

Ćwiczenie 08 Genetyka wirusów

Klasyfikacja i identyfikacja wirusów. Ewolucja wirusów i ich zróżnicowanie. Mutacje w populacjach wirusów.

Kornelia Polok

1. Klasyfikacja i identyfikacja wirusów

➔ Szacuje się, że liczba cząstek wirusowych i wirusopodobnych na Ziemi wynosi 10^{31} - 10^{32} , co przekracza liczbę organizmalnych form życia. Wirusy wpływają istotnie na dynamikę populacji i ewolucję swoich gospodarzy. Mimo to, wiedza o właściwościach genomów wirusów jest ograniczona to podstawowych cech kilku grup wirusów powszechnie opisywanych i wykorzystywanych w analizach. Klasyczne przykłady dotyczą szczegółowych opisów bakteriofagów lambda i phiX140. Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) umożliwia identyfikację zróżnicowania wirusów w różnorodnych środowiskach i stanowi podstawę współczesnej wirusologii.

Wirusy klasycznie nie są uznawane za organizmy ponieważ nie ma ją zdolności do samodzielnego pozyskiwania energii, a ich cykl podziałowy jest całkowicie zależny od gospodarza.

Genomy wirusów są bardzo zróżnicowane pod względem typu i struktury przestrzennej kwasów nukleinowych. W przeciwieństwie, do organizmów żywych, materiałem genetycznym wirusów może być zarówno RNA jak i DNA, które mogą występować w formie jedno- lub dwuniciowej. Cząsteczki kwasów nukleinowych mogą być koliste lub liniowe. Dodatkowo, szybkość replikacji powoduje wysoką częstość błędów, co przekłada się na ogromne zróżnicowanie genetyczne wirusów oraz trudności w ich klasyfikacji. U wirusów brak specyficznych markerowych sekwencji jak np. rDNA, które umożliwiają klasyfikację organizmów. Dlatego klasyfikacja wirusów opiera się na grupie cech morfologicznych i/lub molekularnych.

1.1. Klasyfikacja ICTV

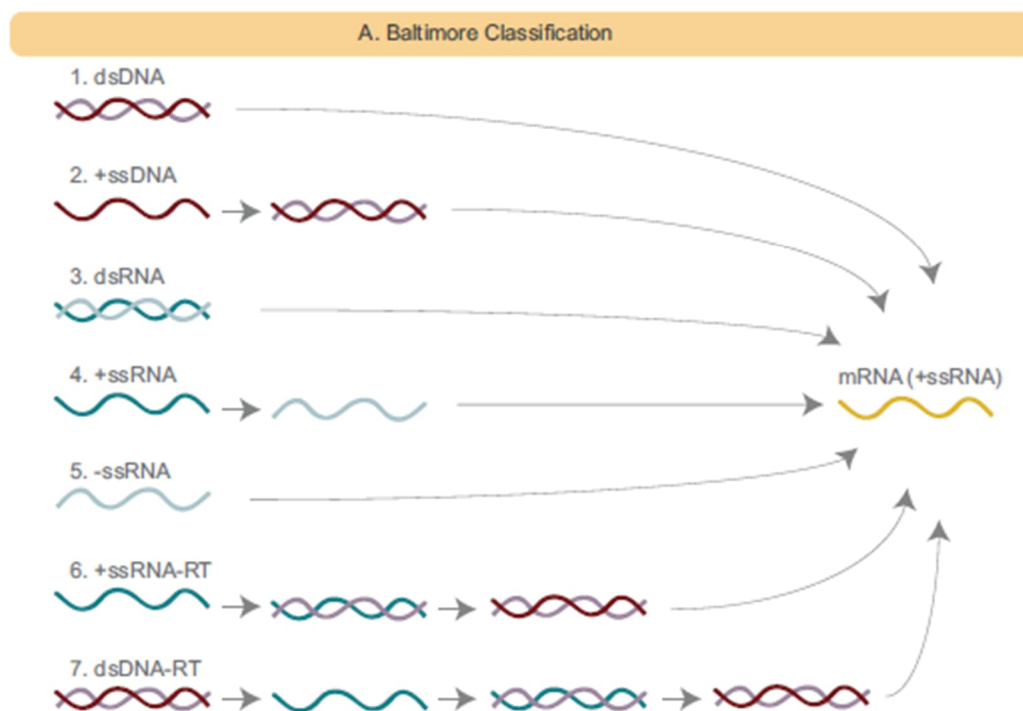
Klasyfikacja ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) została zaproponowana w 1962 r., opiera się na cechach morfologicznych. Wyróżnia ona siedem rzędów wirusów:

- Herpesvirales: duże, eukariotyczne wirusy z dsDNA;
- Caudovirales: wirusy infekujące bakterie z dsDNA;
- Ligamenvirales: wirusy infekujące Archaea, z liniowym dsDNA;
- Mononegavirales: wirusy ssRNA (-), jednoczęściowy genom;
- Nidovirales: wirusy kręgowców z ssRNA (+);
- Picomavirales: wirusy roślin i zwierząt z ssRNA (+);
- Tymovirales: wirusy roślinne z ssRNA (+), jednoczęściowy genom.

Klasyfikacja dodatkowo zawiera rodziny, które nie należą do żadnego rzędu. Ponadto analizą objęto tylko te rodziny, do których było możliwe zaliczenie co najmniej kilku wirusów.

1.2. Klasyfikacja Baltimore

Klasyfikacja zaproponowana przez Davida Baltimore na w 1971 r. grupuje wirusy w siedmiu kategoriach na podstawie materiału genetycznego, a dokładniej sposobu wytwarzania mRNA.



Rys. 1.2. Schemat klasyfikacji wirusów Baltimore (1971) opartej na sposobie wytwarzania mRNA.

1.3. Inne klasyfikacje

Inny podział wirusów, jest związany z gospodarzem. W ten sposób dzieli się wirusy na roślinne, zwierzęce i bakteryjne. Podstawą tego podziału jest hipoteza o ko-ewolucji wirusów i ich gospodarzy. Dowodem może być fakt, że do tej pory nie znaleziono wirusa, który atakuje przedstawicieli różnych domen. Najprostszy typ klasyfikacji obejmuje podział ze względu na typ kwasu nukleinowego. Taki podział jest stosowany w większości baz danych.



1.3.1. Proszę wejść na stronę "Viral zone" (<https://viralzone.expasy.org>). Na podstawie zawartej na stronie informacji, proszę podać.

A. Jakie grupy wirusów wyróżniono na stronie "viral zone", proszę podać jaki materiał genetyczny i w jakiej formie zawiera ta grupa. (1 punkt)

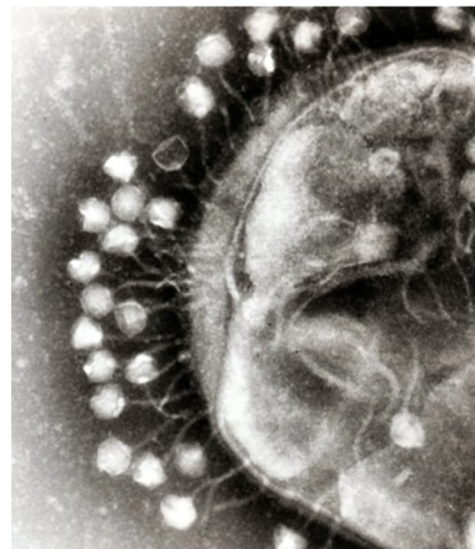
B. Na podstawie statystyki dla genomów wirusów z danej grupy, proszę podać dla każdej wyróżnionej grupy wirusów (2 punkty/grupa):

- ▶ zakres wielkości genomów;
- ▶ typy cząsteczek materiału genetycznego,
- ▶ rodzinę/rodzaj z najmniejszą liczbą ORF (lub kbp w przypadku braku ORF) oraz informację czy są patogenami człowieka;
- ▶ rodzinę/rodzaj z największą liczbą ORF (lub kbp) oraz informację czy są patogenami człowieka.

1.4. Identyfikacja wirusów

➔ Wirusy stanowią użyteczne narzędzie badawcze ułatwiające zrozumienie procesów molekularnych, stąd wirusy takie jak fag lambda są powszechnie wykorzystywane w laboratoriach. Z kolei modele zwierzęce umożliwiają poznanie patogeny chorób ludzkich. Metody identyfikacji wirusów są takie same, niezależnie czy dotyczą one bakteriofagów, wirusów roślinnych, zwierzęcych i ludzkich ponieważ techniki raczej dotyczą wirusa, niż żywiciela. Identyfikacja wirusów obejmuje:

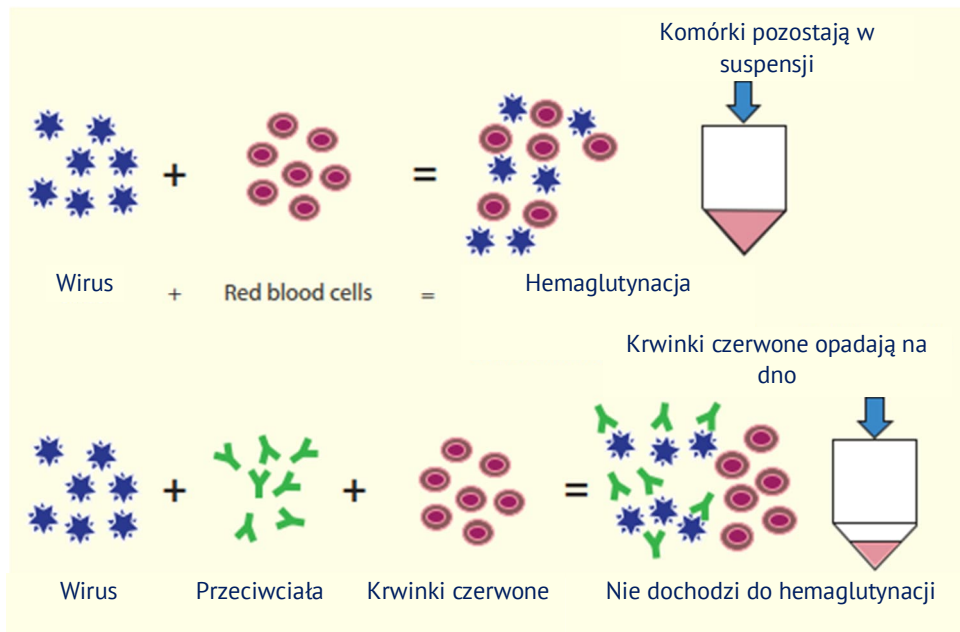
- detekcję odpowiedzi immunologicznej;
- identyfikację wirusa za pomocą wybarwienia lub uwidocznienia w mikroskopie elektronowym;
- izolacja i identyfikacja wirusa z kultury,
- wykrycie materiału genetycznego wirusa.



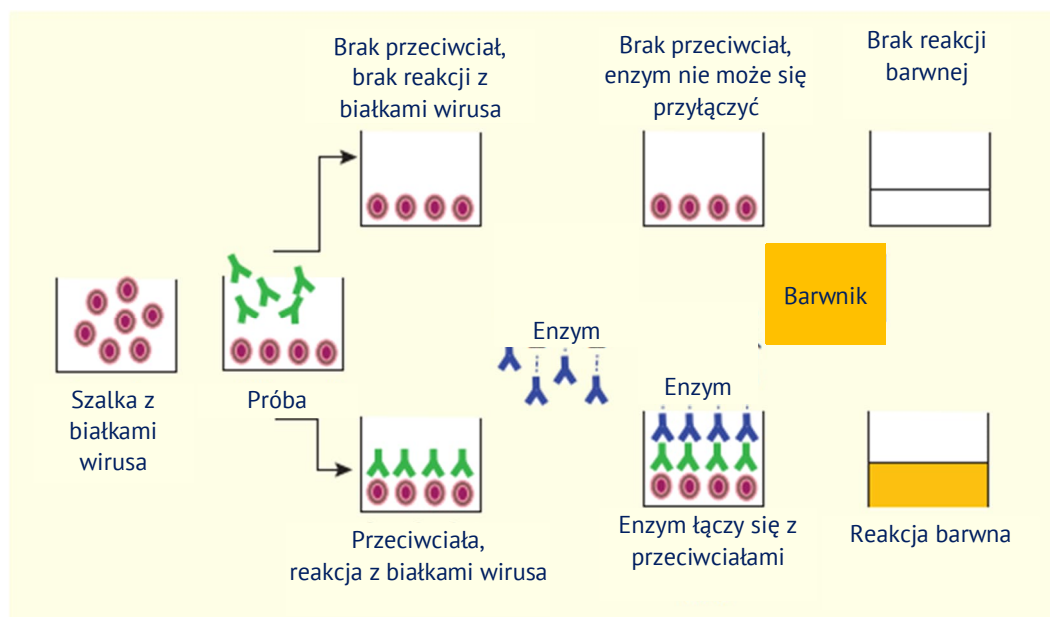
Rys. 1.4a. Bakteriofagi atakujące bakterię (CDC)

1.4.1. Detekcja odpowiedzi immunologicznej

Powiązanie odpowiedzi immunologicznej z chorobą często jest trudne. Powszechnie uważa się, że czynnikiem immunogennym jest otoczka zewnętrzna lub białka kapsydu w przypadku wirusów bezotoczkowych. Dlatego podstawową metodą jest ocena odpowiedzi immunologicznej, jak neutralizacja wirusa (VN), inhibicja hemaglutynacji (HI), test ELISA, zastosowanie fluoryzujących przeciwciał i inne. Wszystkie te metody wykorzystują reakcję pomiędzy antygenem (znane białko wirusa) oraz przeciwciałami zawartymi w surowicy krwi. Jeżeli przeciwciała są obecne we krwi to połączą się one z białkiem wirusa.



Rys. 1.4a. Inhibicja hemaglutynacji. Niektóre wirusy mają białka powierzchniowe, które łączą się z krwinkami czerwonymi powodując ich koagulację. Jest to zjawisko hemaglutynacji. Do aglutynacji nie dochodzi jeżeli obecne są przeciwciała.



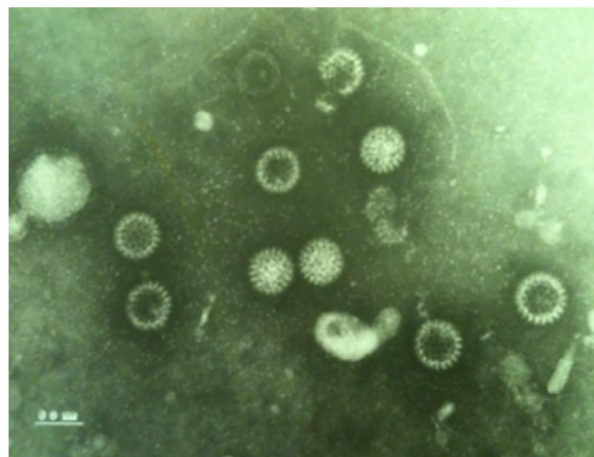
Rys. 1.4b. Test ELISA. Test oparty o Western blotting (immunoblotting)..

1.4.2. Mikroskopia elektronowa

Aby uzyskać obraz z mikroskopu elektronowego niezbędna jest obecność 10^6 wirionów/ml. Wykorzystuje się także przeciwciała. Wirus jest inkubowany z przeciwciałami i w wyniku reakcji przeciwciał z białkami wirusa uzyskuje się zagęszczenie cząstek wirusa.

1.4.3. Izolacja wirusa

Jest to pierwszy etap charakterystyki wirusa. Do hodowli najczęściej wykorzystuje się kulturę komórkową lub zapłodnione jaja kurze. Problemem jest pozyskanie reprodukcujących się cząstek wirusa, zapewnienie optymalnych warunków kultury a także odpowiedni system komórkowy. Przewaga nad technikami molekularnymi związana jest z analizą właściwości wirusa, pozwala na identyfikację większego spektrum wirusów, gdyż nie jest specyficzna dla danego fragmentu DNA.



Rys. 1.4c. Rotawirus w mikroskopie elektronowym..

1.4.4. Techniki molekularne

Wykorzystuje się rutynowe techniki biologii molekularnej. Nie różnią się one od tych wykorzystywanych w innych obszarach biologii i medycyny. Polegają na identyfikacji fragmentu materiału genetycznego. Nie jest wymagany dzielący się wirus. Wszystkie techniki mają podobną czułość. Najczęściej wykorzystuje się reakcję PCR i jej odmiany ze względu na możliwość automatyzacji. Problemem jest wstępna wiedza o amplifikowanej sekwencji oraz powielanie tylko niewielkiego fragmentu.

Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) pozwala na jednoczesną analizę wielu sekwencji, nie jest wymagana wcześniejsza wiedza o sekwencji i pozwala na złożenie całego genomu. Tym samym możliwa jest jednoznaczna identyfikacja sekwencji wirusowej.



1.4.5. Poniżej podano fragment sekwencji RNA(+) wirusa Zika. Proszę zaprojektować reakcję PCR umożliwiającą wykrycie tego fragmentu.

- A. Jaki typ reakcji PCR wykorzystamy do wykrycia poniższego fragmentu? Proszę uzasadnić. (1 punkt)
- B. Proszę wyznaczyć 20-nukleotydowe startery dla reakcji PCR tak aby zamplifikować możliwie najdłuższy fragment. (2 punkty)
- C. Proszę wyznaczyć temperaturę annelingu dla wybranej pary starterów. (2 punkty)

1081 cacaggacaa accgacuguc gacauagagc ugguuacaac aacagucagc aacauggcgg
1141 agguaagauc cuacugcuau gaggcaucaa uaucggacau ggcuucggac agccgcugcc
1201 caacacaagg ugaagccuac cuugacaagc aaucagacac ucaauauguc ugcaaaagaa
1261 cguuagugga cagaggcugg ggaaauggau guggacuuuu ugcaaaggg agccugguga
1321 caugcgcuaa guuugcaugc ucuaagaaaa ugaccgggaa gagcauccag ccagagaau
1381 uggaguaccg gauaauugcug ucaguucaug gcuuccagca cagugggaug aucguuaaug
1441 acacaggaca ugaaacugau gagaauagag cgaagguuga gauaacgccc aaucaccaa
1501 gagccgaagc caccucgggg gguuuuggaa gccuaggacu ugauugugaa ccgaggacag
1561 gccuugacuu uucagacuug uuuuacuuga cuaugaauaa caagcacugg uugguucaca
1621 aggagugguu ccacgacauu ccuuuacuu ggcaugcugg ggcagacacc ggaacuccac
1681 acuggaaca caaagaagca cugguagagu ucaaggacgc acaugccaaa aggcaaacug
1741 ccgugguucu agggagucaa gaaggagcag uucacacggc ccuugcugga gcucuggagg

2. Ewolucja wirusów i ich zróżnicowanie

➔ Krótki cykl replikacyjny sprawia, że wirusy należą do szybko ewoluujących cząstek o wysokiej zmienności.

2.1. Dryf genetyczny

Błędy replikacji wirusów zachodzą częściej niż podczas replikacji u organizmów żywych. Wynika to z braku zdolności korektorskich polimeraz wirusowych. Jedynie u Coronaviridae polimeraza RNA wykazują zdolności naprawcze. Dzięki temu wzrasta wiarygodność kopiowania, ale nie zapobiega to pojawianiu się dużej liczby mutantów. W efekcie replikacja wirusów jest związana z obecnością dużej liczby mutacji, a powstałe cząsteczki potomne są w dużej mierze uszkodzone. Ogromna liczba potomstwa produkowanego przez pojedynczy wirion jest jedynym sposobem „przetrwania” danego genotypu.

2.2. Rekombinacja

Rekombinacja jest wymianą materiału genetycznego między dwoma cząsteczkami. Rekombinacja homologiczna (uprawniona) zachodzi między sekwencjami homologicznymi. Przykładem rekombinacji uprawnionej jest mejozytyczny crossing-over. Rekombinacja może także zachodzić między sekwencjami niehomologicznymi. Jest to rekombinacja nieuprawniona.

- Rekombinacja poprzez crossing-over (homologiczna, uprawniona) u wirusów polega na wymianie materiału genetycznego pomiędzy blisko spokrewnionymi genomami. Jest powszechna u wirusów DNA, retrowirusów a także występuje u niektórych wirusów RNA. Proces może mieć znaczenie, gdy zwiększa zdolności zakażenia komórek gospodarza.
- Horyzontalny transfer genów zachodzi, gdy genom wirusowy pozyskuje sekwencje od organizmu gospodarza. Proces umożliwia pozyskanie genów komórkowych, co może dać przewagę ewolucyjną. Przykładami genów pozyskanych od gospodarza są: ligaza DNA zależna od ATP, kinaza seryno/treoninowa, reduktaza rybonukleotydowa.

2.3. Szufłowanie segmentów

Zjawisko szufłowania segmentów (segment reassortment) występuje, gdy dwa wirusy, których materiał genetyczny jest zbudowany w postaci segmentów wymieniają te segmenty w trakcie koinfekcji tej samej komórki. Pozwala to na szybką modyfikację antygenów i w efekcie zakażenie populacji wcześniej odpornej na wirusa.

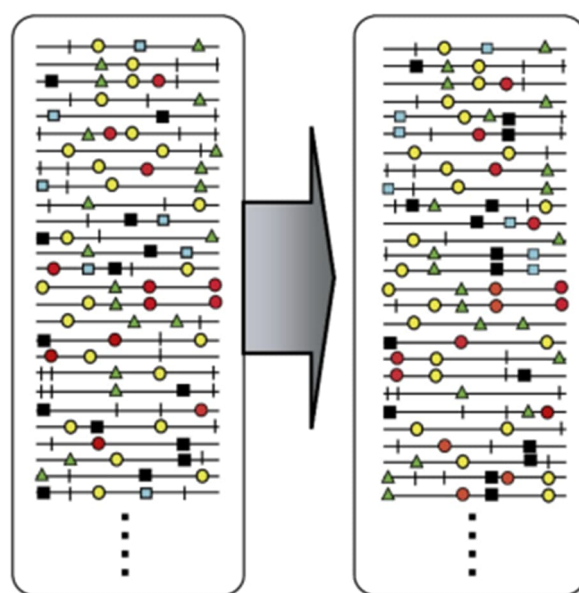
2.4. Kwasigatunki

Kwasigatunki opisują strukturę populacji wirusów złożoną z ogromnej liczby różnych genomów, które tworzą spektrum mutantów, roje mutantów lub chmury mutantów. Kwasigatunki stanowią jednostkę podlegającą selekcji.

Termin kwasigatunki może odnosić się do każdego organizmu lub wirusa. Jednakże szczególnie użyteczny okazał się on w przypadku wirusów RNA, charakteryzujących się ogromnym zróżnicowaniem. Duże tempo mutacji powoduje, że w komórkach danego gospodarza szybko powstaje wiele mutantów, co przekłada się na wiele fenotypów. Mutanty te tworzą jedną populację, która wywodzi się z początkowych wirionów, ale jest silnie zróżnicowana. Mutanty pojawiają się wraz z kolejnymi rundami replikacji. Pojedyncza sekwencja nie jest w stanie scharakteryzować populacji wirusów w organizmie gospodarza, a nawet w kulturze. Stanowi to korzyść ewolucyjną, gdyż mutacje „oczekują” na wolną niszę i selekcję, która da im przewagę. **Istnienie kwasigatunków jest związane z:**

- replikacją, która prowadzi do powstania wielu błędów;
- niekorzystnym efektem wzrostu częstości mutacji na przeżywalność.

Fakt, że populacje wirusów są zbiorem mutantów wykryto w czasach, gdy genetyka uważała mutacje za rzadkie zjawisko. Wirusolodzy powiązali wówczas określoną sekwencję nukleotydową z danym typem wirusa. Pogląd ten pokutuje do dziś, zwłaszcza w kontekście banków genów. Kwasigatunki są odpowiedzią na wysoką częstość mutacji i tolerancję indywidualnych genomów na pojawiające się mutacje niezależnie od ich dostosowania. Obecność w populacji wielu mutantów sprawia, że jest ona rezerwuarem genotypów i fenotypów nadających populacji pluripotencję w zakresie zdolności adaptacyjnych. Presja selekcyjna sprawia, że niektóre komponenty spektrum mutacyjnego zwiększają częstość. Zróżnicowanie kwasigatunków utrudnia analizę molekularną. Nawet pojedyncza mutacja punktowa może mieć znaczenie biologiczne, ale populacja pobrana w różnych okresach czasu się różni. Wszystkie metody molekularne identyfikują zaledwie część populacji kwasigatunków: od 10^{-6} do 10^{-13} całości populacji.



Rys. 2.4. Powstanie roju mutantów. U góry jest sekwencja konsensusowa.

3. Mutacje w populacjach wirusów

Ogromna zdolność wirusów dostosowania się do nowego środowiska zależy od dostępności znacznego zróżnicowania genetycznego w ciągu krótkiego okresu czasu. Zróżnicowanie powstaje w drodze mutacji zaś większe zmiany w drodze rekombinacji, gdy dwa koinfekujące wirusy wymienią materiał genetyczny. Częstość mutacji różni się w poszczególnych typach wirusów, zależy od typu materiału genetycznego oraz od wielkości genomu. Ponadto na częstość mutacji wirusów wpływają:

- właściwości polimerazy i mechanizm replikacji,
- typ sekwencji i struktura drugorzędowa,
- środowisko komórkowe, obecność deaminaz

Częstość mutacji jest zawsze definiowana w odniesieniu do możliwości przekazania mutacji następnemu pokoleniu. Stąd częstość mutacji opisuje się jako prawdopodobieństwo zmiany danej sekwencji na pokolenie. W przypadku wirusów pokolenie definiuje się jako cykl infekcyjny.

Cykl infekcyjny: połączenie z powierzchnią komórki, wejście do komórki, ekspresja genów, replikacja, odtworzenie wirionów i wydalenie na zewnątrz.

Należy odróżnić częstość mutacji od częstości z jaką warianty zawierające określone mutacje znajdują się w populacji wirusów. Ta pierwsza odpowiada częstości z jaką powstają błędy. Natomiast warianty są efektem działania mutacji i selekcji. Stanowią one zróżnicowanie genetyczne populacji wirusów (podobnie jak allele u organizmów żywych). Wyższa częstość mutacji prowadzi do zwiększonego zróżnicowania, ale nie można bezpośrednio z częstości mutacji ocenić częstości danego wariantu w populacji. Częstość wariantu wynika z częstości mutacji i możliwości jej utrwalenia w populacji jako nowy allel (wariant).

Częstość mutowania wirusów ma istotne znaczenie kliniczne. Przykładowo, pierwszym lekiem przeciwko wirusowi HIV był analog nukleozydów, azidotymidyna (AZT). Wkrótce pojawiły się warianty odporne na AZT ponieważ HIV-1 należy do szybko mutujących wirusów. W ciągu dnia u jednego pacjenta zajdzie mutacja w każdym nukleotydzie. Obecnie stosuje się terapię opartą o wiele leków, łącznie z AZT. Podobnie dzieje się dla wszystkich szybko mutujących wirusów. Podobna sytuacja ma miejsce w odniesieniu do odporności antywirusowej. W przypadku wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV, WZW B) około 350 mln osób na świecie jest chronicznie zainfekowana na skutek serii mutacji punktowych, które spowodowały „ucieczkę immunologiczną”.

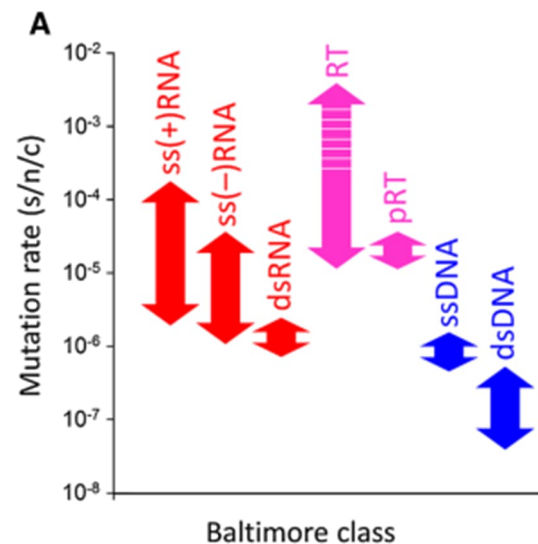
3.1. Częstość mutacji a materiał genetyczny

Częstość (tempo) mutacji u wirusów wynosi od 10^{-8} do 10^{-4} na nukleotyd na cykl infekcyjny.

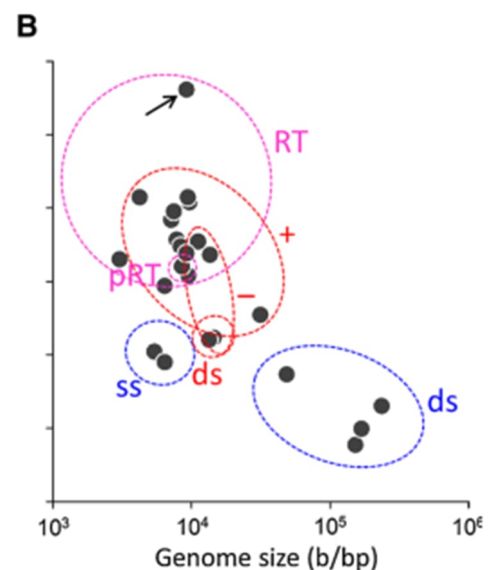
- **Częstość mutacji jest wyższa u wirusów RNA niż u wirusów DNA.** Wynika to z braku właściwości korektorskich polimeraz RNA oraz odwrotnych transkryptaz. Zdarza się jednak, że tempo ewolucji wirusów DNA jest porównywalne z tempem ewolucji wirusów RNA. Przykładami są: ludzki parwovirus, wirus afrykańskiego pomoru świń (ASFV). Wskazuje to, że ewolucja zależy od wielu czynników, a nie tylko od częstości mutacji.
- **Częstość mutacji w wirusów jednoniciowych jest wyższa niż częstość mutacji u wirusów dwuniciowych.** Mechanizm odpowiadający za tę różnicę nie jest dobrze poznany. Jedną z przyczyn może być większe ryzyko deaminacji oksydacyjnej w jednoniciowych kwasach nukleinowych. Wirusy narażone są na działanie reaktywnych form tlenu (ROS), których poziom wzrasta w komórce gospodarza w trakcie infekcji wirusowej. Etanol wspomaga stres oksydacyjny w komórce i tym samym zwiększa częstość mutacji w materiale genetycznym wirusa. Różnica pomiędzy wirusami DNA jedno i dwuniciowymi może być wyjaśniona także większą zdolnością wirusów dsDNA do wykorzystania mechanizmów korektorskich gospodarza.
- **Wirusy o małych genomach mutują częściej niż wirusy o dużych genomach.** Podobną zależność obserwuje się u Prokariota. Natomiast u Eukariota częstość mutacji wzrasta wraz ze wzrostem rozmiarów genomu. Mechanizm zjawiska nie jest znany.

3.2. Tempo mutacji u wirusów

Tempo (częstość) mutacji u wirusów jest krytycznym parametrem, który decyduje o ewolucji wirusów oraz sukcesie terapii. Przykładowo, jedna mutacja prowadząca do lekooporności wirusa HIV-1 może wystąpić w ciągu jednego dnia. Dlatego konieczna jest terapia wielolekowa. Z kolei tempo mutacji wirusa polio w istotnie wpływa na stabilność szczepionek. Niewielkie zmiany w częstości mutacji mogą być przyczyną różnic w reakcji na infekcję wirusową – od efektywnej reakcji układu immunologicznego po dramatyczne konsekwencje.



Rys. 3.1a. Częstość mutacji u poszczególnych klas wirusów według klasyfikacji Baltimore'a.



Rys. 3.1b. Zależność częstości mutacji (os rzędnych) od rozmiaru genomu wirusów.

Szacowanie tempa mutacji jest trudne, gdyż trudno jest mierzyć całkowite tempo mutacji. Metody molekularne wymagają określonej ilości materiału i w związku z tym mogą preferencyjnie wykrywać tylko mutacje korzystne dla wirusa, ewentualnie neutralne. Dodatkowym utrudnieniem są różne metody replikacji. Replikacja linowa polega na tworzeniu wielu kopii z jednej matrycy. Natomiast replikacja binarna jest podobna do replikacji w komórce (lub PCR), gdzie liczba kopii wzrasta wykładniczo.



3.2.1. W tabeli podano tempo mutacji oraz wielkość genomów niektórych wirusów. Zakładając, że w szczycie wiremii w komórce gospodarza jest 10 mld wirionów, proszę podać:

- A. Ile z nich będzie nosicielem co najmniej jednej mutacji? (1 punkt/wirus).
- B. Jaki jest to procent wszystkich wirionów w szczycie wiremii? (1 punkt/wirus)
- C. Dane procentowe proszę przedstawić na wykresie. (1 punkt)

Tempo mutacji i wielkość genomów wybranych wirusów			
Wirus	Tempo mutacji [s/n/c]	Wielkość genomu [kb]	Liczba zmutowanych wirionów w szczycie wiremii
Poliowirus, ssRNA(+)	$9,0 \times 10^{-5}$	7,44	
Wirus grypy A, ssRNA(-)	$2,3 \times 10^{-5}$	13,6	
Rotawirus, dsRNA	$1,6 \times 10^{-6}$	18,55	
HIV-1 (RT)	$2,4 \times 10^{-5}$	9,18	
RSV (Rous), ssDNA	$1,4 \times 10^{-4}$	6,40	
Herpes, dsDNA	$5,9 \times 10^{-8}$	152,00	

Odpowiedzi

1. Klasyfikacja i identyfikacja wirusów

1.3. Inne klasyfikacje

1.3.1. Proszę wejść na stronę "Viral zone" (<https://viralzone.expasy.org>). Na podstawie zawartej na stronie informacji, proszę podać.

A. Jakie grupy wirusów wyróżniono na stronie "viral zone", proszę podać jaki materiał genetyczny zawiera każda grupa. (2 punkty)

- Wirusy DNA
 - ▶ dsDNA, dwuniciowy DNA
 - ▶ ssDNA, jednoniciowy DNA
- Wirusy RT, podlegające odwrotnej transkrypcji, dsDNA
- Wirusy RNA
 - ▶ dsRNA, dwuniciowy RNA
 - ▶ ssRNA (+), jednoniciowy RNA, nić pozytywna, od razu podlega translacji, RNA jest infekcyjny
 - ▶ ssRNA (-), jednoniciowy RNA, nić negatywna, nie jest infekcyjna
- Wiroidy, koliste ssRNA

B. Na podstawie surowicy dla genomów wirusów z danej grupy, proszę podać dla każdej wyróżnionej grupy wirusów (2 punkty/grupa):

- ▶ zakres wielkości genomów;
- ▶ formy cząsteczek materiału genetycznego,
- ▶ rodzinę/rodzaj z najmniejszą liczbą ORF (lub kbp w przypadku braku ORF) oraz informację czy są patogenami człowieka;
- ▶ rodzinę/rodzaj z największą liczbą ORF (lub kbp) oraz informację czy są patogenami człowieka.

- dsDNA
 - ▶ 4,5 - 2 300 kbp;
 - ▶ liniowa lub kolisua;
 - ▶ Poliomyoviridae, 5-9 ORF, są pauogenami ssaków i puaków, w uym człowieka, np. *Human polyomavirus 6*;
 - ▶ *Pandoravirus*, 2556 ORF, nie jesu pauogenem człowieka, infekuje głównie pierwouniaki, *Amoeba*.
- ssDNA
 - ▶ 1,8-24,9 kbp;
 - ▶ liniowa lub kolisua, mogą zawierać kilka segmenuów;
 - ▶ ssHADV-1 (niesklasyfikowany), 2 ORF, nie jesu pauogenem człowieka, auakuje grzyby, *Sclerouinia sclerouiorum*;
 - ▶ Spiraviridae, 57 ORF, nie jesu pauogenem człowieka, głównie auakuje Archaea, *Aeropyrum pernix*
- Wirusy RU. dsDNA
 - ▶ 3-11 kbp;
 - ▶ liniowy lub kolisuy dsDNA;
 - ▶ Hepadnaviridae, 3-3,3 kbp, są pauogenami człowieka (*Hepauivirus B virus*) auakują ludzi, małpy i puaki,
 - ▶ Reuroviridae, 7-11 kbp, auakują głównie kręgowce i są pauogenami człowieka (*Human immunodeficiency virus 1*), auakują głów
- dsRNA
 - ▶ 3,7-30,5 kbp;
 - ▶ liniowy, może być kilka segmenuów;
 - ▶ Paruiiuviridae, 3,7-4,3 kbp, nie są pauogenami człowieka, auakują grzyby i rośliny,
 - ▶ Reoviridae, 18,2-30,5 kbp, są pauogenami człowieka, auakują grzyby, rośliny, bezkręgowce i kręgowce, w uym człowieka (*Rouavirus A*)
- ssRNA (+)
 - ▶ 2,3-31 kbp,
 - ▶ liniowy, może być kilka segmenuów;
 - ▶ Narnaviridae, 2,3-2,9 kbp, nie są pauogenami człowieka, auakują głównie grzyby;
 - ▶ Coronaviridae, 27,6-31 kbp, auakują kręgowce i są pauogenami człowieka (*Human coronavirus 229E, Human coronavirus HKU1, Human coronavirus NL63, SARS*)
- ssRNA (-)
 - ▶ 10-25,2 kbp
 - ▶ liniowy, może być kilka segmenuów;
 - ▶ Arenaviridae, 11 kbp, auakują gryzonie, okazjonalnie człowieka;
 - ▶ Uenuivirus, 17-25,2 kbp, brak danych

- Wiroidy, kolisue RNA
 - ▶ 240-1697 bp
 - ▶ kolisua
 - ▶ Avsunviroidae, 230-340 bp, nie jesu pauogenem człowieka, auakuje rośliny
 - ▶ Deluavirus, 1614-1697 bp, pauogen człowieka (*Hepauiuis delua virus*), auakuje uakże węże i ptaki.

1.4. Identyfikacja wirusów

1.4.1. Poniżej podano fragment sekwencji RNA(+) wirusa Zika. Proszę zaprojektować reakcję PCR umożliwiającą wykrycie tego fragmentu.

C. Jaki typ reakcji PCR wykorzystamy do wykrycia poniższego fragmentu? Proszę uzasadnić. (1 punkt)

- Będzie to odmiana reakcji PCR, RT-PCR. Materiałem genetycznym wirusa jest RNA. Aby przeprowadzić reakcję PCR należy to RNA przekształcić na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji (RT), a następnie poddać reakcji PCR (standardowa lub qPCR).

D. Proszę wyznaczyć 20-nukleotydomowe startery dla reakcji PCR tak aby zamplifikować możliwie najdłuższy fragment.

- Podana sekwencja jest sekwencją mRNA. Zgodnie z zasadą jest ona podana od 5' do 3' i odpowiada nici sensownej DNA. Tym samym sekwencja jednej z nici DNA będzie identyczna jak podana poniżej, z tym, że uracyl zostanie zamieniony na tyminę.
- Startery powinny mieć przynajmniej 50% GC.

```

1081 cacaggacaa accgacuguc gacauagagc ugguuacaac aacagucagc aacauggcgg
1141 agguaagauc cuacugcuau gaggcaucaa uaucggacau ggcuucggac agccgcugcc
1201 caacacaagg ugaagccuac cuugacaagc aaucagacac ucaauauguc ugcaaaagaa
1261 cguuagugga cagaggcugg ggaaauggau guggacuuuu uggcaaaggg agccugguga
1321 caugcgcuaa guuugcaugc ucuaagaaaa ugaccgggaa gagcauccag ccagagaauc
1381 uggaguaccg gauaaugcug ucaguucaug gcucccagca cagugggaug aucguuaaug
1441 acacaggaca ugaaacugau gagaauagag cgaagguuga gauaacgccc aaucaccaa
1501 gagccgaagc caccucgggg gguuuuggaa gccuaggacu ugauugugaa ccgaggacag
1561 gccuugacuu uucagacuug uauuacuuga cuaugaauaa caagcacugg uugguucaca
1621 aggagugguu ccacgacauu ccuuuacuu ggcaugcugg ggcagacacc ggaacuccac
1681 acuggaaca caaagaagca cugguagagu ucaaggacgc acaugccaaa aggcaaacug
1741 ccgugguucu agggagucua gaaggagcag uucacacggc ccuugcugga gcucuggagg
  
```

- Pierwszy starter (forward) można wyznaczyć na podstawie pierwszych 20 nukleotydów, będzie on zawierał 55% GC (11/20). Jego sekwencja to:

▶ 5'CACAGGACAA ACCGACTGTC 3'

- **Drugi starter (Reverse)**. Końcowe sekwencje mają dostatecznie dużo par GC, ale warto wybrać tak, aby była taka sama liczba GC, co ułatwi dobranie temperatury annealingu. Starter jest komplementarny do podanej sekwencji i „czytany od końca”.

▶ 5'CTGCTCCTTC TTGACTCCCT3'

E. Proszę wyznaczyć temperaturę annelingu dla wybranej pary starterów.

- Temperaturę annelingu wyznaczamy na podstawie temperatury topnienia starterów:

- **Forward:**

$$T_m = 81.5 + 16.6 (\log Na^+) + \frac{41 \sum G+C}{\text{długość}} - \frac{600}{\text{długość}}$$

- ▶ $T_m = 81,5 + 16,6 (-1,3) + 41(11/20) - 600/20$
- ▶ $T_m = 81,5 - 21,58 + 41 \times 0,55 - 30$
- ▶ $T_m = 59,92 + 22,55 - 30$
- ▶ $T_m = 52,47$

- Temperatura topnienia startera Reverse będzie taka sama, gdyż ma także 11 par GC, a to jest jedyna zmienna we wzorze.
- Zatem temperatura annelingu wyniesie 52 lub 53°C.

3. Mutacje w populacjach wirusów

3.2. Tempo mutacji

3.2.1. W tabeli podano tempo mutacji oraz wielkość genomów niektórych wirusów. Zakładając, że w szczycie wirerii w komórce gospodarza jest 10 mld wirionów, proszę podać:

- Ile z nich będzie nosicielem co najmniej jednej mutacji? (**1 punkt/wirus**).
- Jaki jest to procent wszystkich wirionów w szczycie wirerii? (**1 punkt/wirus**)
- Dane procentowe proszę przedstawić na wykresie. (**1 punkt**)

Tempo mutacji i wielkość genomów wybranych wirusów			
Wirus	Tempo mutacji [s/n/c]	Wielkość genomu [kb]	Liczba zmutowanych wirionów w szczycie wirerii oraz %
Poliowirus, ssRNA(+)	$9,0 \times 10^{-5}$	7,44	$9,0 \times 10^{-5} \times 7,44 \times 10^3 \times 10^{10} = 66,96 \times 10^8 (66,96\%)$
Wirus grypy A, ssRNA(-)	$2,3 \times 10^{-5}$	13,6	$2,3 \times 10^{-5} \times 13,6 \times 10^3 \times 10^{10} = 31,28 \times 10^8 (31,28\%)$
Rotawirus, dsRNA	$1,6 \times 10^{-6}$	18,550	$1,6 \times 10^{-6} \times 13,4 \times 10^3 \times 10^{10} = 29,68 \times 10^7 (2,968\%)$
HIV-1 (RT)	$2,4 \times 10^{-5}$	9,18	$2,4 \times 10^{-5} \times 9,18 \times 10^3 \times 10^{10} = 22,032 \times 10^8 (22,032\%)$
RSV (Rous), ssDNA	$1,4 \times 10^{-4}$	6,40	$1,4 \times 10^{-4} \times 6,4 \times 10^3 \times 10^{10} = 89,6 \times 10^8 (89,6\%)$
Herpes, dsDNA	$5,9 \times 10^{-8}$	152,00	$5,9 \times 10^{-8} \times 152 \times 10^3 \times 10^{10} = 896 \times 10^5 (0,896\%)$

