

Iwona Bukowska*, Marek Radkowski

Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych,
Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Pawińskiego 3c, 02-106 Warszawa

Wpłynęło w listopadzie 2009 r.

1. Wstęp. 2. Zjawisko *quasispecies*. 2.1. Mechanizmy powstawania zmienności. 3. Konsekwencje kliniczne zjawiska *quasispecies*. 3.1. Unikanie odpowiedzi układu immunologicznego. 3.2. Oporność na leki. 3.3. Wzrost wirulencji, zmiana tropizmu. 3.4. Szczepionki przeciwwirusowe. 4. Techniki badawcze. 5. Podsumowanie

RNA virus pathogenicity and *quasispecies* phenomenon

Abstract: RNA viruses constitute a widespread group of human, animal and plant pathogens. They are causative agents of diseases with diverse course and symptoms. Genetic instability and ability to form *quasispecies* are features determining their pathogenesis and persistence. The term “*quasispecies*” refers to a group of different but closely related genetic variants which evolve in response to environmental changes. The mechanisms generating genetic variability include point mutations, genetic rearrangements (recombination, reassortment) and post-replicative modifications. Genetic instability of RNA viruses is a source of serious clinical implications such as immune evasion, resistance to antiviral drugs and increase of virulence due to alterations in cell tropism, host range and gene expression patterns. For these reasons, effective and safe vaccines as well as the development of more tolerable drugs is still a challenge. The best known *quasispecies* representatives are *human immunodeficiency virus* (HIV), *influenza virus* and *hepatitis C virus* (HCV).

1. Introduction. 2. *quasispecies* phenomenon. 2.1. Diversity mechanisms. 3. Clinical implications of the *quasispecies* phenomenon. 3.1. Immune evasion. 3.2. Resistance to antiviral drugs. 3.3. Increase of virulence, alterations in cell tropism. 3.4. Antiviral vaccines. 4. Research techniques. 5. Summary

Słowa kluczowe: wirusy RNA, zmienność genetyczna, *quasispecies*

Key words: RNA viruses, genetic diversity, *quasispecies*

1. Wstęp

Wirusy stanowią liczną, niezwykle różnorodną grupę patogenów zakażających wszystkie organizmy żywe: ludzi, zwierzęta oraz rośliny [1]. Stanowią czynnik etiologiczny wielu chorób o zróżnicowanym przebiegu i objawach. Charakterystyczną cechą tych patogenów, głównie wirusów RNA jest niestabilność genetyczna, umożliwiającą wytworzenie mutantów o nowych cechach i właściwościach. Wykazano, iż patogeny te tworzą heterogenną populację złożoną z zróżnicowanych wariantów obecnych w zakażonym organizmie tzw. pseudotypów (*quasispecies*) [2–5]. Do najlepiej poznanych wirusów RNA charakteryzujących się dużą zmiennością należą wirus zapalenia wątroby typu C (HCV), wirus niedoboru odporności (HIV) i wirus grypy [2–7].

Wykazano zależność pomiędzy różnymi formami *quasispecies*, a poważnymi konsekwencjami klinicznymi wywołanymi przez te wirusy. Obejmuje ona wyselekcjonowanie mutantów unikających odpowiedzi układu immunologicznego, „nieuchwytnych” dla potencjalnych szczepionek, zmieniających tropizm komórkowy, zasięg gospodarza, poziom wirulencji czy też

opornych na leczenie [7–9]. „Ucieczka” wirusa przed humoralną i komórkową odpowiedzią obronną organizmu stanowi jeden z głównych mechanizmów prowadzący do przechodzenia zakażeń w stan przewlekły (HCV, HIV) [10]. Częstość pojawiania się form opornych na stosowane leki wymusiła modyfikację standardów leczenia i wprowadzenia terapii skojarzonej, złożonej z dwóch (HCV) [11], trzech lub większej ilości leków, np. terapia HAART prowadzona w zakażeniach HIV [12]. Niezbędne stało się również opracowywanie nowych preparatów mogących znaleźć zastosowanie w terapii, gdyż długotrwałe przyjmowanie tych samych leków prowadzi do narastania oporności. Wykazano także, istnienie zróżnicowania genetycznego szczepów wirusowych replikujących w różnych narządach i tkankach tego samego pacjenta, wskazując na zmianę tropizmu komórkowego, np. HCV, HIV, wirus świnki [10–14].

2. Zjawisko *quasispecies*

Zjawisko *quasispecies* definiowane jest jako zbiór blisko spokrewnionych ale różnych wariantów molekularnych obecnych w pojedynczym zakażonym organizmie [4].

* Autor korespondencyjny: Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Pawińskiego 3c 02-106 Warszawa; tel. (22) 57 20 709, e-mail: immunopa@amwaw.edu.pl

Po raz pierwszy zjawisko zmienności przedstawione zostało w 1971 roku przez M a n f r e d a E i g e n a [15]. Wysłunięta przez niego teoria, nazwana później przez S c h u s t e r a terminem *quasispecies*, dotyczyła grupy „samoreplikujących” się, blisko spokrewnionych lecz różniących się między sobą cząstek, ewoluujących wobec zmieniających się warunków środowiska [16].

Wykazano, iż sformułowaną przez E i g e n a teorię można odnieść do zjawisk zachodzących w ewolucji m. in. faga Q β [17] oraz wirusów RNA [18]. Spełniają one bowiem większość założeń teorii *quasispecies* takich jak odpowiednia: wielkość populacji (wystarczająco duża aby móc zdominować zajmowaną przestrzeń) oraz częstotliwość mutacji (wystarczająco wysoka aby wygenerować heterogenną populację mutantów o stale zachowanej podstawowej sekwencji) [19]. Bardziej trafne wydaje się natomiast ujęcie genomu wirusów RNA jako pewien zbiór zróżnicowanych i specyficznych a nie pojedynczych sekwencji [17].

Poziom zróżnicowania wirusowych form *quasispecies* zależy od częstości zachodzących w genomie mutacji jak również od różnych czynników wewnętrznych (charakter wprowadzanych mutacji oraz oddziaływania pomiędzy różnymi składowymi populacji) i zewnętrznych (presja środowiska) kształtujących populację [20]. W wyniku zmienności powstają więc stale nowe formy *quasispecies* podlegające ciągłym procesom selekcji oraz współzawodnictwa. Ogromna liczebność populacji wirusów RNA, wysoka produktywność, przy również stosunkowo niedużej wielkości i plastyczności genomu oraz nieprecyzyjność replikacji sprawia, iż kształtowanie populacji tych patogenów przebiega bardzo dynamicznie, a utrzymująca się równowaga pomiędzy poszczególnymi wariantami jest krótkotrwała [21].

Wprowadzane w materiale genetycznym modyfikacje mogą zarówno wzmacniać dany wariant wirusowy oraz zwiększać tempo jego replikacji (selekcja pozytywna) jak również zredukować genetyczny polimorfizm poprzez wykluczenie jakiegoś wariantu z populacji (selekcja negatywna) [22, 23].

Wykazano także istnienie skomplikowanych zależności pomiędzy koegzystującymi w jednym organizmie formami wirusa. W efekcie zachodzących oddziaływań pomiędzy poszczególnymi pseudotypami, na drodze konkurencji dochodzi do przetrwania wariantu dominującego, eliminacji natomiast ulegają głównie szczepy dzikie [24].

Populację form *quasispecies* cechuje również „molekularna pamięć”. Warianty wirusa, które nie uległy eliminacji, mogą utrzymywać się w organizmie na niskim, niewykrywalnym poziomie przez wiele generacji, pomimo braku presji selekcyjnej, a następnie w sprzyjających dla nich warunkach ujawniać się [25].

W praktyce złożoność wariantów *quasispecies* określana jest przez wiele, skomplikowanych parametrów

genetycznych, określających zarówno różnice sekwencji jak też liczbę istniejących typów wirusa. W różnych pracach badacze wykorzystują różne zmienne takie jak dystans genetyczny [26], częstość mutacji [27], entropia S h a n n o n ' a [28], dystans H i m m i n g ' a [29] oraz wiele innych parametrów. Wybór odpowiedniej zmiennej zależy od technik wykorzystanych w celu wykrycia i analizy zmienionych sekwencji.

2.1. Mechanizmy powstawania zmienności

Podstawowym mechanizmem warunkującym powstawanie nowych form *quasispecies* jest zmienność genetyczna. W obrębie genomów wirusowych można wyróżnić dwa podstawowe rodzaje modyfikacji – zmienność mutacyjną oraz rearanżację [2, 3]. Na częstotliwość mutacji wpływają również czynniki zewnętrzne środowiska, w którym znajdują się patogeny.

Z m i e n n o ś ć m u t a c y j n a

Pojawiające się w genomie wirusów mutacje, w zależności od rodzaju zachodzących zmian można podzielić na trzy zasadnicze grupy: mutacje punktowe, delecje oraz insercje [30]. Dotyczą one odpowiednio pojedynczych nukleotydów jak też większej liczby zasad. Mogą występować w każdym miejscu genomu zarówno w obrębie sekwencji kodujących jak też niekodujących lecz odgrywających ważną rolę regulatorową (np. sekwencje promotorowe), zmieniając właściwości biologiczne powstających produktów.

Podstawowym, naturalnym czynnikiem warunkującym powstawanie mutacji są błędy wynikające z nieprecyzyjnej replikacji kwasu nukleinowego przez zależną od RNA polimerazę RNA. W przeciwieństwie od replikaz eukariotycznych, powielających DNA, polimerazy wielu wirusów nie posiadają zdolności naprawy błędów powstających podczas syntezy potomnych nici RNA [31]. Na podstawie badań *in vitro* oszacowano, iż częstość mutacji generowanych w pojedynczym genomie przez polimerazy RNA wynosi około 10^{-4} – 10^{-5} zasad na cykl replikacyjny [2,3]. Uwzględniając zatem częstość popełnianych błędów przez replikazy RNA oraz tempo namnażania i długość genomu wirusa można wyliczyć, iż np. w przypadku HCV wymiana nukleotydów, tworzących genom wirusa, może następować 10^7 – 10^8 razy w ciągu 24 godzin [6]. Częstość mutacji w obrębie genomu wirusowego jest zróżnicowana i może osiągać różne wartości dla poszczególnych genów, i tak np. w genomie HIV, gen *env* trzykrotnie częściej ulega modyfikacjom niż gen *pol* [30]. Również w obrębie pojedynczego genu rozkład mutacji nie jest równomierny. Niektóre fragmenty ulegają modyfikacjom częściej od innych, np. w genie *env* zmianom podlega 80% sekwencji przy czym 10% stanowią bardzo niestabilne regiony określane „hypervariable”, pozostawiając

stała część genu (20%) prezentuje obszary bardziej stabilne [30]. Wprowadzenie zmian w obrębie stałych sekwencji może prowadzić do destabilizacji lub utraty funkcji kodowanych białek, dlatego mutacje w takich regionach są stosunkowo rzadkie i z reguły nie tolerowane, a tworzący się wariant wirusa jest eliminowany.

Innym źródłem mutacji punktowych w genomie wirusowym jest mutagenеза niereplikacyjna [2, 9]. W porównaniu do zmienności generowanej przez polimerazę RNA jest to proces znacznie mniej wydajny i zależny od mechanizmu komórkowego gospodarza. Niektóre enzymy eukariotyczne posiadają właściwość edycji RNA, polegającą na wymianie nukleotydów (deaminaza ADAR) lub zmianie długości docelowej sekwencji poprzez insercje/delecje. Proces ten jest jednym z mechanizmów obronnych organizmu przed czynnikami zakaźnymi [32]. Uczestniczy m.in. w różnicowaniu genów regionów zmiennych przeciwciał [33] jak również w regulacji przebiegu zakażenia HIV-1, poprzez wprowadzenie licznych defektywnych mutacji wirusa [2]. Wykazano również, iż proces edycji wirusowego genomowego RNA sprzyja także tworzeniu nowych form *quasispecies*. Najczęstszą modyfikacją genomu wirusów jest deaminacja adenozyiny przy udziale enzymu ADAR, prowadząca do wymiany adeniny na guaninę (substytucja A → G). Wymianie może ulec do 50% A obecnych w całym genomie [3]. Pojedyncze mutacje w kluczowych sekwencjach nukleotydowych mogą prowadzić do zmiany właściwości patogenów. Wprowadzenie zmiany A → G w kodonie stop (UAG) w genomie wirusa zapalenia wątroby typu D (HDV) umożliwiło mu syntezę dodatkowego, nowego białka [34]. W porównaniu ze szczepem wyjściowym zmodyfikowane warianty wirusa wytwarzają dwa rodzaje białek: wyjściową krótszą formę niezbędną do replikacji oraz dłuższą, nową biorącą udział w pakowaniu cząstek wirusowych [35].

Rearanżacja RNA – rekombinacja

Drugim, szeroko rozpowszechnionym, mechanizmem warunkującym zmienność genomów wirusowych jest rearanżacja. Wyróżnić można cztery podstawowe typy rekombinacji: homologiczną, umiejscowioną (niehomologiczną), replikacyjną i niereplikacyjną [2].

Zjawisko rekombinacji występuje u wielu grup wirusów RNA, zarówno u wirusów ludzkich, np. picornawirusów [36], koronawirusów i retrowirusów [3], jak również u wirusów zwierzęcych [37], roślinnych [38] oraz bakteryjnych [39]. Zdarzenia rekombinacyjne zachodzące u wirusów RNA w większości przypadków mają charakter rekombinacji niehomologicznej. Częstość rekombinacji homologicznej natomiast zależy od typu wirusa i najczęściej występuje u koronawirusów, rzadziej w przypadku pikornawirusów czy alfawirusów [30].

Rekombinanty wirusowe mogą powstawać w wyniku wymiany fragmentu genomu w obrębie tego samego wirusa [40], między różnymi szczepami wirusowymi [41] oraz pomiędzy wirusem a materiałem genetycznym komórki gospodarza [42]. W efekcie przetasowania sekwencji genomowych powstają potomne cząstki wirusowe zawierające informację genetyczną w innej kombinacji niż wyjściowy wariant wirusa. Częstość takiej wymiany jest różna u różnych rodzajów wirusów. W przypadku, wirusa polio podczas rekombinacji homologicznej osiąga wartość nawet 0,9% na cykl replikacyjny natomiast w przypadku krzyżówek pomiędzy różnymi typami wirusa polio spada osiągając wartość 1×10^{-4} rekombinantów względem form macierzystych [1].

Zjawisko rekombinacji zachodzące u wirusów RNA jest jednym z głównych czynników decydujących o ich zmienności. Szczególnie niebezpieczna jest wymiana materiału genetycznego pomiędzy genomem wirusa a materiałem genetycznym gospodarza. Powstające rekombinanty charakteryzują się często zwiększoną patogennością oraz zmienionym tropizmem względem szczepu wyjściowego, mogą też modyfikować przebieg immunologicznej gospodarza [3, 30].

Wpływ czynników zewnętrznych na częstotliwość mutacji

Wysoka wydajność mutacji charakteryzująca wirusy RNA nie jest jedynym czynnikiem przyczyniającym się do gwałtownej ewolucji tych patogenów. Duże znaczenie w tworzeniu form *quasispecies* odgrywa także presja środowiska, m.in. odpowiedź ze strony układu immunologicznego gospodarza czy też przyjmowanie leków. Najnowsze badania, przeprowadzone na modelach zwierzęcych, wskazują także na związek pomiędzy odżywianiem a zwiększoną wirulencją wirusów [43]. Zaobserwowano, zależność pomiędzy niedoborem selenu oraz witaminy K u myszy, a zmianą tropizmu jak również zwiększoną wirulencją oraz wiremią wirusa coxsackie B3 [43]. Dokładny mechanizm zmiany patogenności wirusa nie został jednak określony. Prawdopodobnie niedobór selenu, jak również witaminy E obniża odpowiedź układu immunologicznego lub sprzyja wprowadzaniu mutacji podczas replikacji RNA [44].

3. Konsekwencje kliniczne zjawiska *quasispecies*

Zmienność genetyczna wirusów RNA stanowi podstawowe źródło poważnych następstw klinicznych. Zdolność adaptacji patogenów do niekorzystnych warunków środowiska umożliwiła wirusom wykształcenie mechanizmów umożliwiających „ucieczkę” przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza jak również oporność na leki. Długotrwałe działanie presji

selekcyjnej ze strony układu immunologicznego i wdrożonej terapii często jest przyczyną powstawania wariantów najlepiej przystosowanych, „nieuchwytnych” dla układu immunologicznego oraz opornych na leczenie [2, 3, 8–10, 12, 45]. Znaczącą rolę w szybkiej adaptacji do nowych warunków odgrywa pamięć molekularna charakterystyczna dla powstających form *quasispecies* [25].

3.1. Unikanie odpowiedzi układu immunologicznego

Liczne doniesienia wskazują na związek między powstawaniem wariantów molekularnych wirusów (*quasispecies*), a unikaniem odpowiedzi immunologicznej [2, 10, 46]. Duża częstotliwość mutacji, ich lokalizacja w specyficznych miejscach genomu stymulowana presją ze strony układu immunologicznego, jak również szybkie tempo replikacji patogenu prowadzi do wykształcenia wirusowych form *quasispecies* nierozpoznawalnych dla wytwarzanych przeciwciał neutralizujących oraz limfocytów T cytotoksycznych i pomocniczych.

Odpowiedź humoralna

W wyniku zakażenia, w organizmie pacjenta pojawia się szerokie spektrum przeciwciał rozpoznających epitopy zarówno strukturalnych jak też niestrukturalnych elementów wirusa [46]. Jednak ich obecność w przypadku zakażenia wirusami RNA ma raczej wartość diagnostyczną, nie świadczy natomiast o eliminacji zakażenia. Ze względu na liczne mutacje w obrębie epitopów stale powstają nowe warianty wirusa nierozpoznawalne przez przeciwciała. W przypadku HCV wykazano, iż u pacjentów immunokompetentnych, zmiana aminokwasów w epitopach, zlokalizowanych w obrębie regionu o zwiększonej zmienności (HVR1), może następować 0,5 do 2 razy w ciągu miesiąca. Częstotliwość mutacji HCV może ulegać zmianie w zależności od stadium choroby, przy czym jej znaczący wzrost zaobserwowano w fazie początkowej choroby [47].

Uważa się, że występowanie wirusowych *quasispecies* unikających odpowiedzi humoralnej organizmu jest jedną z głównych przyczyną rozwoju przewlekłej postaci zakażenia [10]. Pojawiające się w trakcie zakażenia przeciwciała nie stanowią skutecznej obrony przed kolejną ekspozycją na ten sam patogen (doświadczenia kliniczne wykazały m.in. możliwość reinfekcji lub superinfekcji innym izolatem wirusa) [48].

Liczne doniesienia wskazują, iż ciągła zmienność patogenu i przewlekłe pobudzanie limfocytów B do proliferacji oraz produkcji przeciwciał, może być przyczyną szeregu zaburzeń, np. w zakażenia HCV towarzyszą zaburzenia hematologiczne, np. gammatie mono-klonalne oraz chłoniaki z komórek B o nis-

kiej złośliwości [49, 50]. Obserwowano także liczne patologie, takie jak krioglobulinemia typu 2, kłębuszkowe zapalenie nerek, zapalenie naczyń czy zapalenie stawów [51–53].

Odpowiedź komórkowa

Podobnie jak w przypadku odpowiedzi humoralnej, powstające nowe warianty molekularne wirusa mogą także „uniknąć” odpowiedzi komórkowej [46].

Aktywacja puli limfocytów T przebiega w wyniku rozpoznawania i łączenia się komórek z antygenami wirusa prezentowanymi w kontekście cząsteczek MHC klasy I i II. Wykazano, iż podstawowe znaczenie w eliminacji zakażonych komórek odgrywa złożoność odpowiedzi limfocytów CD8+. Białka wirusa prezentowane na powierzchni zakażonych komórek przez MHC klasy I stanowią główny mechanizm aktywacji limfocytów cytotoksycznych [10].

Aktywność cytotoksyczna limfocytów skierowana przeciwko kilku epitopom wirusa sprzyja powstawaniu jego nowych wariantów i przechodzenia zakażenia w stan przewlekły. Natomiast rozpoznawanie szerokiego spektrum prezentowanych epitopów na wczesnym etapie zakażenia umożliwia eliminację patogenów [54]. Ucieczka „nowych” wariantów wirusa przed komórkami CD8+ wynika przede wszystkim ze zmian pojawiających się w rozpoznawanych przez układ immunologiczny epitopach. Modyfikacje sekwencji aminokwasowych prezentowanych peptydów wirusowych mogą w sposób pośredni lub bezpośredni hamować ich prezentację w kontekście MHC klasy I. Niektóre zmiany ograniczają lub całkowicie znoszą powinowactwo epitopów do cząsteczek MHC. W innych przypadkach zaburzeniu ulega ścieżka przetwarzania białek wirusowych, w konsekwencji obniżając prawdopodobieństwo utworzenia funkcjonalnego kompleksu peptyd-MHC rozpoznawanego przez receptor zlokalizowany na limfocytach T (TCR). Zaobserwowano także negatywną zależność pomiędzy zmienionymi epitopami a odpowiedzią limfocytów w stosunku do formy „pierwotnej” peptydów, stale prezentowanych na powierzchni zakażonych komórek. Synteza zmodyfikowanego białka przez nowy wariant wirusa może zabezpieczać zakażoną komórkę przed zniszczeniem, poprzez znoszenie aktywacji limfocytów CD8+ związanych z pierwotnym epitopem [55].

Limfocyty pomocnicze CD4+ uczestniczą w przekazywaniu sygnałów, pobudzających zarówno limfocyty B jak też cytotoksyczne limfocyty CD8+. Rozpoznają antygeny prezentowane z cząsteczkami MHC klasy II. „Ucieczka” patogenów przed komórkami CD4+ może następować w wyniku zmian w epitopach rozpoznawalnych przez te limfocyty dokładny mechanizm inaktywacji limfocytów pomocniczych podczas zakażenia nie został jednak poznany [56]. Wyniki do-

tychczasowych badań ukazują, że upośledzenie aktywności limfocytów CD4+ skorelowane jest z „ucieczką” wirusów przed przeciwciałami neutralizującymi oraz z obniżeniem reaktywności komórek CD8+ predysponując do przechodzenia zakażenia w stan przewlekły. Przypuszcza się, iż mechanizm ten umożliwia utrzymywanie się w organizmie takich patogenów jak HCV czy HIV [57].

Mechanizm pośredni unikania odpowiedzi układu immunologicznego

Inny mechanizm umożliwiający wirusom uniknięcie odpowiedzi układu immunologicznego polega na wnikaniu patogenu do wnętrza komórek odpornościowych. Np. specyficzne mutacje w sekwencjach nukleotydowych genomu HCV mogą prawdopodobnie umożliwić wirusowi ucieczkę przed odpowiedzią immunologiczną poprzez zakażenie makrofagów i limfocytów [22, 58]. Liczne doniesienia wskazują na zróżnicowanie szczepów *quasispecies* zlokalizowanych w surowicy i komórkach immunologicznych. Wykazano m.in. zmniejszoną złożoność oraz zmienność form *quasispecies* obecnych w leukocytach [58], spowodowane prawdopodobnie obniżoną replikacją oraz selekcją jednego dominującego wariantu o specyficznym tropizmie komórkowym [59].

3.2. Oporność na leki

W leczeniu chorób wirusowych wykorzystuje się leki działające na różnych etapach cyklu życiowego wirusa, zapobiegające min.: adhezji i wnikaniu wirusa do komórek gospodarza, włączaniu materiału genetycznego wirusa do genomu gospodarza, transkrypcji i syntezy białek wirusowych oraz uwalnianiu wirusa z komórki gospodarza. W zależności od złożoności cyklu życiowego wirusa, tempa mutacji i sposobu replikacji dostępne są różne preparaty lecznicze. W przypadku HIV dotychczas dopuszczono do użytku 29 różnych leków [12] podczas gdy w terapii pacjentów zakażonych HCV rutynowo stosuje się obecnie połączenie pegylowanego interferonu z nukleozydowym analogiem rybawiryną [11]. Na podstawie licznych badań nad skutecznością stosowanych terapeutyków wykazano, iż jednoczesne stosowanie kilku leków tzw. terapia skojarzona prowadzi do szybszej eradykacji lub spowolnienia tempa replikacji wirusa, co wpływa na skrócenie czasu osiągnięcia efektu terapeutycznego oraz zmniejszenie prawdopodobieństwa wyselekcjonowania form opornych na stosowane preparaty [5].

Wykazano iż zmienność wirusów RNA ściśle koreluje z niewrażliwością tych patogenów na stosowaną terapię przeciwwirusową [6, 11, 12, 60, 61]. Presja selekcyjna prowadzonej terapii prowadzi do wyodrębnienia szczepów opornych, replikujących w obecności

podawanych leków [11]. Tempo selekcji opornych form *quasispecies* jest różne dla poszczególnych wirusów i zależy min. od transmisji wirusa oraz przebiegu cyklu replikacyjnego [6, 55]. Zidentyfikowano szereg mutacji w sekwencji nukleotydowej genomów wirusów powiązanych z opornością tych patogenów na konkretne substancje czynne [11, 12]. Liczba mutacji w pojedynczym genie niezbędnych do wytworzenia oporności na dany lek jest zróżnicowana, np. stosowane w leczeniu pacjentów zakażonych HIV inhibitory proteaz, przestają eliminować warianty wirusowe z kilkoma mutacjami w genie kodującym proteazę [62]. W przypadku nukleozydowych (lamivudine) i nienukleozydowych (efawirenz) inhibitorów odwrotnej transkryptazy, brak wrażliwości patogenów na te preparaty następuje już w wyniku pojedynczej zmiany aminokwasowej w białku docelowym [63]. W trakcie leczenia często dochodzi do wykształcenia u wirusów oporności krzyżowej, pomimo prowadzonej terapii skojarzonej. Powstające wirusowe formy *quasispecies* niewrażliwe na pojedynczy preparat mogą wykazywać oporność na inne, nie stosowane dotąd leki. Oporność może dotyczyć zarówno leków z tej samej grupy, (np. oporność HIV na nienukleozydowy inhibitor odwrotnej transkryptazy, nevirapine, powoduje brak wrażliwości patogenu na delaviridine i efawirenz) [12]. Proces ten może utrudnić a nawet uniemożliwić zmianę schematu leczenia na bardziej optymalny. Z tego względu największe prawdopodobieństwo na pozytywny efekt leczenia można uzyskać po zastosowaniu zestawu leków przyjmowanych przez pacjenta po raz pierwszy, w trakcie rozpoczęcia leczenia [12]. Powinny być to zatem leki o silnym działaniu. Zahamowanie replikacji wirusa zmniejsza bowiem szanse na wyselekcjonowanie wariantów opornych na podawane preparaty, wymuszając tym samym zmianę strategii leczenia. Równie istotnym zagadnieniem jest regularne przyjmowanie leków przez pacjentów oraz „nie nadkażanie się” nowym szczepem wirusa. W celu zachowania przez pacjentów ciągłości leczenia dąży się do uproszczenia stosowanych schematów terapeutycznych poprzez m.in. ograniczenie dawek oraz ilości przyjmowanych leków (leki skojarzone) jak również minimalizację efektów ubocznych prowadzonej terapii.

Badania nad zjawiskiem *quasispecies* HCV, a lekoopornością wirusa wykazały także możliwość korelacji pomiędzy zróżnicowaniem populacji wirusowej a wynikiem terapii [60, 61, 64]. Dotychczas nie stwierdzono jednoznacznie czy zwiększona zmienność populacji jest pozytywnym czy negatywnym wyznacznikiem skuteczności wdrażanego leczenia. Wyniki badań niektórych zespołów wskazują, iż duża zmienność populacji zakażającego HCV predysponuje do wytworzenia puli wirusów opornych i w konsekwencji do nieskuteczności prowadzonej terapii. Natomiast

w przypadku populacji HCV relatywnie homogennej skuteczność eliminacji patogenu wzrasta, zwiększając tym samym szanse na wyleczenie [61]. F a r c i i wsp. wykazali natomiast zależność pomiędzy trwałą odpowiedzią wirusologiczną (SVR), a zmiennością wirusa w trakcie trwania leczenia, a nie przed jego rozpoczęciem [60]. Stwierdzono, iż redukcja zmienności HCV wyłącznie w 2 tygodniu przyjmowania interferonu i rybawiryny sprzyja eliminacji patogenu, sugerując zatem pozytywny efekt leczenia. Analogiczne zależności zaobserwowano również u pacjentów w ostrej fazie zakażenia. Wykazano bowiem, iż obniżenie zmienności HCV u tych pacjentów występuje tuż przed eliminacją wirusa, natomiast zwiększenie heterogenności populacji patogenu towarzyszy przechodzeniu zakażenia w formę przewlekłą [64].

Niektórzy badacze przychylają się zatem do tezy, iż złożoność populacji *quasispecies* wirusa/HCV można przyjąć jako zmienną umożliwiającą przewidywanie skuteczności leczenia.

3.3. Wzrost wirulencji, zmiana tropizmu

Zjawisko *quasispecies* prowadzi prawdopodobnie również do selekcji nowych patogennych wirusów jak również wirusów o zwiększonej wirulencji [2, 9, 10, 65, 66].

W procesie zakażenia komórek gospodarza wirusy wykorzystują receptory i koreceptory występujące na powierzchni komórek docelowych. Modyfikacje struktur powierzchniowych patogenów mogą prowadzić do zmian w specyficzności rozpoznawanych receptorów, przyczyniając się tym samym do zmiany tropizmu komórkowego patogenów [66]. Wykryto i opisano tego typu zjawiska w przypadku wirusów RNA, czemu sprzyja wspomniana wcześniej ich ogromna zmienność [2–5]. W przypadku zakażenia wirusem odry istnieje opinia, iż niektóre pojawiające się formy *quasispecies* wykazują zwiększoną wirulencję w wyniku nabycia zdolności do zakażenia komórek centralnego układu nerwowego, prowadząc w konsekwencji do rozwoju podostrego stwardniającego zapalenia mózgu (SSPE) [14].

Z kolei specyficzne mutacje w sekwencji wirusa limfocytowego zapalenia opon mózgowych mogą stanowić podstawę wirusowego tropizmu do neuronów lub komórek układu immunologicznego [67].

Wykazano także zróżnicowanie genetyczne szczepów wirusowych zakażających różne narządy u pojedynczego pacjenta. Dotyczy to m.in. HCV i HIV [13, 58]. U pacjentów zakażonych HCV wyselekcjonowano warianty molekularne wirusa różniące się od wariantów hepatotropowych, cechujące się zdolnością do zakażenia makrofagów/monocytów [68], limfocytów

[22, 69], komórek ośrodkowego układu nerwowego (takie jak mikroglej, astrocyty) [58, 70].

Wydaje się, iż szczególne znaczenie w determinacji tropizmu HCV względem komórek gospodarza, odgrywa sekwencja IRES zlokalizowana w obrębie regionu 5'UTR genomu wirusa [58]. Przeprowadzone badania wykazały obecność specyficznych mutacji, o charakterze substytucji, w obrębie sekwencji IRES u wariantów izolowanych z PBMC [69], komórek dendrytycznych czy też komórek ośrodkowego układu nerwowego [58].

Największe i najpoważniejsze w skutkach pod względem klinicznym zmiany w genomie wirusów zachodzą w wyniku zjawisk rekombinacyjnych. Wymiana materiału genetycznego pomiędzy patogenami może prowadzić do przełamania bariery gatunkowej i powstawania nowych jednostek chorobowych. Wśród nowo wykrytych wirusów RNA, które przełamały barierę gatunkową można wymienić: HIV, hantawirusy, wirusy wywołujące gorączki krwotoczne, arbowirusy, wirus Nipah oraz Hendra, wirus ptasiej grypy (AI) jak również należący do koronawirusów – wirus SARS (SARS-CoV) [21, 71–73].

Wirus grypy jest jednym z najlepiej poznanych patogenów odzwierzęcych charakteryzujących się ogromną zmiennością. Zmienność antygenowa wirusa grypy wynika z przesunięcia (drift) lub skoku antygenowego (shift) w obrębie genów kodujących glikoproteiny powierzchniowe hemaglutyninę (HA) i neuraminidazę (NA) [65, 74]. Przesunięcie antygenowe polega na wprowadzeniu mutacji punktowych w sekwencjach docelowych H i N w konsekwencji czego powstają nowe szczepy patogenu. Zjawisko skoku antygenowego, zachodzące pomiędzy wirusami grypy, stanowi natomiast główną przyczynę pandemii grypy [65]. Reasortacja materiału genetycznego wirusa grypy ludzkiej i zwierzęcej, przyczyniła się bowiem do powstania nowych podtypów wirusa, np. H2N2, H3N2, zawierających pojedyncze, jak również w kombinacji nowe segmenty genu hemaglutyniny i neuraminidazy [74].

3.4. Szczepionki przeciwwirusowe

Wprowadzenie masowych szczepień umożliwiło zupełną eliminację niektórych patogenów (wirus ospy prawdziwej) jak również zmniejszenie częstotliwości zakażeń (wirus polio) oraz kontrolę zachorowań (rózyczka, kleszczowe zapalenie mózgu czy też HBV).

Obecnie dostępne szczepionki konwencjonalne można podzielić na trzy podstawowe grupy – zawierające zabite cząstki wirusowe lub żywe atenuowane wirusy oraz szczepionki podjednostkowe [3]. Na etapie badań klinicznych znajduje się również kilka szczepionek DNA – przeciwko grypie, AIDS, zapaleniu wątroby typu B i opryszczce [75–78]. Pomimo bardzo dużej skuteczności stosowanych szczepień, sięgającej

100% w przypadku wirusa polio czy ospy, nadal nie ma efektywnych szczepionek przeciwko niektórym patogenom, głównie wirusom RNA takim jak HIV czy HCV [3, 79]. Trudności w konstrukcji szczepionek przeciwko tym patogenom wynikają z ogromnej zmienności ich materiału genetycznego/genomu. Powstające w trakcie zakażenia nowe formy białek wirusowych, stanowiących główny cel przeciwciał neutralizujących, uniemożliwiają wytworzenie skutecznej czynnej odpowiedzi humoralnej organizmu [10].

W przypadku wirusa zapalenia wątroby typu C o genotypie 1, epitopy dla immunoglobulin zlokalizowane są w obrębie aż dwóch regionów „hipervariable” – HVR1 oraz HVR2 [80] glikoproteiny E2. Ogromne zróżnicowanie wytwarzanych form białkowych wirusa sprawia, iż odpowiedź immunologiczna nie jest efektywna, a utrzymujące się w surowicy przeciwciała anti-HCV nie zabezpieczają przed ponownym zakażeniem tym patogenem [48]. Z tego względu odtworzenie, metodami inżynierii genetycznej, struktury immunogennych epitopów HCV, skutecznie uodporniających na zakażenie i mogących znaleźć zastosowanie w szczepieniach jak dotąd nie jest możliwe (nie da się bowiem przewidzieć jakiego typu zmiany i o jakim charakterze pojawią się w wyselekcjonowanych wariantach) [80].

Odmierna sytuacja występuje w przypadku wirusa grypy [74]. Wirus ten również charakteryzuje się dużą zmiennością antygenową. U ludzi jak dotąd zidentyfikowano trzy podtypy hemaglutyniny: H1, H2 i H3 oraz dwa podtypy neuraminidazy: N1 i N2. Są one szeroko rozpowszechnione w populacji i stanowią składowe różnych wariantów patogenu przeważających w różnych sezonach epidemicznych [76]. Z tego względu co roku typowane są trzy nowe szczepy wirusa, o różnych podtypach HA i NA, wchodzące w skład pojedynczej szczepionki. Stąd wynika konieczność powtarzania szczepień w każdym sezonie epidemicznym.

Plastyczność genomów wirusów oraz możliwość wymiany materiału genetycznego pomiędzy patogenami stanowi potencjalne zagrożenie podczas stosowania szczepionek zawierających atenuowane szczepy patogenów. Liczne doniesienia wskazują, iż atenuowane szczepy zawarte w szczepionkach mogą powracać do formy patogennej w wyniku wymiany materiału genetycznego ze szczepem dzikim wirusa. Tego typu rewertanty, które utraciły występującą w nich mutacje, stwierdzono w przypadku wirusa polio po zastosowaniu szczepionki Salka [81].

4. Techniki badawcze

Ze względu na powiązania pomiędzy wirulencją oraz podatnością wirusów na terapię z ich zmiennością (konkretnymi wariantami) niezbędne stało się

opracowanie optymalnych metod pozwalających na szybką i precyzyjną identyfikację pseudotypów wirusowych u pacjentów zakażonych.

Obecnie prowadzone badania mają na celu określenie sekwencji oraz różnic filogenetycznych wariantów *quasispecies* u pojedynczych pacjentów jak również pomiędzy poszczególnymi zakażonymi pacjentami.

Zastosowanie technik biologii molekularnej w tym klonowania i sekwencjonowania, poprzedzone wstępną selekcją, umożliwia identyfikację różnic między badanymi wariantami wirusowymi. W celu wyselekcjonowania zmienionych wariantów wirusowych, amplifikowanych z wykorzystaniem RT-PCR (**r**everse **t**ranscription – **p**olymerase **c**hain **r**eaction), stosuje się głównie metody elektroforetyczne. Podstawowe techniki przesiewowe obejmują: badanie zmian konformacji jednoniciowego DNA – SSCP (**s**ingle-stranded conformation **p**olymorphism) [47, 82, 83] oraz MSSCP (**m**ultitemperature single-stranded conformation **p**olymorphism) [83], analizę heterodupleksów czyli elektroforezę na żelach z gradientem temperatury – TGGE (**t**emperature **g**radient **g**el electrophoresis) [84], czynnika denaturującego – DGGE (**d**enaturing **g**radient **g**el electrophoresis) oraz GSA (**g**el-shift analysis) [85].

Obecnie najczęściej stosowaną techniką jest SSCP. Metoda ta umożliwia separację jednoniciowych produktów PCR, pozwalając na wykrycie nawet jednonukleotydowych polimorfizmów oraz mutacji punktowych [83]. Rozdział elektroforetyczny prowadzony jest w warunkach natywnych z uwzględnieniem specyficznych parametrów fizykochemicznych, takich jak siła jonowa, pH oraz temperatura [83]. Różnice w tempie migracji, podstawowych oraz zmutowanych pojedynczych nici DNA wynikają ze zmian w strukturze drugorzędowej badanych sekwencji. Metoda SSCP pozwala na wykrycie ok. 80% mutacji w analizowanych produktach PCR o długości ok. 200–300 pz. W przypadku dłuższych sekwencji wydajność znacznie spada [86]. Czulość detekcji form *quasispecies* tą metodą jest wysoka. Umożliwia m.in. wykrycie wszystkich głównych wariantów HCV reprezentujących co najmniej 3% całej populacji wirusa różniących się między sobą pojedynczym nukleotydem [47]. Prowadzone badania nad efektywnością rozdziału wykazały, iż kilkrotna zmiana temperatury podczas przeprowadzanej elektroforezy zwiększa prawdopodobieństwo selekcji dwóch bardzo podobnych izoform ssDNA [83]. Z tego względu zaproponowano nową metodę MSSCP, będącą modyfikacją techniki SSCP, umożliwiającą badanie zmian konformacji jednoniciowego DNA przy zmieniających się warunkach temperaturowych [83].

Modyfikacje sekwencji genomów wirusowych można także wykrywać poprzez analizę migracji heterodupleksów z zastosowaniem technik TGGE, DGGE

oraz GSA. W metodach tych analizie podlegają kompleksy DNA, generowane podczas reakcji PCR, utworzone z pojedynczych nici, pochodzących od szczepu dzikiego (o znanej sekwencji) oraz badanych potencjalnych mutantów. Heterodupleksy, zawierające miejsca niesparowane, ze zmianą przynajmniej pojedynczego nukleotydu wykazują znacznie mniejszą stabilność oraz ruchliwość w porównaniu ze strukturami utworzonymi z dwóch komplementarnych nici (tzw. homodupleksów). W trakcie elektroforezy TGGE oraz DGGE, rozdział prowadzony jest w warunkach denaturujących odpowiednio przy wzrastającej temperaturze lub zwiększającym się stężeniu związków denaturujących, np. mocznika. W zależności od stabilności kompleksów, dwuniciowe fragmenty DNA ulegają rozdzieleniu na pojedyncze nici. Tempo migracji w żelu jednoniciowego DNA znacznie spada powodując wyraźne spowolnienie przemieszczania się DNA. Metody te cechuje wysoka czułość wykrywania mutacji dochodząca do 90% [87]. Również analiza tempa migracji kompleksów DNA – metoda GSA, pozwala na bardzo wydajne, do 90%, wykrywanie zmutowanych form badanego DNA [88]. Przeprowadzany w warunkach natywnych rozdział heterodupleksów przebiega w odmiennym tempie w porównaniu do homodupleksów. Zatem zmiany w ruchliwości obydwu form stanowią czynnik identyfikujący pojawienie się wariantów *quasispecies* w badanej populacji.

Wymienione metody umożliwiają wykrycie obecności mutacji, lecz nie pozwalają na jakościowe określenie charakteru powstałych zmian. W tym celu niezbędne jest przeprowadzenie sekwencjonowania. Wyselekcjonowane fragmenty genomu wirusa klonuje się i tworzy reprezentacyjne biblioteki cDNA stanowiące rezerwar różnych wariantów genetycznych danego wirusa, pochodzące od pojedynczego pacjenta. Następnie przeprowadzenie sekwencjonowania umożliwia dokładne określenie różnic pomiędzy uzyskanymi klasami wirusa. Ostatnie badania nad zmiennością HCV wykazały, iż w celu uzyskania reprezentatywnych wyników, zawierających wszystkie warianty wirusa występujące w danej populacji należy przeanalizować minimum 40 kolonii [89]. Niestety wykrycie wszystkich form *quasispecies* występujących w danej populacji poprzez klonowanie stanowi nadal duży problem. Na sytuację tę wpływa kilka czynników. Przede wszystkim niektóre warianty molekularne klonują się z bardzo słabą wydajnością, pomimo ich znaczącej liczebności, przez co trudno je wyodrębnić w badanej populacji [47]. W trakcie reakcji PCR natomiast może dochodzić do selektywnej amplifikacji pewnych preferowanych sekwencji, jak również w przypadku wariantów mniej licznych, z każdym cyklem pogłębianą jest różnica ilościowa w odniesieniu do sekwencji dominujących. Dodatkowo polimerazy stosowane tradycyj-

nie w reakcji PCR nie posiadają właściwości edytor- skich z tego względu w analizowanej homogennej populacji można oznaczyć fałszywie różniące się sekwencje, wygenerowane przez amplifikujący enzym [92].

Wirusowe formy *quasispecies* tworzą heterogenną populację, w której najczęściej dominuje jeden wariant inne natomiast występują w znacznie mniejszej ilości. Z tego względu bardzo trudno wyodrębnić wszystkie formy wirusa występujące w próbce, wykorzystując dostępne obecnie techniki. Badając zatem zjawisko *quasispecies* należy uwzględnić ryzyko błędu wynikająca z pominięcia form mniej licznych oraz ograniczeń stosowanych metod [47, 89].

5. Podsumowanie

Zjawisko *quasispecies* uznawane jest za podstawowy czynnik warunkujący patogenność wirusów RNA. Duża liczebność populacji oraz częstotliwość mutacji zachodzących w genomie tych patogenów, poddawanych presji selekcyjnej, na różnych etapach zakażenia, stanowi podstawowy mechanizm kształtujący nowe warianty genetyczne wirusów o zróżnicowanych cechach fenotypowych.

Biologiczne następstwa zjawiska *quasispecies* stanowią obecnie najpoważniejszy problem kliniczny wszystkich zakażeń. Przejawiają się m.in. „ucieczką” przed naturalną odpowiedzią układu immunologicznego, uniemożliwiając wykształcenie skutecznej odpowiedzi humoralnej oraz komórkowej organizmu na zakażenie, jak również opornością wirusów na leki stosowane w trakcie terapii. Brak możliwości opracowania skutecznych oraz bezpiecznych szczepionek przeciwko niektórym wirusom RNA, np. HCV czy HIV również wynika z ogromnej zmienności antygenowej tych patogenów. Modyfikacja materiału genetycznego wirusów RNA stwarza możliwość zmiany tropizmu komórkowego, zasięgu gospodarza, ekspresji genów oraz wzrost wirulencji [8].

Zależności zachodzące pomiędzy różnymi wariantami genetycznymi wirusów są bardzo złożone, a ich dokładny przebieg jak dotąd nie jest poznany. Każda, dowolna populacja *quasispecies* może ulec w każdej chwili zmianie prowadząc do wyłonienia się wariantów lepiej przystosowanych do warunków środowiska. Stąd też nie jest możliwy do przewidzenia kierunek rozwoju wirusów oraz przebieg choroby, także szybkość jej rozwoju i skuteczność stosowanego leczenia. Z tego względu zjawisko *quasispecies* stale pozostaje przedmiotem intensywnych badań, znajdując się w sferze zainteresowań naukowców i lekarzy.

Pomimo stosowania coraz bardziej skutecznych nowych technik badawczych analiza zjawiska *quasispecies* nadal jest trudne. Obecne w danej populacji

warianty wirusowe występują bowiem w różnej liczebności. Współczesne, dostępne metody selekcyjne pozwalają na wykrycie wyłącznie form dominujących, występujących w znaczącej przewadze. Formy występujące w kilku kopiach ulegają pominięciu, pozostając poza granicą czułości metod.

Zjawisko *quasispecies* bardzo często cytowane jest w aspekcie ewolucji wirusów RNA. Obecnie coraz częściej pojawiają się doniesienia, w których kwestionuje się związek teorii *quasispecies* z ewolucją wirusów [90], zwracając uwagę na nadużywanie tego terminu w odniesieniu do każdej formy genetycznej heterogenności wewnątrz populacji wirusowej [19]. Niektórzy oponenty są zdania, iż wprowadzona teoria zmienności stanowi sprzeczność w stosunku do tradycyjnej genetyki populacyjnej [90]. W odpowiedzi na liczne zarzuty związane z nieodpowiednim stosowaniem terminu *quasispecies*, podjęto liczne badania nad tym zjawiskiem, mające na celu przełożenie jego teoretycznych założeń na zjawiska zachodzące w środowisku. Dotychczas uzyskane wyniki badań nie pozwoliły jak dotąd na jednoznaczne określenie istotności zjawiska *quasispecies* w odniesieniu do ewolucji wirusów RNA [19, 90, 91]. Niewątpliwie jednak ogromna zmienność wirusów RNA wynikająca z plastyczności ich materiału genetycznego oraz znaczącej wielkości populacji wirusowej [21], stanowi główne źródło wszelkich implikacji klinicznych związanych z zakażeniami tymi patogenami.

Piśmiennictwo

- Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E.: Fields' virology. Lippincott Williams & Wilkins, Ed 5. Philadelphia 2006.
- Domingo E., Gomez J.: Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res.* **127**, 131–150 (2007)
- Figlarowicz M., Alejska M., Kurzyńska-Kokorniak A., Figlarowicz M.: Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med. Res. Rev.* **23**, 488–518 (2003)
- Domingo E.: Quasispecies Theory in Virology. *J. Virol.* **76**, 463–465 (2002)
- Domingo E., Holland J.J.: Complication of RNA heterogeneity for the engineering of virus vaccines and antiviral agents. *Genet. Eng.* **14**, 13–31 (1992)
- Figlarowicz M., Formanowicz P., Kędziora P., Alejska M., Jackowiak P., Błażewicz J., Służewski W., Figlarowicz M.: Znaczenie kliniczne zmian w populacji HCV w pierwszych tygodniach leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C interferonem i rybawiryną. *Przegl. Epidemiol.* **59**, 581–590 (2005)
- Gomez J., Martell M., Quer J., Cabot B., Esteban J.I.: Hepatitis C viral quasispecies. *J. Viral. Hepatitis*, **6**, 3–16 (1999)
- Domingo E.: Quasispecies and the implications for virus persistence and escape. *Clin. Diagn. Virol.* **10**, 97–101 (1998)
- Domingo E.: Biological significance of viral quasispecies. *Viral Hepat. Rev.* **2**, 247–61 (1996)
- Nitkiewicz J.: Przewlekłe zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C – mechanizmy „ucieczki immunologicznej” wirusa. *Przegl. Epidemiol.* **58**, 423–33 (2004)
- Juan C., del Pilar Moreno M., Moratorio G.: Hepatitis C virus genetic variability in patients undergoing antiviral therapy. *Virus Res.* **127**, 185–194 (2007)
- XYZ Website 24 sierpień 2009 roku (online). <http://aidsinfo.nih.gov>.
- Richman D.D., Little S.J., Smith D.M., Wrinn T., Petropoulos C., Wong J.K.: HIV evolution and escape. *T. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **115**, 289–303 (2004)
- Steinhauer D.A., Holland J.J.: Rapid evolution of RNA viruses. *Annu. Rev. Microb.* **41**, 409–433 (1987)
- Eigen M.: Self organization of master and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften*, **58**, 465–523 (1972)
- Eigen M., McCaskill J., Schuster P.: The molecular quasispecies. (w) *Advances in Chemical Physics*. Vol. LXXV, red. I. Prigogine, S.S. Rice, Wiley, New York, 1989, s. 149–263
- Domingo E., Sabo D., Taniguchi T., Weissmann C.: Phage population. *Cell*, **13**, 735–744 (1978)
- Holland J.J., Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S., VandePol S.: Rapid evolution of RNA genomes. *Science*, **215**, 1577–1585 (1992)
- Jenkins G.M., Worobey M., Woelk C.H., Holmes E.C.: Evidence for the non-quasispecies evolution of RNA viruses. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 987–994 (2001)
- Drake J.W., Holland J.J.: Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1393–1398 (1999)
- Moya A., Holmes E.C., Gonzales-Candelas F.: The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Rev.* **2**, 279–287 (2004)
- Zignego A.L., Giannini C., Monti M., Gragnani L.: Hepatitis C virus lymphotropism: lessons from a decade of studies. *Digest. Liver. Dis.* **39**, 38–45 (2007)
- Ojosnegros S., Agudo R., Sierra M., Briones C., Sierra S., González-López C., Domingo E., Cristina J.: Topology of evolving, mutagenized viral populations: quasispecies expansion, compression, and operation of negative selection. *BMC Evol. Biol.* **8**, 1471–2148 (2008)
- Laskus T., Wang L., Radkowski M., Vargas H., Nowicki M., Wilkinson J., Rakela J.: Exposure of hepatitis C virus (HCV) RNA-positive recipients to HCV RNA-positive blood donors results in rapid predominance of single donor strain and exclusion and/or suppression of the recipient strain. *J. Virol.* **75**, 2059–2066 (2001)
- Ruiz-Jarabo C.M., Arias A., Baranowski E., Escarmis C., Domingo E.: Memory in Viral Quasispecies. *J. Virol.* **74**, 3543–3547 (2000)
- Alfonso V., Mbayed V.A., Sookoian S., Campos R.H.: Intra-host evolutionary dynamic of hepatitis C virus E2 in treated patients. *J. Gen. Virol.* **86**, 2781–2786 (2005)
- Mas A., Ulloa E., Bruguera M., Furcie I., Garriga D., Fabregas S., Andreu D., Saiz J.C., Diez J.: Hepatitis C virus population analysis of a single-source nosocomial outbreak reveals an inverse correlation between viral load and quasispecies complexity. *J. Gen. Virol.* **85**, 3619–3626 (2004)
- Laskus T., J. Rakela i wsp.: Analysis of hepatitis C virus quasispecies transmission and evolution in patients infected through blood transfusion. *Gastroenterology*, **127**, 764–776 (2004) (praca stanowi dzieło 11 autorów)
- Farci P., P.A. Tovo i wsp.: Evolution of hepatitis C viral quasispecies and hepatic injury in perinatally infected children followed prospectively. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8475–8480 (2006) (praca stanowi dzieło 12 autorów)

30. Piekarowicz A.: Podstawy wirusologii molekularnej. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 2004
31. Steinhauer D.A., Domingo E., Holland J.J.: Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, **122**, 281–288 (1992)
32. Sheehy A.M., Gaddis N.C., Choi J.D., Malim M.H.: Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, **418**, 646–650 (2002)
33. Schaub M., Keller W.: RNA editing by adenosine deaminases generateds RNA and protein diversity. *Biochemie*, **84**, 791–803 (2002)
34. Casey J.L., Gerin J.L.: Hepatitis D virus RNA editing: specific modification of adenosine in the antigenomic RNA. *Virology*, **69**, 7593–7600 (1995)
35. Lai M.M.: The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 259–286 (1995)
36. Agol V.I.: Genom instability in Picornaviruses. *Mol. Biol.* **36**, 216–222 (2002)
37. Hirst G.K.: Genetic recombination with Newcastle disease, polioviruses and influenza virus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **27**, 303–309 (1962)
38. Greene A.M., Allison R.F.: Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science*, **263**, 1423–1425 (1994)
39. Palasingam K., Shaklee P.N.: Revision of Q? RNA phage mutants by homologous RNA recombination. *J. Virol.* **66**, 2435–2442 (1992)
40. Bujarski J.J., Nagy P.D., Flasiniski S.: Molecular studies of genetic RNA-RNA recombination in brome mosaic virus. *Adv. Virus Res.* **43**, 275–302 (1994)
41. Emini E.A., Leibowitz J., Diamond D.C., Bonin J., Wimmer E.: Recombination of Money and Sabin strain poliovirus type 1: analysis of *in vitro* phenotypic markers and evidence that resistant to guanidine maps in the nonstructural proteins. *Virology*, **137**, 74–85 (1984)
42. Meyers G., Tautz N., Dubovi E.J., Thiel H.J.: Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequence. *Virology*, **180**, 602–616 (1991)
43. Beck M.A., Shi Q., Morris V.C., Levander O.A.: Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nature Med.* **1**, 433–436 (1995)
44. Domingo E., Menendez-Arias L., Holland J.J.: RNA Virus fitness. *Med. Virol.* **7**, 87–96 (1997)
45. McKnight A., Weiss R.A., Shotton C., Takenchi Y., Hoshino H., Chacham P.R.: Change in tropism upon immune escape by human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **69**, 3167–70 (1995)
46. Pavio N., Lai M.M.C.: The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J. Biosci.* **28**, 287–304 (2003)
47. McCaughan G.W., Laskus T., Vargas H.E.: Hepatitis C Virus Quasispecies: Misunderstood and Mistreated? *Liver Transplant.* **9**, 1048–1052 (2003)
48. Farci P., H. Robert i wsp. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science*, **258**, 135–140 (1992)
49. Fiorilli M., Mecucci C., Farci P., Casato M.: HCV-associated lymphomas. *Rev. Clin. Exp. Hematol.* **7**, 406–423 (2003)
50. Kryczka W., Kisiel E.: Hematologic syndromes in hepatitis C virus infestation. *Przegl. Lek.* **57**, 672–675 (2000)
51. Idilman R., Colantoni A., De Maria N., Alkan S., Nand S., Van Thiel D.H.: Lymphoproliferative disorders in chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* **11**, 302–309 (2004)
52. Beddhu S., Bastacky S., Johnson J.P.: The clinical and morphologic spectrum of renal cryoglobulinemia. *Medicine*, **81**, 398–409 (2002)
53. Lee Y.H., Ji J.D., Yeon J.E., Byun K.S., Lee C.H., Song G.G.: Cryoglobulinaemia and rheumatic manifestations in patients with hepatitis C virus infection. *Ann. Rheum. Dis.* **57**, 728–731 (1998)
54. Erickson A.L., Kimura Y., Iagarashi S., Eichelberger J., Houghton M., Sidney J., McKinney D., Sette A., Hughes A.L., Walker C.M.: The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, **15**, 883–895 (2001)
55. Bowen D.G., Walker C.M.: the origin of quasispecies: cause or sequence of chronic hepatitis C viral infection? *J. Hepatol.* **42**, 408–417 (2005)
56. Phillips R.E., Harcourt G.C., Price D.A.: CD4+ T cells: The great escape. *Nature Med.* **7**, 777–778 (2001)
57. Ciurea A., Hunziker L., Klenerman P., Hengartner H., Zinkernagel R.L.: Impairment of CD4+ T cell responses during chronic virus infection prevents neutralizing antibody responses against virus escape mutants. *J. Exp. Med.* **193**, 297–305 (2001)
58. Forton D.M., Karayiannis P., Mahmud N., Taylor-Robinson S.D., Thomas H.C.: Identification of Unique Hepatitis C Virus Quasispecies in the Central Nervous System and Comparative Analysis of Internal Translational Efficiency of Brain, Liver, and Serum Variants. *J. Virol.* **78**, 5170–5183 (2004)
59. Ducoulombier D.A., Raque-Alfonso A.M., Liberto G.Di., Penin F., Kara R., Richard Y., Dussaix E., Feray C.: Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology*, **39**, 817–825 (2004)
60. Farci P., R.H. Purcell i wsp.: Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3081–3086 (2002) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
61. Yeh B.I., J.W. Choi i wsp.: Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus type 1b infection. *J. Med. Virol.* **66**, 481–487 (2002) (praca stanowi dzieło 11 autorów)
62. Condra J.H., E.A. Emini i wsp.: *In vivo* emergency of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature*, **374**, 569–571 (1995) (praca stanowi dzieło 16 autorów)
63. Schuurman R, C.A.B. Boucher i wsp.: Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistance virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J. Infect. Dis.* **171**, 1411–1419 (1995) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
64. Farci P., Shimoda A., Coiana A., Diaz G., Peddis G., Melpolder J.C., Strazzer A., Chien D.Y., Munoz S.J., Balestrieri A.: The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*, **288**, 339–344 (2000)
65. Louz D., Bergmans H.E., Loos B.P., Hoeben R.C.: Cross-species transfer of viruses: implications for the use of viral vectors in biomedical research, gene therapy and as live-virus vaccines. *J. Gene Med.* **7**, 1263–1274 (2005)
66. Domingo E., Baranowski E., Ruiz-Jarbo C.M., Martin-Hernandez A.M., Saiz J.C., Escarmis C.: Quasispecies structure and persistence of RNA Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 521–527 (1998)
67. Ahmed R., Nathanson N.: Immune response to viral infections. In: *Viral Pathogenesis and immunity*, red. N. Nathanson, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2002; s. 53–59.

68. Laskus T., Radkowski M., Piasek A., Nowicki M., Horban A., Cianciara J., Rakela J.: Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J. Infect. Dis.* **181**, 442–448 (2000)
69. Laskus T., Radkowski M., Wang L.F., Nowicki M., Rakela J.: Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: confounding effects of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J. Virol.* **74**, 1014–1017 (2000)
70. Radkowski M., Wilkinson J., Nowicki M., Adria D., Vargas H., Ingi C., Rakela J., Laskus T.: Search for hepatitis C negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in central nervous system: evidence of replication. *J. Virol.* **76**, 600–608 (2002)
71. Pollard A.J., Dobson S.R.: Emerging infectious diseases in the 21st century. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **13**, 265–275 (2000)
72. Mahy B.W., Brown C.C.: Emerging zoonoses: crossing the species barrier. *Rev. Sci. Technol.* **19**, 33–40 (2000)
73. Rota P.A., B.J. Williams i wsp. Characterisation of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, **300**, 1394–1399 (2003)
74. Mumford J.A.: Vaccines and viral antigenic diversity. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **26**, 69–90 (2007)
75. Barouch D.H., Letvin N.L.: Viral evolution and challenges in the development of HIV vaccines. *Vaccine*, **20**, A66–A68 (2002)
76. Gołębiowska M.: Grypa, epidemiologia, klinika, szczepienia ochronne. *Nowa Pediatria*, **1**, 45–49 (2001)
77. Ulmer J.B.: Influenza DNA vaccines. *Vaccine*, **20**, S74–S76 (2002)
78. Rottinghaus S.T., Poland G.A., Jacobson R.M., Barr L.J., Roy M.J.: Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination. *Vaccine*, **21**, 4604–4608 (2003)
79. Burgers W.A., Williamson C.: The challenges of HIV vaccine development and testing. *Best. Pract. Res. Cl. Ob.* **19**, 277–291 (2005)
80. Nitkiewicz J.: Epidemiologia molekularna wirusa przewlekłego zapalenia wątroby typu C (HCV). *Przegl. Epidemiol.* **58**, 413–421 (2004)
81. Minor P.D.: The molecular biology of polioviruses. *J. Gen. Virol.* **73**, 3065–3077 (1992)
82. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766–2770 (1989)
83. Kaczanowski R., Trzeciak L., Kucharczyk K.: Multitemperature single-strand conformation polymorphism. *Electrophoresis*, **22**, 3539–3545 (2001)
84. Lu M., Funsch B., Wiese M., Rogendorf M.: Analysis of hepatitis C virus quasispecies populations by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Gen. Virol.* **76**, 881–887 (1995)
85. Myers R.M., Maniatis T., Lerman L.S.: Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* **155**, 501–527 (1987)
86. Cotton R.G.H.: Current methods of mutation detection. *Mutat. Res.* **285**, 125–144 (1993)
87. Xiao W., Oefner P.J.: Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. *Hum. Mut.* **17**, 439–474 (2001)
88. Nagamine C.M., Chan K., Lau Y.: PCR artifact: Generation of heteroduplexes. *Am. J. Hum. Genet.* **45**, 337–339 (1989)
89. Gao G., Stuver S.O., Okayama A., Tsobouchi H., Mueller N.E., Tabor E.: The minimum number of clones necessary to sequence in order to obtain the maximum information about hepatitis C virus quasispecies: a comparison of subjects with and without liver cancer. *J. Viral Hepat.* **12**, 46–50 (2005)
90. Comas I., Moya A., Gonzalez-Candelas F.: Validating viral quasispecies with digital organisms: A re-examination of the critical mutation rate. *BMC Evol. Biol.* **5**, 1471–2148 (2005)
91. Wilke C.O.: Quasispecies theory in the context of population genetics. *BMC Evol. Biol.* **44**, 1471–2148 (2005)
92. Cha R.S., Thilly W.G.: Specificity, efficiency and fidelity of PCR (w) PCR Methods and Applications, red. D. Bcntlcy, R. Gibbs, E. Green, R. Myers, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1993, **3**, S18–29