Republici u listopadu 2020. godine gdje je u provincijama Istočni i Zapadni rt nedugo zatim postao dominantan soj (Ćupić,2021.). Iako se ovaj soj pojavio nezavisno od alfa soja, posjeduje mutaciju N501Y. Mutacija koja je prvi put pronađena u genomu beta soja je E484K, a kasnije i u alfa i gama soju, je mutacija koja se također događa u sekvenci za domenu koja se veže na receptor proteina S. To je mutacija supstitucije aminokiseline glutamata aminokiselinom lizinom. Ova mutacija rezultira smanjenjem efikasnosti poliklonskih i monoklonskih antitijela koja se koriste pri liječenju zarazom SARS-CoV-2, ali i smanjenjem efikasnosti neutralizacije pomoću stečenih antitijela (Yang i sur.,2021.). Ovaj soj karakteriziraju i mutacije L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, D614G, i A701V, od kojih još K417N zahvaća sekvencu RBD.

2.5.3. Soj P.1 (gama)

Gama ili P.1 soj prvi put je otkriven u sjevernom Brazilu u siječnju 2021. godine te se do ožujka iste godine proširio u 45 država. Ovaj soj sadrži 17 promjena aminokiselina, 3 delecije, 4 sinonimne mutacije i jednu inserciju od 4 nukleotida. Sekvenca proteina S zahvaća 10 mutacija te, kao i beta soj, 3 mutacije domene koja se veže na receptor; N501Y, K417N i E484K. Uz povećanu prenosivost i smanjenje efikasnosti neutralizacije antitijela, beta i gama soj povezuju se i sa pojavom reinfekcije (Ćupić, 2021.)

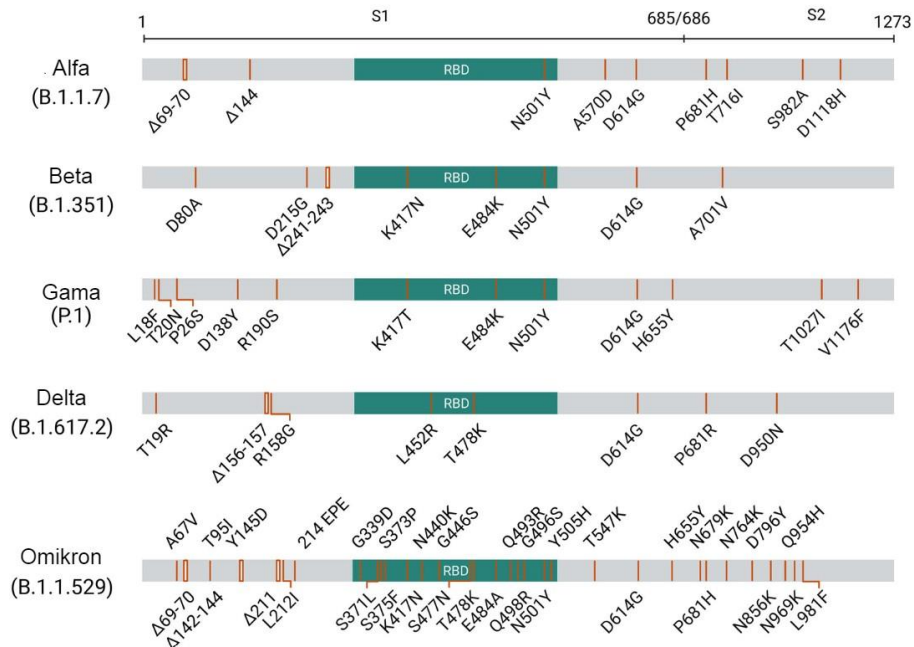
2.5.4. Soj B.1.167.2 (delta)

Delta soj ili B.1.167.2 identificiran je u Indiji u prosincu 2020. godine gdje je 4 mjeseca kasnije uzrokovao drugi val epidemije COVID-19 bolesti nakon čega je proglašen sojem koji izaziva zabrinutost. Ovaj soj ima 20 karakterističnih mutacije uspoređujući genom s

genomom alfa soja, od kojih se 8 nalazi u sekvenci za protein S. Najznačajnije mutacije proteina S ovog soja su L452R i već spomenuta mutacija P681R. Mutacija L452R je mutacija koja uzrokuje supstituciju aminokiseline arginin aminokiselinom leucin na poziciji 452 RBD sekvence. Ova mutacija rezultira povećanjem afiniteta RBD za ACE2 receptor i omogućava delta soju da izbjegne imunološku reakciju T stanica (Shiehzedegan i sur., 2021.). Osim mutacija proteina S, u delta soju identificirane su mutacije proteina membrane, nukleokapside, RNA ovisne RNA polimeraze te mutacije u OFR-ovima 3a, 7a, 7b i 8. Mutacija RNA ovisne RNA polimeraze pod nazivom P323L prvi put je otkrivena u Ujedinjenom Kraljevstvu u veljači 2020. godine. To je „missense“ mutacija zamjene aminokiseline prolina u leucin i, iako su oba aminokiselinska ostatka nepolarna i alifatska, prema tome P323L ne bi trebao značajno utjecati na funkcionalnost nestrukturnog proteina 12, sve češća pojava ove mutacije upućuje na mogućnost povećanja prenosivosti SARS-CoV-2 (Wang i sur., 2021.).

2.5.5. Soj B.1.1.529 (omikron)

Najnoviji soj koji izaziva zabrinutost je omikron ili B.1.1.529 soj. Prvi put je identificiran u studenom 2021. godine u Bocvani. Nakon samo dva dana od prijave ovog soja Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, proglašen je sojem koji izaziva zabrinutost. Razlog tako brze reakcije WHO-a je njegova povećana zaraznost naprema dosadašnjim sojevima. Naime, beta soj izazvao je povećanje broja zaraženih u 100 dana za otprilike 50 %, delta za 80 %, no prisutnost omikrona je u samo 25 dana povećala broj zaraženih za 90 % (Magazine i sur.,2022.). U ovome soju otkriveno je ukupno preko 60 mutacija supstitucije, delecije i insercije čineći ga sojem s najvećim brojem mutacija do sada što je shematski prikazano na Slici 10.



Slika 10. Shematski dijagram mutacija proteina S u svim sojevima koji zabrinjavaju (VOC). (preuzeto i uređeno iz He i sur., 2021.)

Omikron sadrži mutacije u ORF1a, ORF1b, ORF9b, strukturnim proteinima omotnice, membrane i nukleokapside, no više od pola mutacija sadrži u proteinu S. Kao i sve sojeve do sad, karakteriziraju ga mutacije D614G i N510Y koje izazivaju povećan afinitet RBD za ACE2 receptorom. Uz ove mutacije, sadrži i mutaciju P681H koja stimulira proces polibaznog cijepanja proteina S staničnom proteazom furin. Ovaj soj također je akumulirao 15 mutacija u domeni koja se veže na receptor. To čini omikron opasnijim od dosadašnjih sojeva jer 40 % neutralizirajućih antitijela protiv SARS-CoV-2 ciljaju RBD domenu. Također, omikron, ali i ostale sojeve koji izazivaju zabrinutost, karakteriziraju mutacije u N terminalnoj domeni podjedinice S1. Na N terminalnu domenu veže se 35 % antitijela, no pokazano je kako postoji određeno „supermjesto“ na koje se vežu sva antitijela i upravo 14 od 18 mutacija N terminalne domene događaju se u neposrednoj blizini antigenskog „supermjesta“ (Magazine i sur., 2022.). Biološke karakteristike soja omikron, kao što su povećana prenosivost i patogenost, smanjena mogućnost neutralizacije antitijelima, uspješno izbjegavanje reakcije imunološkog sustava domaćina te pojava reinfekcije i u cijepljenih pacijenata, su razlog zašto ovaj soj prevladava nad svim ostalima još i u trenutku pisanja ovog rada, u lipnju 2022. godine (Ritchie i sur.,2020.).

3. ZAKLJUČAK

Od svoje pojave u prosincu 2019. godine, SARS-CoV-2 zarazio je 543 642 665 ljudi diljem svijeta i pritom odnio 6 329 161 života. U Republici Hrvatskoj ta brojka iznosi 16 050 (JHU, 2022.) Ovi iznosi rezultat su evolucije virusa i njegove izrazite prilagodbe našim pokušajima zaustavljanja pandemije. Od svih ostalih proteina koji čine virusnu česticu SARS-CoV-2, proteina membrane, omotnice i nukleokapside, glikoprotein šiljka je najvarijabilniji, a time i njegov glavni adut. Protein S, razlog naziva cijele porodice *Coronaviridae* kojoj SARS-CoV-2 pripada, odgovoran je za kontakt virusa sa stanicom domaćinom, ulazak virusnog genoma u stanicu te izlazak novosintetiziranih virusnih čestica iz stanice domaćina. Unatoč mRNA cjepivima čija primjena je obilježila 2021. godinu, pojavile su se mutacije, prvenstveno proteina S, koje su smanjile djelotvornost cjepiva, ali i povećale prenosivost virusa. Uspješno održavanje virusa SARS-CoV-2 također se može pripisati replikacijsko-transkripcijskom kompleksu koji vrši svu sintezu RNA ovog virusa. RTC je najbitniji faktor pri prevladavanju nadprosječne veličine genoma SARS-CoV-2. Također vrši kontinuiranu i diskontinuiranu transkripciju, pri čemu usklađuje odnos između subgenomske RNA za translaciju strukturnih proteina i genomske RNA koja će se pakirati u novonastale čestice virusa. Diskontinuirana transkripcija jedinstveno je obilježje roda *Nidovirales* i odvija se mehanizmom zamjene kalupa. Njome nastaju kratke +sgRNA različite dužine koje kodiraju za strukturne i pomoćne proteini. Ono što još uvijek nije razjašnjeno je kako virus razlikuje +gRNA i +sgRNA te zašto se baš samo jedna molekula novosintetizirane +gRNA pakira u svaki virion. Kako bi virus iskoristio ribosomsku aktivnost stanice čovjeka i proveo translaciju, subgenomska RNA treba proći preinake u obliku vezanja 7-metilgvanilata na 5' kraj i poliA repa na 3' kraju te i u ovome koraku životnog ciklusa sudjeluju proteini replikacijsko transkripcijskog kompleksa. Unatoč niskoj učestalosti mutacije, za koju je odgovorna lektorirajuća aktivnost nestrukturnog proteina 14, i tisućama bezopasnih mutacija, pojavile su se određene mutacije, a time i sojevi koji pogoršavaju kliničku sliku, lakše se prenose i izbjegavaju imunološku reakciju domaćina. Najnoviji soj koji izaziva zabrinutost, omikron, trenutno prevladava među ostalim sojevima zahvaljujući najvećem broju mutacija do sada, među kojima je većina mutacija proteina S. Ova činjenica nas upućuje na zaključak kako je iznimno važno pratiti sojeve koji nastaju kao rezultat evolucije virusa SARS-CoV-2 kako bismo se novim varijantama virusa koje izazivaju zabrinutost mogli prilagođavati, u prvom redu razvojem novih cjepiva koja su trenutno najkorisniji alat u borbi protiv SARS-CoV-2.

4. POPIS LITERATURE

Amicone M, Borges V, Alves JM, Isidro J, Ze-Ze L, Duarte S, Vieira L, Guiomar R, Gomes JP, Gordo I (2022) Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. *Evolution, Medicine, and Public Health* **10**, 142-155, <https://doi.org/10.1093/emph/eoac010>

Bai C., Zhong Q., Gao G.F. (2022), Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins, *Science China Life Sciences*, **65**, 280-294, <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4> 3

Bhat EA, Khan J, Sajjad N, Ali A, Aldakeel FM, Mateen A, Alqahtani MS, Syed R (2021) SARS-CoV-2: Insight in genome structure, pathogenesis and viral receptor binding analysis- An updated review. *International Immunopharmacology* **95**, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107493>

Brant AC, Tian W, Majerciak V, Yang W, Zheng ZM (2021) SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell & Bioscience* **11**, 136, <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z>

Ćupić M (2021.) SARS-CoV-2: genetička varijabilnost, mutacije i varijante koje zabrinjavaju globalni svet. *Medicinski pomladak* **72**, 3, 1-7, <https://doi.org/10.5937/mp72-33322>

Danckwardt S, Kaufmann I, Gentzel M, U Foerstner K, Gantzer A.S., Gehring N., Neu-Yilik G., Bork P., Keller W., Wilm M., Hentze M., Kulozik A.(2007.) Splicing factors stimulate polyadenylation via USEs at non-canonical 3' end formation signals, *The EMBO Journal* **26**, 2658-2669, <https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/sj.emboj.7601699>

Fischer W, Giorgi EE, Chakraborty S, Nguyen K, Bhattacharya T, Theiler J, Goloboff PA, Yoon H, Abfalterer W, Foley BT, Tegally H, San JE, de Olivera T, Network for Genomic Surveillance in South Africa, Gnanakaran S, Korber B (2021) HIV-1 and SARS-CoV-2: Patterns in the evolution of two pandemic pathogens. *Cell Host & Microbe* **29**, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.05.012>

He X, Hong W, Pan X, Lu G, Wei X (2021) SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. *MedComm* **2**, 838-845, <https://doi.org/10.1002/mco2.110>

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje, Leksikografski zavod Miroslav Krleža (2021.), <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=17910> (pristupljeno 27. lipnja 2022.)

JHU, Coronavirus Resource Center (2022.). JHU- John Hopkins University <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (pristupljeno 27. lipnja 2022.)

Kaur N, Singh R, Dar Z, Bijarnia RK, Dhingra N, Kaur T (2020) Genetic comparison among various coronavirus strains for the identification of potential vaccine targets of SARS-CoV-2. *Infection, Genetics and Evolution* **89**, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104490>

Liu Y, Liu J, Plante KS, Plante JA, Xie X, Zhang X, Ku Z, An Z, Scharton D, Schindewolf C, Menachery VD, Shi PY, Weaver SC (2021) The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 transmission, <https://doi.org/10.1101/2021.03.08.434499>

Lubinski B, Fernandes MHV, Frazier L, Tang T, Daniel S, Diel DG, Jaimes JA, Whittaker GR (2021) Functional evaluation of the P681H mutation on the proteolytic activation the SARS-CoV-2 variant B.1.1.7(Alpha) spike

Magazine N, Zhang T, Wu Y, McGee MC, Veggiani G, Huang W (2022.) Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Viruses* **14**, 640, <https://doi.org/10.3390/v14030640>

Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA (2022) Structures and function of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **23**, 21-39, <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00432-z>

Rambaut A, Holmes EC, O'Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, du Plessis L & Pybus OG (2020.). *Nature Microbiology*, doi:10.1038/s41564-020-0770-5

Shieh-zadegan S, Alaghemand N, Fox M, Venketaraman V (2021) Analysis of the Delta Variant B.1.617.2 COVID-19. *Clinics and Practice* **11**, 778-784, <https://doi.org/10.3390/clinpract11040093>

Rawson JMO, Landman SR, Reilly CS, Mansky LM (2015.) HIV-1 and HIV-2 exhibit similar mutation frequencies and spectra in the absence of G-to-A hypermutation. *Retrovirology* **12**, doi 10.1186/s12977-015-0180-6

Ritchie H, Mathieu E, Rodés-Guirao L, Appel C, Giattino C, Ortiz-Ospina E, Hasell J, Macdonald B, Beltekian D, Roser M (2020.) Coronavirus Pandemic (COVID-19), [https://ourworldindata.org/grapher/covid-variants-](https://ourworldindata.org/grapher/covid-variants-bar?country=USA~GBR~IND~BRA~CAN~ITA~ESP~DEU~AUT~AUS~FRA~ZAF~NPL)

[bar?country=USA~GBR~IND~BRA~CAN~ITA~ESP~DEU~AUT~AUS~FRA~ZAF~NPL](https://ourworldindata.org/grapher/covid-variants-bar?country=USA~GBR~IND~BRA~CAN~ITA~ESP~DEU~AUT~AUS~FRA~ZAF~NPL)

(datum pristupa 27. lipanj 2022.)

V’Kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V.(2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2, *Nature Reviews Microbiology*, **19**, 150-170, <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>

Wang R, Chen J, Gao K, Hozumi Y, Yin C, Wei GW (2020) Characterizing SARS-CoV-2 mutations in the United States. *Communications biology* **4**, 228, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-49671/v1>

WHO (2021) Coronavirus disease (COVID-19): Variants of SARS-COV-2. WHO-World Health Organization https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-%28covid-19%29-variants-of-sars-cov-2?gclid=Cj0KCQjwntCVBhDdARIsAMeWACk09k8voTvh_UFIVf-FUMvB05Ik7txeJeXo4fOmfpdX6MIhFQc9uvQaAgCMEALw_wcB (pristupljeno 27. lipnja 2022.)

Wilamowski M, Hammel M, Leite W, Zhang Q, Kim Y, Weiss K., Jedrzejczak R, Rosenberg DJ, Fan Y, Wower J, Bierma JC, Sarker AH, Tsutakawa SE, Pingali SV, O'Neill HM, Joachimiak A, Hura GL (2021) Transient and stabilized complexes of Nsp7, Nsp8, and Nsp12 in SARS-CoV-2 replication. *Biophysical journal* **120**, 3152-3165, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.06.006>

Yan L, Zhang Y, Ge J, Zheng L, Gao Y, Wang T, Jia Z, Wang H, Huang Y, Li M, Wang Q, Rao Z, Lou Z (2020) Architecture of a SARS-CoV-2 mini replication and transcription complex. *Nature communications*, **11**, 5874, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19770-1>

Yang W.T., Huang W.H., Liao T.L., Hsiao T.H., Chuang H.N., Liu P.Y. (2022). SARS-CoV-2 E484K Mutation Narrative Review: Epidemiology, Immune Escape, Clinical Implications and Future Considerations, *Infection and Drug Resistance*, **15**, 373-385, <https://doi.org/10.2147/IDR.S344099>

<https://www.britannica.com/science/2019-nCov> (datum pristupa 26. lipnja 2022.)

Izjava o izvornosti

Ja NIKA BILIĆ (ime i prezime) izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Nika Bilić

Vlastoručni potpis