# Open Educational Resource zur Virenforschung

## Lösungen Modul Sequenzanalyse

**In diesem Modul geht es um:**

- Die Notwendigkeit, die Abfolge der DNA-Nukleotide zu kennen
- Mutationen und wie man die einzelnen Mutationen unterscheidet
- Die Aufgaben der Seitenketten der Aminosäuren in Proteinen
- Den Umgang mit der Sequenzanalyse Software *MEGA*
  - Nukleotidanalyse unterschiedlicher SARS-CoV-2 Varianten
  - Mutationsauffindung und Proteinsequenz

**gefördert von**

JOACHIM HERZ STIFTUNG

**produziert von**

European XFEL

**LIZENZ:** Das Dokument steht unter der CC BY-SA 4.0-Lizenz. Der Name des Urhebers soll bei einer Weiterverwendung wie folgt genannt werden: European XFEL

# Lösungen zum Arbeitsblatt Mutationsanalyse des SARS-CoV-2 Virus mit Hilfe von MEGA

Aufgabe 1

a) Schaue dir die untereinander angeordneten Sequenzen einmal genauer an. Beschreibe, mit welchem Codon sie jeweils beginnen und erkläre, welche Bedeutung dieses Codon für die Translation hat.
LÖSUNG: ATG, dieses Codon ist sowohl das Startcodon (damit beginnt die Translation) und codiert ebenfalls für die Aminosäure Methionin.

b) Scrolle nun einmal langsam nach rechts und schaue dir das Alignment genauer an. Beschreibe stichpunktartig, was dir dabei auffällt, und erkläre, woran dies liegen könnte.
LÖSUNG: Ab Stelle 200 sind die Sequenzen immer schlechter aligned aufgrund verschiedener auftretender Mutationen.

Aufgabe 2

a) Scrolle nun noch einmal langsam durch die Sequenzen und schaue dir das Alignment an. Erläutere, was sich verändert hat.
LÖSUNG: Mutationen wurden erkannt und die Sequenzen entsprechend angeordnet (aligned). Insbesondere bei Insertionen/Deletionen wird das Alignment sehr beeinflusst, wenn entsprechende Lücken nicht berücksichtigt werden.

b) Nenne jeweils ein Beispiel für die drei verschiedenen Punktmutationsarten (Substitution, Deletion und Insertion), welches in diesen Sequenzen zu finden ist. Nutze dafür das Format C56G (Cystein bei der Position 56 ist in Glycin verändert). HINWEIS: Gebe die Position bezogen auf die Wildtyp-Sequenz an!
LÖSUNG: Hier gibt es zwei mögliche Lösungen. Wenn die SuS die Nukleotidsequenzen auswerten, sind die möglichen Ergebnisse in Tabelle 1 zu finden. Sollten die SuS die Proteinsequenzen auswerten, sind die möglichen Ergebnisse ein Tabelle 2 zu finden.

**Tabelle 1:** Mögliche Ergebnisse auf Basis der Nukleotidsequenzen

| Variante | Mutation | | |
|---|---|---|---|
| | **Substitution** | **Deletion** | **Insertion** |
| **Delta** | C56G, C57A, A467G, G468C, T1364G, C1442A, C1443G, C1455T, C2050A, C2052G, C2052A, G2857A | Δ469-474 | - |
| **Omikron** | C200A, C201G, C284T, G425A, G1025A, T1120C, C1121T, T1126C, C1128T, C1133T, G1260C, C1329G, G1345A, T1438A, C1439A, C1442A, C1443A, A1460C, G1461C, C1649G, C1650G, C1972T, C2046G, C2051A, C2301G, G2395T, C2577T, G2871C, C2916G, C2950T | Δ205-210, Δ427-435, Δ631-633 | Ins642 GAGCCCGAG |

**Tabelle 2:** Mögliche Ergebnisse auf Basis der Proteinsequenzen

| Variante | Mutation | | |
|---|---|---|---|
| | Substitution | Deletion | Insertion |
| **Delta** | T19R, R158G, L452R, T478K, P681R, D950N | Δ156-157 | – |
| **Omikron** | A67V, T95I, G142D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F | Δ69-70, Δ143-145, Δ211 | ins214EPE |

Aufgabe 3

Untersuche die unter a) - d) genannten Stellen des Sequenzalignments genauer und benenne, welche Variante wie mutiert ist. Gehe hierbei auf die Variante, die Art der Punktmutation, die entsprechenden Nukleotide sowie die entstehenden Aminosäuren ein. Verwende für letzteres die Codesonne am Ende des Arbeitsblattes.

LEHRKRAFTINFO: Wenn die Schülerinnen und Schüler Probleme beim richtigen Übersetzen, aufgrund eines falschen Codons, haben, kann man ihnen den Hinweis geben, dass wenn die Summe beim Teilen durch drei ***,3333$\overline{3}$ oder ***,6666$\overline{6}$ ist, man sich an der ersten bzw. zweiten Stelle des Codons befindet.

a) 205-210
   LÖSUNG: Omikron, Deletion von CACGTC bzw. Histidin H & Valin V

b) 642/643
   LÖSUNG: Alle 640-642 CGC → Arginin (R); Omikron bei Position 643, Insertion von GAGCCCGAG bzw. Glutaminsäure/Prolin/ Glutaminsäure (EPE)

c) 1501-1503
   LÖSUNG: Omikron, Substitution, AAC → TAC, Asparagin N → Tyrosin Y

d) 2041-2043
   LÖSUNG: Delta, Substitution, CCC → AGA, Prolin P → Arginin R und Omikron, Substitution, CCC → CAC, Prolin P → Histidin H

Aufgabe 4

a) Bei häufig verwendeten medizinischen PCR-Tests werden mehrere Stellen im Erbgut des Virus verglichen. Die Mutation Δ69-70 (in der Proteinsequenz) fällt innerhalb einer der Bindungsstellen für PCR-Primer. Erkläre, wie sich die PCR-Ergebnisse von jemandem, der mit der Omikron-Variante angesteckt ist, von jemand anderem unterscheiden, der mit der Delta-Variante infiziert ist.
LÖSUNG: An dieser Stelle wird der Primer nur bei der Delta-Variante, nicht jedoch bei der Omikron-Variante binden. Das Bandenmuster bei der Gelelektrophorese würde entsprechend nur bei der mit der Delta-Variante infizierten Person eine Bande zeigen.
Ergänzung 1: Es ist reiner Zufall, dass Omikron bei diesem Primer auffällig kein PCR-Produkt produziert. Der Test wurde nicht entwickelt, um die Varianten zu unterscheiden. Für die Diagnose ist es gut, dass der Test 3 oder mehr Gene testet, sonst hätte der Omikron-Patient negativ getestet.
Ergänzung2: Diese Mutation ist auch für die Immunantwort wichtig – anscheinend binden bestehende Antikörper (nach Impfung oder vorheriger Infektion) an diese Stelle. Durch Verlust dieser beiden Aminosäuren können die bestehenden Antikörper nicht mehr so gut binden. Die Folge ist eine geschwächte Immunantwort.
Quelle: https://insidecorona.net/the-new-mutation-of-sars-cov-2/

b) Untersuche die Seitenketten der beiden Aminosäuren bei der Mutation N501Y. Beschreibe die chemischen Eigenschaften und Unterschiede.
LÖSUNG: N = Asparagin (polar/neutral), Y = Tyrosin (polar/neutral). Die chemischen Eigenschaften der beiden Aminosäuren sind gleich. Ihre Seitenketten sind jeweils neutral geladen und polar. Jedoch ist die Seitenkette von Tyrosin größer, da sie im Gegensatz zu Asparagin ein Cyclo-Hex-2,4,6-trien Molekül enthält. Dies führt zu möglichen sterischen Änderungen. Ergänzung: Die Mutation N501Y befindet sich an der Kontaktfläche zwischen dem Rezeptor ACE2 der menschlichen Zelle und des Spike-Proteins. Diese Mutation verstärkt die Bindung des Spike-Proteins an ACE2. Dies ermöglicht dem Virus in die Zelle einzudringen und sorgt so für eine höhere Übertragbarkeit. Quelle: https://insidecorona.net/the-new-mutation-of-sars-cov-2/

c) Untersuche die Seitenketten der Aminosäuren von P681R bei Delta und von P681H bei Omikron. Diese Stelle befindet sich in der Nähe einer Spalt-Stelle, die beim Eintritt des Virus in die Wirtszelle wichtig ist. Beschreibe die chemischen Eigenschaften und Unterschiede. Diskutiere, ob und wenn ja, welche Auswirkungen für die Infektion zu erwarten sind.
LÖSUNG: P = Prolin (hydrophob), R = Arginin (basisch), H = Histidin (basisch). Zum einen wird eine neutrale, unpolare Aminosäure in eine basische verändert (gilt für Arginin und Histidin). Dies kann Folgen für die intermolekularen Wechselwirkungen haben. Unpolare Aminosäuren können nur über Van-der-Waals-Kräfte mit anderen unpolaren Aminosäuren in Wechselwirkung treten. Basische Aminosäuren hingegen können echte chemische Bindungen, in diesem Fall Ionenbindungen, eingehen. Zum anderen verändert sich auch hier wieder die Größe der Seitenkette, was zu sterischen Veränderungen führt.
Ergänzung: Eine Forschungsgruppe der Universität Texas könnte beweisen, dass die Mutation P681H bei der Omikron Variante dazu geführt hat, dass das Virus Zellen schneller und effizienter infizieren konnte und somit zur raschen Verbreitung dieser Variante geführt hat.
Quellen: Spektrum.de vom 28.08.21: https://www.spektrum.de/news/sars-cov-2-die-mutation-die-delta-so-ansteckend-macht/1915573
und Nature.com vom 20.08.2021: https://www.nature.com/articles/d41586-021-02275-2

Zusatzaufgabe

Im Vergleich zu Viren haben höhere Tiere ein viel größeres Genom. Einige Gene sind mehrfach vorhanden (durch Duplizierung oder Diploidie).

a) Stelle eine Hypothese auf, was das mehrfache Vorhandensein von Genen für die Überlebenschancen eines Individuums mit aufgetretener Mutation bedeuten kann.
*LÖSUNG*: Wird ein Gen durch Mutation verändert, kann seine Funktion ausfallen oder beeinträchtigt werden. Wenn man mehrere Kopien eines Gens besitzt, hat man eine Ersatzkopie, welche die ursprüngliche Information weiterhin enthält. Dadurch wird es der Evolution ebenfalls ermöglicht, aus einem Gen zwei Gene mit unterschiedlichen Funktionen zu entwickeln.

b) Erkläre, ob ein Unterschied in der Häufigkeit von Mutationen (überlebend in der nächsten Generation) zwischen Viren und höheren Tieren wie Menschen zu erwarten ist.
*LÖSUNG*: Ja, aber es ist kompliziert. Für ein Virus ist eine Mutation viel wichtiger/gefährlicher, weil nur eine Kopie des Gens vorhanden ist, und jedes Gen hat eine wichtige Funktion zu erfüllen (weniger Überschneidungen als bei höheren Organismen). Aber Viren haben auch kurze Generationen, deswegen können sich erfolgreiche Mutationen schnell etablieren. Mutationen sind für Viren also riskanter als für Menschen, aber sie verbreiten sich gleichzeitig viel schneller.

# Hausaufgaben

Aufgabe 1

a) Informiere dich über das Thema künstlich mutierte Viren und erstelle eine Pro-/Kontra-Liste für eine Diskussionsrunde. Notiere deine verwendeten Quellen.
Hinweis: Unter der Suche „künstlich mutierte Viren“ gibt die Google-Suche auf der ersten Seite Links zu: Spiegel.de, Spektrum der Wissenschaft, SWR, Uni Münster und Zeit online an. Diese Quellen sollten ausreichen, um eine Pro- und Kontraliste zu erstellen. Hier wäre es wahrscheinlich wichtig noch einmal daran zu appellieren, nur vertrauenswürdige Quellen zu nutzen.

b) Informiere dich zum Thema Vor- und Nachteile des Experimentierens mit künstlich veränderten und damit mutierten Viren. Suche dir eine Argumentationsseite aus und bereite dich darauf vor, diese in einer Diskussionsrunde darzustellen und zu verteidigen. Notiere deine verwendeten Quellen.
Wir möchten hier Anreize für eine Diskussion anbieten und haben uns dafür mit möglichen Aspekten auseinandergesetzt. Die Liste mit Links ist nicht erschöpfend und wurde zuletzt am 10.11.2023 auf Aktualität überprüft.

| **Aspekt** | **Links** |
|---|---|
| Biowaffen | Konrad Adenauer Stiftung: Viren als Waffe<br>Tagesspiegel: Viren als Biowaffen<br>Science ORF: Pflanzenviren als Biowaffen?<br>FAZ: Wir züchten Biowaffen<br>Süddeutsche Zeitung: Künstliche Killerviren aus dem Labor |
| Medizinische Forschung | Uni Tübingen: Viren als Wunderwaffe der Medizin – Fluch oder Segen?<br>Max-Plack-Gesellschaft: Ein Virus als Symbiose-Partner<br>Zeit online: Mit Viren auf Bakterienjagd<br>Spektrum der Wissenschaft: Phagen jagen |
| Ethik | Unesco: Bioethik<br>Bundesärztekammer: WMA Deklaration von Helsinki - Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen<br>Springer Verlag: Forschung am Menschen – Prinzipien und Herausforderungen für die Arbeit von Ethikkommissionen<br>Universität Leipzig: Recht und Ethik in der medizinischen Forschung |

Aufgabe 2

Informiere dich im Internet zum Thema PCR-Tests und dessen Einsatz zum Nachweis einer Corona-Infektion.

a) Fasse die Prozedur eines PCR-Tests kurz stichpunktartig zusammen.
LÖSUNG: Mittels eines PCR-Tests kann aus sehr wenig Probe durch z.B. einen Abstrich der Nasenschleimhaut zuverlässig nachgewiesen werden, ob Erreger vorhanden sind. Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) ist eine Standard Labormethode, bei der DNA vervielfältigt wird. Im Fall des SARS-CoV-2 Virus handelt es sich um Erbmaterial des

Virus, welches sich im Abstrich der Nasenschleimhaut befindet. Die Menge ist für den eigentlichen Nachweis zu gering, daher nutzt man die PCR um die Menge zu vergrößern. Durch den Einsatz von unterschiedlichen Primern während der PCR kann, neben dem Nachweis auf eine Corona-Infektion, auch festgestellt werden, mit welcher Virus-Variante die untersuchte Person infiziert ist. Die PCR ist eine sehr sensitive Methode, da nur sehr geringe Mengen an DNA notwendig sind. Neben dem Nachweis von Infektionen wird die PCR auch in der Kriminalistik oder in der Lebensmittelkontrolle eingesetzt.
Die Schritte für einen Nachweis sind wie folgt:

- Probenentnahme
- Probenaufbereitung
- PCR
- Gelelektrophorese
- Auswertung der Gelelektrophorese

b) Erkläre, warum mehrere Gene beim PCR-Test berücksichtigt werden.
LÖSUNG: Die Startpunkte für die PCR sind die Primer. Sie sind zwischen 18 und 30 Nukleotide lang und binden spezifisch an eine bestimmte Position auf der DNA. Wenn es Mutationen in der Bindestelle für die Primer gibt, binden diese eventuell weniger gut oder gar nicht. In unserem Beispiel wäre dann folgender Fall möglich. Die PCR wird nur mit spezifischen Primern für die Omikron-Variante durchgeführt. Sollte die zu untersuchende Probe jedoch die Variante Delta enthalten, fällt das Ergebnis des PCR-Tests negativ aus, obwohl SARS-CoV-2 Viren enthalten sind. Daher wählt man für die PCR immer mehrere Primer für unterschiedliche Varianten aus, damit eine Infektion auch tatsächlich nachgewiesen werden kann.