

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Michal Blaško

Replikační strategie nově objevených gigantických virů améb
Replication strategies of newly discovered giant viruses of amoebas

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2018

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 17. 7. 2018

Michal Blaško

Děkuji doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za cenné připomínky a rady při vypracování této bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval své rodině a přátelům za projevenou podporu.

Abstrakt

Gigantické viry jsou skupinou virů, jejichž genom je tvořen dvouvláknovou molekulou DNA. Vyznačují se tvorbou obrovských virových částic, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 150–1500 nm. Stejně tak i jejich genomy jsou obrovské a dosahují velikosti až 2,5 Mbp. Obrovské DNA viry se replikují buď v cytoplazmě, nebo využívají obou buněčných kompartmentů – jádra i cytoplazmy. Proto byly pojmenovány jako jaderno-cytoplazmatické viry (nucleocytoplasmic large DNA viruses, NCLDVs). V průběhu replikačního cyklu indukují tvorbu virových továren, které zajišťují morfogenezi nových virionů. Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o vybraných zástupcích gigantických virů a popsat jejich replikační strategie. Dále budou diskutovány objevy učiněné ve spojitosti s touto skupinou virů. Díky objevu gigantických virů byly také identifikovány menší DNA viry, tzv. virofágy (viry virů), jež mají schopnost využívat infekce améby gigantickými viry pro realizaci své vlastní replikační strategie. U zástupců čeledi *Mimiviridae* byla popsána přítomnost úseku genů MIMIVIRE, který zajišťuje unikátní způsob imunitní ochrany virů před infekcí virofágem *Zamilon*.

Klíčová slova: gigantické viry, Mimivirus, virofág, MIMIVIRE, améba

Abstract

Giant viruses are a group of viruses with genome composed of double-stranded DNA molecule. They are characterized by the creation of giant viral particles, the size of which varies between 150–1500 nm. Also, their genomes are huge reaching sizes of up to 2,5 Mbp. The viruses replicate either in the cytoplasm or they exploit for their replication both nucleus and cytoplasm. Therefore, they are called, nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDVs). During their replication cycle, the giant viruses induce the creation of viral factories, which provide morphogenesis of new virions. The aim of this thesis is to summarise current knowledge of selected representatives of the giant viruses, and to describe their replication strategies. Furthermore, this work aims to discuss discoveries made in relation to this particular group of viruses. Thanks to the discovery of giant viruses, another group of small viruses was identified – the so-called virophages (viruses of viruses). Virophages have the ability to take advantage of the giant virus infecting an amoeba to realize their own replication strategy. In some members of the *Mimiviridae* family there was described a presence of an genome element providing a unique way of immunoprotection of giant viruses from being infected by the *Zamilon* virophage.

Key words: giant viruses, Mimivirus, virophage, MIMIVIRE, amoeba

Seznam použitých zkratk

APMaV	<i>Acanthamoeba polyphaga Mamavirus</i>	<i>Acanthamoeba polyphaga Mamavirus</i>
APMV	<i>Acanthamoeba polyphaga Mimivirus</i>	<i>Acanthamoeba polyphaga Mimivirus</i>
ATP	adenosine triphosphate	Adenosintrifosfát
bp	base-pair	pár bází
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
GBV	Giant blood virus	Velký krevní virus
kbp	kilobase pairs	kilobáze
Mbp	megabase pairs	Megabáze
MIMIVIRE	mimivirus virophage resistance element	element genomu zajišťující mimiviru rezistenci před infekcí virofágem
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
NCLDV	nucleocytoplasmic large DNA viruses	velké jaderně-cytoplazmatické DNA viry
nt	nucleotide	Nukleotid
PD	<i>Pandrovirus dulcis</i>	<i>Pandrovirus dulcis</i>
PS	<i>Pandrovirus salinus</i>	<i>Pandrovirus salinus</i>
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomal RNA	ribosomální RNA
SEM	scan electron microscope	skenovací elektronový mikroskop
TEM	transmission electron microscope	transmisní elektronový mikroskop
tRNA	transfer RNA	transferová RNA

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Jaderně-cytoplazmatické viry	2
3. Gigantické viry améb	3
3.1. Čeleď <i>Mimiviridae</i>	4
3.1.1. <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Mimivirus</i>	5
3.1.1.1. Struktura virové částice	6
3.1.1.2. Genom <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Mimiviru</i>	8
3.1.1.3. Replikační strategie čeledi <i>Mimiviridae</i>	9
3.1.2. Další významní zástupci čeledi <i>Mimiviridae</i>	11
3.2. <i>Marseilleviridae</i>	13
3.3. Faustoviry	14
3.3.1. Replikační strategie faustovirů	16
3.4. Pandoraviry	16
3.4.1. Replikační strategie rodu <i>Pandoravirus</i>	17
3.5. <i>Mollivirus sibericum</i>	18
3.5.1. Replikační strategie <i>Molliviru sibericum</i>	18
3.6. Pithoviry	19
3.6.1. <i>Pithovirus sibericum</i>	19
3.6.1.1. Replikační strategie <i>Pithoviru sibericum</i>	19
3.6.2. <i>Cedratvirus</i>	20
3.6.2.1. Replikační strategie rodu <i>Cedratvirus</i>	20
4. Virofágy gigantických virů améb	21
4.1. Virofágy rodu <i>Sputnik</i>	21
4.2. Virofágy druhu <i>Zamilon</i>	22
5. Evoluce gigantických virů améb	23
5.1. Teorie genového obohacení a genové ztráty	24
5.2. Čtvrtá doména života.....	24
5.3. Gigantické viry a Polintony.....	25
6. Závěr.....	27
Seznam použité literatury	28

1. Úvod

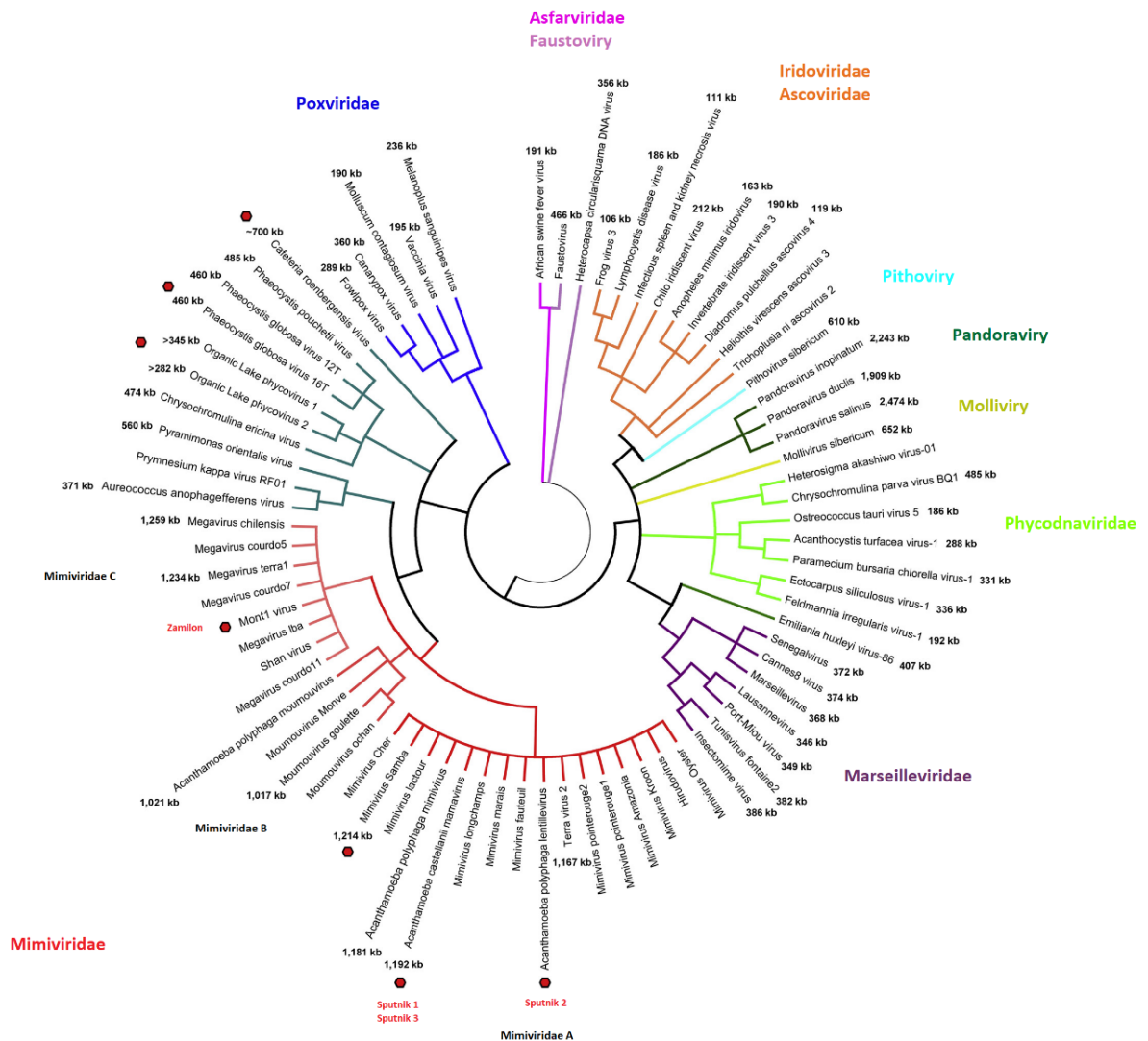
Viry jsou obligátními vnitrobuněčnými parazity všech tří domén života a současně nejrozšířenější biologickou entitou na Zemi. Pojem virus byl definován roku 1957 Andre Lwoffem, jehož definice popisuje viry jako striktně intracelulární, potenciálně patogenní agens, která vykazují infekční fázi. Jejich genom je tvořený pouze jednou nukleovou kyselinou, nejsou schopné binárního dělení či syntézy ATP. Jedno z přídatných kritérií limituje maximální velikost virové částice hodnotou 200 nm. Na základě této definice byly do experimentální praxe zařazeny filtry s póry o velikosti 200 nm, které se používají dodnes k získání frakce obsahující pouze virové částice. Právě tyto filtry jsou důvodem tak pozdní identifikace gigantických virů. K zásadnímu zlomu v chápání pojmu virus došlo v roce 2003 v souvislosti s objevem gigantické částice, které neexprimovala 16S rRNA, jejíž přítomnost indikuje příslušnost k doméně Bakterie, což bylo první indicií k tomu, že by se mohlo jednat o virus. Tato hypotéza byla potvrzena pozorováním obrovské kapsidy, dosahující velikosti 520 nm, která v sobě schraňovala dvouvláknovou molekulu DNA a další analýzou genomu a replikačního cyklu. Tato virová částice byla pojmenována Mimivirus a její objev odstartoval závod v objevování jí podobných částic. V současnosti známe řadu, tzv. gigantických virů, jejichž velikost virových částic a délka genomu překračuje limity definované Lwoffovou definicí viru. Přes rozdíly v morfologii virových částic, skladbě genových produktů či přirozeném hostiteli gigantické viry sdílí několik vlastností. Většina genů, které gigantické viry kódují nemá homology v současných databázích, čímž se výrazně odlišují od jiných virů. V souvislosti s tímto poznatkem byla navržena kontroverzní hypotéza čtvrté domény života, kterou by reprezentovaly gigantické viry spolu se svými nejbližšími fylogenetickými příbuznými, zástupci skupiny jaderně-cytoplazmatických DNA virů. Tato skupina, se vyznačuje formováním obrovských virových továren v cytoplazmě hostitele, které slouží k morfogenezi nových virionů.

Tato bakalářská práce si klade jako cíl popsat vybrané zástupce gigantických virů, replikujících se v amébách rodu *Acanthamoeba* a *Vermamoeba* a jejich replikační strategii. Rovněž bude pojednáno o unikátních DNA virech, tzv. virofágách, které jsou schopny infikovat gigantické viry. Diskutovány budou také navrhované scénáře evoluce gigantických virů.

2. Jaderně-cytoplazmatické viry

Jaderně-cytoplazmatické viry (NCLDV) je označení pro skupinu virů, která je druhově velice rozmanitá a sdružuje v sobě viry infikující širokou paletu eukaryotických organismů. Najdeme v ní viry, které se odlišují velikostí a morfologií virových částic, délkou genomů, replikační strategií nebo se liší svými hostiteli či prostředím, ve kterém se vyskytují. Jedno ovšem mají společné, a sice že genom všech zástupců NCLDV je tvořen dvouvláknovou molekulou DNA. Genom jednotlivých zástupců kóduje různé proteiny, z nichž se celá řada uplatňuje jako enzymy účastníci se syntézy, oprav či replikace DNA, jiné jako strukturní proteiny. Některé geny kódují enzymy a faktory transkripce, jiné součásti translačního aparátu. Vznikla tak celá řada otázek na téma definice pojmu virus nebo také evoluce této skupiny virů. Název těchto velkých DNA virů je odvozen od společných znaků replikační strategie všech zahrnutých zástupců. Proces replikace DNA a následná morfogeneze nových virionů jsou u některých virů ze skupiny NCLDV vázané výhradně na prostředí cytoplazmy virového hostitele. U vybraných zástupců se počáteční fáze virového cyklu odehrává v jádru hostitelské buňky a následně je virový cyklus dokončen v cytoplazmě hostitele. (Iyer, Aravind, a Koonin 2001; Iyer et al. 2006)

Původně byly jaderně-cytoplazmatické viry tvořeny čtyřmi čeleděmi virů, a to čeleděmi *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae* a *Poxviridae* (L. M. Iyer, Aravind, a Koonin 2001). V kontextu nových objevů se skupina NCLDV významně rozšířila a dnes zahrnuje 7 uznaných čeledí – k předchozím přibýly čeledi *Ascoviridae*, *Marseilleviridae* a *Mimiviridae*, 2 dosud neuznané čeledi „*Pandoraviridae*“ a „*Pithoviridae*“ a rody *Faustovirus* a *Mollivirus*. Jednotliví zástupci a jejich vzájemné fylogenetické vztahy jsou vyobrazeny na obrázku č. 1. Zajímavé je, že k těmto virům náleží také čeleď *Poxviridae*, jejíž zástupce, lidský patogen variola (virus černých neštovic) byl znám po tisíciletí. Svou strukturou a replikační strategií byly poxviry považovány spíše za výjimku mezi viry. Ve snaze o uspořádání nově objevovaných virů do vyšších taxonomických celků, byl v roce 2012 navrhnout nový řád, nesoucí název „Megavirales“. Do tohoto řádu byly zařazeny viry jaderně-cytoplazmatické viry, a to z důvodu, že jednotliví zástupci této skupiny vykazují nejrůznější společné vlastnosti. (Colson et al. 2012; Colson, De Lamballerie, et al. 2013) Mezi tyto vlastnosti patří přítomnost tzv. základních genů (z angl. „core genes“), což jsou geny, které se vyskytují napříč genomy jednotlivých zástupců. Jejich výskyt podporuje hypotézu, že všechny viry ze skupiny NCLDV se vyvinuly ze společného předka (L. M. Iyer, Aravind, a Koonin 2001). Dalšími kritérii jsou obdobná replikační strategie jednotlivých zástupců, zejména s ohledem na vazbu replikace na prostředí cytoplazmy hostitele a také morfologie virionů (Colson et al. 2012; Colson, De Lamballerie, et al. 2013). Právě poslední zmíněné kritérium vyčleňuje z navrhovaného řádu čeledi *Ascoviridae*, *Pandoraviridae*, *Pithoviridae* a *Poxviridae*, spolu s rody *Faustovirus* a *Mollivirus*, jejichž viriony nevykazují ikosahedrální symetrii. Navrhovaný řád „Megavirales“ nebyl doposud Mezinárodní komisí pro taxonomii virů schválen.

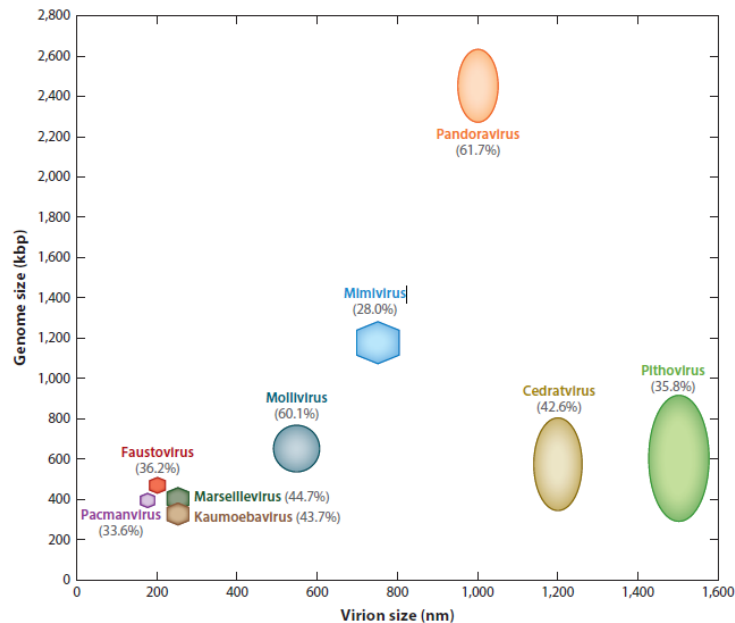


Obrázek č. 1 – Fylogenetický strom, zpracovaný na základě sekvence DNA polymerázy typu B, zobrazující rozmanitost skupiny NCLDV. Barevně jsou zobrazeny jednotlivé čeledi či skupiny virů. Červené šestiúhelníky označují virofágy infikující daný virus. Velikosti genomů vybraných zástupců jsou udávány v jednotce kilobáze – kb. Převzato a upraveno z (Fischer 2016).

3. Gigantické viry améb

Améby rodu *Acanthamoeba* jsou zástupci živočišné říše ze skupiny prvoků. Na Zemi osidlují velmi široké území, které se rozpíná od oblastí tropického pásu až k arktickým oblastem. Nejčastěji se vyskytují ve vodním prostředí, ale žijí i v půdě a ve vzduchu. Jejich rozšíření a schopnost přežít v celé řadě různých prostředí má spojitost s jejich způsobem života. Životní cyklus rodu *Acanthamoeba* je tvořen dvěma stádii. První z nich, pasivní stádium cysty, slouží amébě k přečkání nepříznivých podmínek a úniku před smrtí. Aktivní stádium, tzv. trofozoit, zajišťuje příjem potravy a rozmnožování. Potrava je přijímána fagocytózou a pinocytózou. (Rodríguez-Zaragoza 1994) Pro správný průběh fagocytózy je nutné, aby fagocytované částice měly velikost alespoň 500 nm (Weisman a Korn 1967). Tuto podmínku většina tzv. gigantických virů splňuje. Velikost virionů NCLDV se pohybuje v rozmezí 150–1500 nm a délka jejich genomů dosahuje hodnot v rozmezí přibližně 300–2500 kbp (Colson,

La Scola, a Raoult 2017). Velikosti vybraných zástupců jednotlivých čeledí a rodů demonstruje obrázek č. 2.

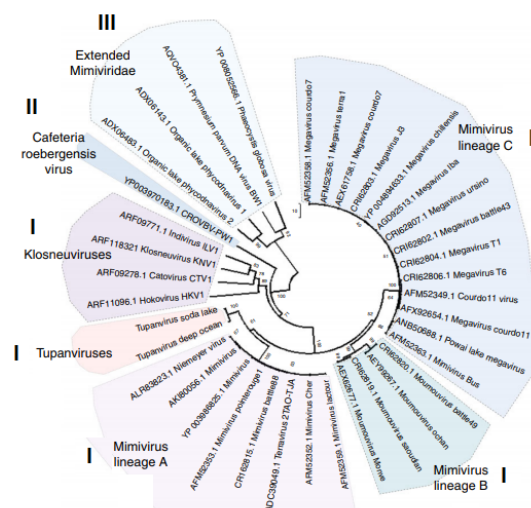


Obrázek č. 2 – Velikost virionů a délka genomu vybraných zástupců gigantických virů. Na ose X je vyobrazena velikost virionů v nanometrech, na ose Y je velikost genomu v jednotkách kilobáze (kbp). Převzato z (Colson, La Scola, a Raoult 2017).

3.1. Čeleď *Mimiviridae*

Čeleď *Mimiviridae* je unikátní čeleď virů, jež nese jména po hlavním představiteli této čeledi – mimiviru *Acanthamoeba polyphaga*, který byl popsán v roce 2003. (La Scola et al. 2003) Čeleď je výjimečná nejenom tím, že se jedná o první popsanou čeleď gigantických virů, jejíž identifikace zajistila větší pozornost a zájem o studium do té doby atypické skupiny virů, ale i tím, že poznání těchto virů, jejich genetického potenciálu i způsobů replikace vede k novým pohledům na virosféru, a mění dosavadní pojetí virologie.

V současnosti je tato čeleď stále, dle oficiálních zpráv Mezinárodní komise pro taxonomii virů (ICTV), tvořena pouze dvěma rody, což není v souladu s novými poznatky, které byly o této čeledi doposud shromážděny. Obrázek č. 3 prezentuje rozmanitost této čeledi virů a zobrazuje její jednotlivé zástupce. Dle navrženého schéma je čeleď tvořena třemi skupinami virů. Největší skupinou je skupina I, do níž byly zařazeny viry nejvíce příbuzné prvnímu objevenému mimiviru. Na základě fylogenetické analýzy DNA polymerázy B byly uvnitř skupiny vyčleněny tři linie virů – A, B a C.



Obrázek č. 3 – Schéma fylogenetické příbuznosti jednotlivých zástupců čeledi Mimiviridae na základě analýzy příbuznosti DNA polymerázy B. Čeď je tvořena třemi skupinami – I, II a III. Skupina I obsahuje tři linie rodu Mimivirus – linii A, B a C, Klosneuviry a Tupanviry. Skupina II je zastoupena virem Cafeteria roenbergensis a a skupina III představuje tzv. rozšířené (extended) Mimiviry. Převzato a upraveno z (Abrahão et al. 2018).

Skupinu A reprezentuje virus *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) a jeho nejbližší fylogenetičtí příbuzní. Tato linie virů je v mnoha směrech unikátní. Nejenomže bylo prokázáno, že některé zástupce této skupiny je možno infikovat jiným virem, tzv. virofágem *Sputnik* (La Scola et al. 2008, viz kapitola 4.1.), ale zároveň byl objeven i unikátní systém virové imunitní ochrany před nákazou jiným ze zástupců virofágů (Levasseur, Bekliz, et al. 2016 viz kapitola 4.2.). Do linie B byly zařazeny viry rodu *Moumouvirus* (Yoosuf et al. 2012) a linie C je zastoupena virem *Megavirus chilensis* a jemu příbuznými viry (Arslan et al. 2011). Všechny viry ze skupiny I využívají jako hlavního hostitele améby rodu *Acanthamoeba* či rodu *Veramoeba*. Skupina II je zastoupena fylogeneticky vzdálenějším příbuzným mimivirů, virem *Cafeteria roenbergensis*, jehož hlavním hostitelem je mořská řasa *Cafeteria roenbergensis* (Colson, Gimenez, et al. 2011). Poslední, skupina III, se označuje jako rozšířené (z angl. extended) mimiviry. Mezi její zástupce patří viry parazitující na řasách žijících v arktických mořích a chladných jezerech. Tyto viry bývají v odborné literatuře označovány zkratkou OLPG, která odkazuje na první písmena názvů dvou hlavních zástupců této skupiny – *Organic Lake virus* a virus *Phaeocystis globosa*. (Yutin et al. 2013)

3.1.1. *Acanthamoeba polyphaga Mimivirus*

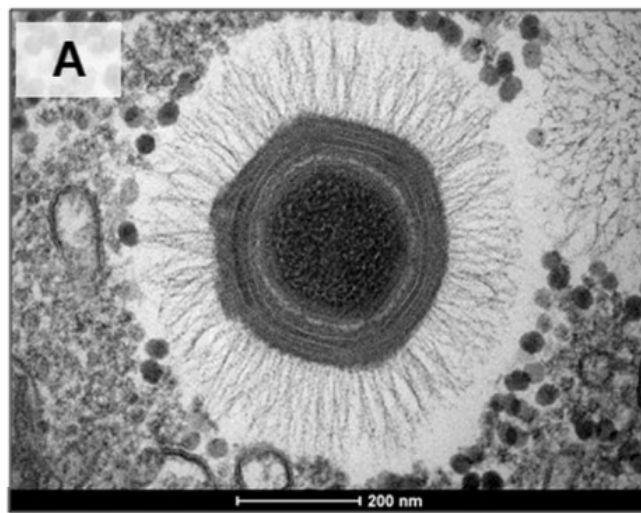
Virus, jehož hostitelem je améba *Acanthamoeba polyphaga*, APMV (*Acanthamoeba polyphaga Mimivirus*), je první objevený zástupce řady gigantických virů. Virus byl objeven v době, kdy se ve Velké Británii rozšířil zápal plic. Izolován byl ze vzorku vody z chladicí věže v Bradfordu, která byla považována za možný zdroj nákazy. Jeho objevitelé ho v souvislosti s jeho velikostí považovali za bakterii a pojmenovali jej *Bradford coccus* a byl zařazen mezi bakterie podobné Legionelám. Až poté, co selhaly pokusy o amplifikaci „bakteriální“ ribozomální 16S rRNA, byly pořízeny snímky

na elektronovém mikroskopu a bylo studováno složení částice. Výsledky byly překvapením. Pozorovaná částice vykazovala strukturní znaky podobné Iridovirům a obsahovala dvouvláknovou molekulu DNA uvnitř kapsidy. Tento objevený virus byl posléze popsán a nazván Mimivirus. (La Scola et al. 2003, Raoult 2005) Často diskutovanou otázkou v souvislosti s objevem mimiviru bývá jeho spojitost s onemocněním zápalem plic. V lidském těle, konkrétně ve vzorcích pacientů trpících zápalem plic byly nalezeny protilátky pro mimiviru společně s DNA, která je genomem mimiviru kódována (La Scola et al. 2005). Rovněž se podařilo izolovat částice viru LBA111, který je příbuzným APMV, ve vzorku lidských buněk pacienta trpícího zápalem plic. Tento objev podpořil hypotézu, že zástupci čeledi *Mimiviridae* jsou přímo či nepřímo spojeni s onemocněním zápalu plic. (Saadi et al. 2013) Potvrzení této hypotézy je předmětem dalšího výzkumu.

3.1.1.1. Struktura virové částice

Virové částice APMV patří mezi jedny z největších dosud objevených virových částic s velikostí dosahující v průměru až 500 nm. Tato velikost je ještě více umocněna přídatnými povrchovými fibrilami, jejichž velikost se pohybuje okolo 125 nm. Virion se skládá z proteinové kapsidy, jež vykazuje ikosahedrální symetrii, a obsahuje rovněž lipidové membrány. (Xiao et al. 2005)

Hlavní kapsidový protein je uspořádán ve dvaceti trojúhelníkových plátech tak, aby vzniklo celkem dvanáct vrcholů. Každý z těchto vrcholů je tvořen pěti monomery motivu „jelly-roll“. Tento motiv je speciálním typem β -barelu. (Klose et al. 2010) Struktura částice je vyobrazena na obrázku č. 4.

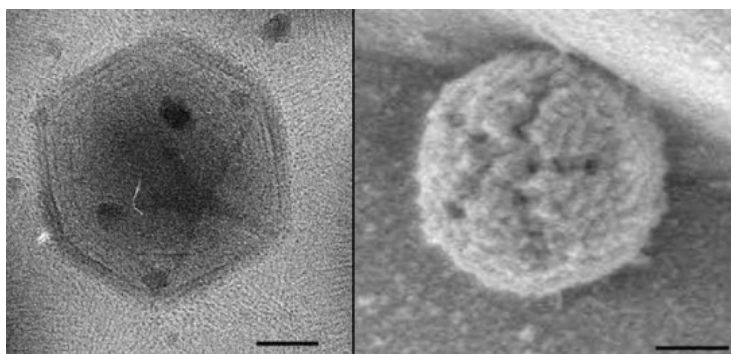


Obrázek č. 4 – Struktura virové částice viru *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*. Na snímku z transmisního elektronového mikroskopu můžeme pozorovat virovou kapsidu s ikosahedrální symetrií. Kapsida je pokryta hustou vrstvou fibril, jež dosahují délky až 125 nm. Převzato z (Abrahão et al. 2014).

Povrch virionu je pokryt hustou vrstvou fibril. Jednotlivá vlákna tvoří drobné snopce tří až čtyř vláken (Xiao et al. 2009), která jsou ukotveny do disku, který je lokalizován ve vrstvě těsně nad kapsidou (Klose et al. 2010). Hlavní strukturní molekula, která tvoří fibrily, nebyla prozatím identifikována. Přestože genom APMV kóduje různé typy kolagenů (Raoult et al. 2004), byla jejich role, coby hlavní

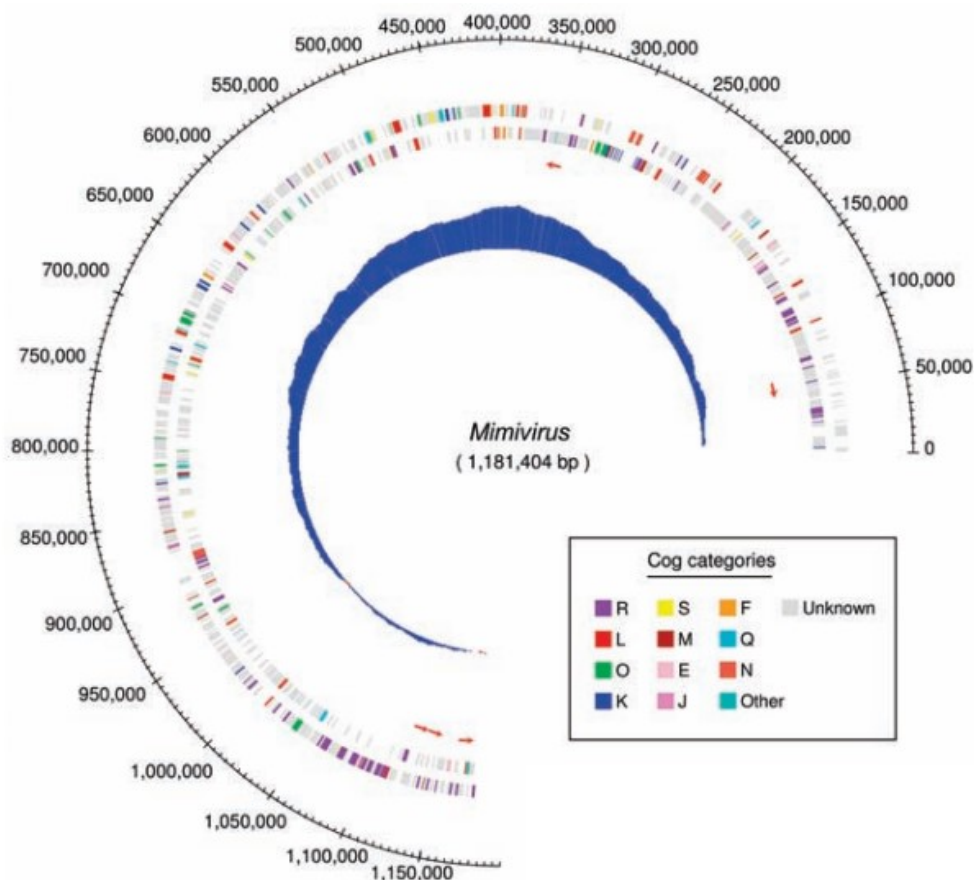
strukturní jednotky tvořící fibrily, vyvrácena. Experimentálně byla zjištěna resistance fibril vůči enzymu kolagenáze (Klose et al. 2010). Stejně tak jejich přesná biologická funkce je předmětem dalšího zkoumání. Nicméně bylo pozorováno, že virus využívá fibril během procesu adheze k povrchu améby. Na povrchu améby můžeme nalézt řadu sacharidů, jež mají roli adhezivních molekul. Mezi takové patří glukóza, manóza, N-acetylgalaktosamin a N-acetylglukosamin. (Elloway et al. 2004) Jednotlivé fibrily s těmito molekulami interagují a umožňují tak adhezi virionu k povrchu améby. Výsledky experimentu, při kterém byly améby spolu s viriony umístěny do roztoku N-acetylglukosaminu a při kterém byla pozorována klesající tendence hodnoty virionů v titru, ukázaly, že hlavní molekulou, se kterou fibrily APMV interagují na povrchu améby je N-acetylglukosamin. Kromě jiného bylo experimentálně prokázáno, že APMV dokáže interagovat i s polymery N-acetylglukosaminu. Rodrigues a spolupracovníci ukázali, že APMV je schopen se přes tyto interakce vázat na povrch bakterií, hub i členovců. Autoři vyslovili hypotézu, žeby hmyz mohl být přenašečem těchto virů, a spojení mimiviru s povrchem hub nebo bakterií by mohlo zvýšit rychlost jeho fagocytózy, jelikož améba se těmito mikroorganismy živí. (Rodrigues et al. 2015) Rovněž se uvažuje o tom, že by byl virus aktivně schopen nalákat svého hostitele, pomocí pohybu fibril, které mohou mimikovat pohyb bakterií, jež jsou pro améby potravou (Claverie et al. 2006). Všechny tyto hypotézy ovšem čekají na další experimentální ověření.

Struktura virionu je kromě přítomnosti fibril specifická i jiným speciálním útvarem. Tento vrcholový útvar byl, vlivem své pětičetné symetrie připomínající hvězdici, pojmenován hvězdicovitá brána („stargate“). (Zauberman et al. 2008) Struktura má pět ramen, která jsou tvořena odlišným proteinem, než který tvoří zbytek kapsidy. Střed hvězdicovité brány tvoří výduť, která spojuje povrch kapsidy s váčkem, ve kterém je umístěna genomová DNA. (Xiao et al. 2009) Tato brána slouží k uvolnění virové DNA do cytosolu. Když je virus fagocytován do fagocytického váčku, kapsida viru prochází konformačními změnami, při kterých se brána otevře a ve středu hvězdicovité brány se vytlačí lipidová membrána pod kapsidou, která fúzuje s membránou fagozomu za tvorby kanálu, kterým je mimivirový genom uvolněn do cytoplazmy hostitelské buňky. (Zauberman et al. 2008) Struktura hvězdicovité brány je vyobrazena na obrázku č. 5.



Obrázek č. 5 – Hvězdicovitá brána virionu APMV. Vlevo snímek pořízený na transmisním elektronovém mikroskopu, vpravo pro srovnání snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu. Převzato z (Zauberman et al. 2008).

3.1.1.2. Genom *Acanthamoeba polyphaga* Mimiviru



Obrázek č. 6 – Mapa genomu APMV. Sekvence kódující proteiny byly porovnány s databází klastrů ortologních genových skupin (COG). Sekvence, u nichž byly ortologní geny nalezeny, jsou označeny barevně a jsou spojeny s určitou funkční kategorií. E – metabolismus a transport aminokyselin, F – metabolismus a transport nukleotidů, J – translace, K – transkripce, L – replikace, rekombinace a opravy DNA, M – syntéza buněčné stěny nebo membrán, N – buněčný pohyb, O – posttranslační modifikace, metabolismus proteinů a chaperony, Q – biosyntéza, katabolismus a transport sekundárních metabolitů, R – pouze předpověď obecných funkcí, S – neznámá funkce. Sekvence bez nalezené shody v databázi COG jsou šedě. Malé červené šipky ukazují umístění a orientaci transferových RNA. Převzato z (Raoult et al. 2004)

Genom APMV je tvořen lineární dvouvláknovou molekulou DNA, která je dlouhá přibližně 1,2 Mbp. Mapu genomu zobrazuje obrázek č. 6. Jak je na první pohled zřejmé, většina sekvencí, které APMV kóduje nemá v databázích klastrů ortologních genů přímou shodu. Jedná se tedy o geny, jejichž obdoba nebyla doposud pozorována. Jedním z nejdůležitějších objevů při zkoumání genomu APMV byla identifikace sekvencí kódujících součásti translačního aparátu, přesněji čtyř aminoacyl-tRNA syntetázy a translačních faktorů uplatňujících se při iniciaci, elongaci a terminaci translace. Další popsané geny se uplatňují zejména během syntézy a metabolismu biopolymerů, při posttranslačních modifikacích, opravách a replikaci DNA. Topologie DNA a její změny během replikace je udržována třemi typy enzymů tzv. topoizomeráz. Topoizomeráza IA, je homologem k topoizomeráze entomopoxviru. Rovněž je v genomu kódována topoizomeráza IB bakteriálního typu. Poslední z kódovaných topoizomeráz je topoizomeráza IIA, jejíž homolog byl nalezen u zástupce třídy *Microsporidia*, *Encephalitozoon cunituli*, malého eukaryotického organismu. V genomu se nachází také celá řada sekvencí, které kódují

produkty velké části transkripčního aparátu. Jmenovitě to jsou dvě největší a čtyři menší podjednotky RNA polymerázy II, poly(A) polymeráza, enzym pro syntézu čepičky na 5' konec mRNA a řada transkripčních faktorů. Kromě sekvencí, které kódují součásti translačního aparátu, byly v genomu APMV nalezeny i další, ve virosféře unikátní, geny. (Raoult et al. 2004) Jejich výčet shrnuje tabulka č. 1.

ORF no.	Definition/putative function	Comment
R663	Arginyl-tRNA synthetase	Translation
L124	Tyrosyl-tRNA synthetase	Translation
L164	Cysteinyl-tRNA synthetase	Translation
R639	Methionyl tRNA synthetase	Translation
R726	Peptide chain release factor eRF1	Translation
R624	GTP-binding elongation factor eF-Tu	Translation
R464	Translation initiation factor SUI1	Translation
L496	Translation initiation factor 4E (mRNA cap binding)	Translation
R405	tRNA (Uracil-5-)-methyltransferase	tRNA modification
L359	DNA mismatch repair ATPase MutS	DNA repair
R693	Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase	DNA repair
R406	Alkylated DNA repair	DNA repair
L687	Endonuclease for the repair of UV-irradiated DNA	DNA repair
L315 L720	Hydrolysis of DNA containing ring-opened N7-methylguanine	DNA repair
R194 R480 L221	Topoisomerase I pox-like, topoisomerase II, topoisomerase I bacterial type	DNA accessibility
L254 L393	Heat shock 70-kD	Chaperonin
L605	Peptidylprolyl isomerase	Chaperonin
L251	Lon domain protease	Chaperonin
R418	NDK synthesis of nucleoside triphosphates	Metabolism
R475	Asparagine synthase (glutamine hydrolyzing)	Metabolism
R565	Glutamine synthetase (Glutamate-amonia ligase)	Metabolism
L716	Glutamine amidotransferase domain	Metabolism
R689	N-acetylglucosamine-1-phosphate, uridylyltransferase	Polysaccharide synthesis
L136	Sugar transaminase, dTDP-4-amino-4,6-dideoxyglucose biosynthesis	ExoPolysaccharide synthesis
L780	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	ExoPolysaccharide synthesis
L612	Mannose-6P isomerase	Glycosylation
L230	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase	Glycosylation, capsid structure
L543	ADP-ribosyltransferase (DraT)	?
L906	Cholinesterase	Host infection?
L808	Lanosterol 14-alpha-demethylase	Host infection?
R807	7-dehydrocholesterol reductase	Host infection?
R322	Intein insertion	In DNA polymerase B

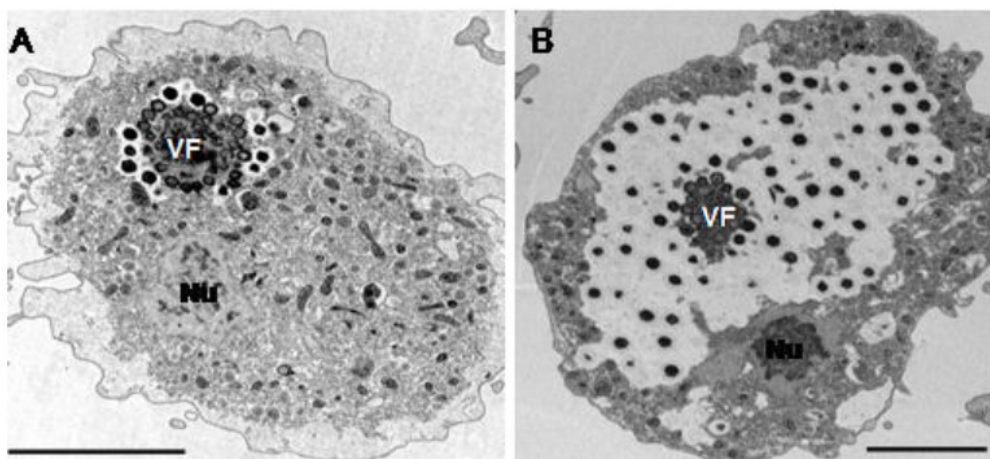
Tabulka č. 1 – Unikátní geny objevené v genomu APMV. V genomu APMV byly objeveny geny jejichž produkty se uplatňují během translace, oprav DNA (DNA repair), sbalování proteinů (chaperoniny), syntéze a metabolismu polysacharidů, posttranslačních modifikací (glykosylace) či při úpravě lipidů. Převzato z (Raoult et al. 2004)

3.1.1.3. Replikační strategie čeledi *Mimiviridae*

Sled kroků, které jsou uskutečňovány během replikační strategie APMV, je obecně platný i pro ostatní zástupce čeledi *Mimiviridae*. U jednotlivých zástupců se může lišit pouze doba manifestace jednotlivých dějů po infekci hostitele. Obecně platné schéma replikační strategie znázorňuje obrázek č. 8. Prvním krokem je vstup virových částic do hostitelské buňky. Tento proces je zajišťován pomocí fagocytózy (Suzan-Monti et al. 2007). Tato hypotéza byla experimentálně podpořena použitím cytochalasinu D, jakožto specifického inhibitoru fagocytózy a bafilomycinu, který je specifickým inhibitorem fagosomálních H⁺ ATPáz. Pro uvolnění viru z fagosomu je vyžadováno dosažení určité, dosud nespécifikované, hodnoty pH. Je-li zabráněno správné funkci H⁺ ATPáz vazbou bafilomycinu, nedochází k poklesu pH uvnitř fagosomu, čímž je viru znemožněno uniknout. Vlivem užití cytochalasinu D a bafilomycinu se počet virových částic v titru snížil. (Andrade et al. 2017) Uvolnění virové DNA do cytoplazmy je zajišťováno hvězdicovitou bránou, jejíž otevření indukuje expozici a následnou fúzi vnitřní virové a membránou fagozómu, čímž se vytvoří tunel, kterým je DNA dopravována k povrchu virové částice a dále do cytoplazmy améby (Suzan-Monti et al. 2007; Zauberman et al. 2008). Následuje ekliptická fáze, kdy nejsou žádné viry pozorovány, jelikož původní částice již zanikly a nové ještě nevznikly. Role jádra ve virové cyklu APMV nebyla doposud dostatečně

prozkoumána, ovšem existuje hypotéza jeho zapojení v iniciační fázi virového cyklu, ve které probíhá jedno kolo replikace virové DNA uvnitř jádra. (Suzan-Monti et al. 2007)

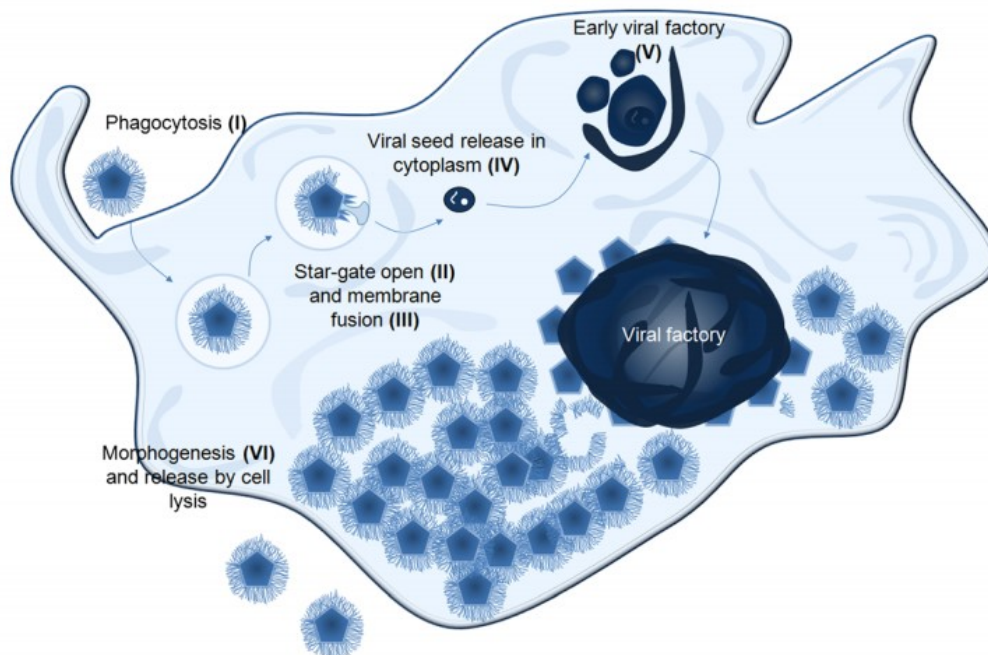
Přibližně 2 hodiny po infekci hostitele dochází v cytoplazmě k formování malých membránových váčků, které jsou odloučeny od jaderné membrány či drsného endoplazmatického retikula. Tyto jsou základem pro vznik membránových labyrintů, tzv. virových továren, uvnitř kterých probíhají procesy vedoucí k morfogenezi nových virionů. Mezi tyto procesy patří syntéza kapsidy s ikosahedrální symetrií a transport nukleové kyseliny do nově syntetizovaných virových částic. Tyto váčky v sobě pravděpodobně nesou součásti aparátu syntetizujícího proteiny včetně ribozomů. Agregace těchto malých váčků vrcholí přibližně 4–5 hodin po infekci hostitele vytvořením plnohodnotné virové továrny (Suzan-Monti et al. 2007; Kuznetsov et al. 2013). Obrázek č. 7 ukazuje virovou továrnu v průběhu replikačního cyklu.



Obrázek č. 7 – Virová továrna viru APMV. Na obrázku A je virová továrna (virus factories, VF) 8 hodin po infekci hostitele. Je možné pozorovat první maturované viriony na periferii virové továrny. Obrázek B zachycuje virovou továrnu 12 hodin po infekci buňky virem APMV. Buňka je prakticky zcela vyplněna novými viriony. Na obou obrázcích je vyznačeno i jádro (Nu) hostitelské améby. Převzato ze Suzan-Monti et al. 2007.

Ve virových továrnách dochází nejdříve k syntéze kapsidy. Aby tento proces mohl být zdárně dokončen, je nutné, aby na vnější vrstvě virových továren byly přítomny prekursorů kapsidového proteinu spolu s proteiny zodpovědnými za vznik struktury hvězdicovité brány. Syntéza kapsidy je zahájena vytvořením pentamerického centra hvězdicovité brány. Poté, co je dokončena syntéza kapsidy, dochází k syntéze vnější vrstvy složené patrně z proteinů inkorporovaných v lipidické membráně a inkorporaci virového genomu. (Kuznetsov et al. 2013) DNA je vpravována do kapsid na periferii virových továren (Suzan-Monti et al. 2007) a je do kapsid vkládána ve vysoce kondenzované formě spolu s řadou asociovaných proteinů (Mutsafi et al. 2013). Proces vkládání DNA do kapsidy není závislý na stupni maturace jednotlivých virionů. Na záběrech z TEM byly pozorovány dva typy částic. Ty, jejichž povrch byl pokryt fibrily úplně, i ty které byly pokryté jen řídce. Genom byl vkládán do obou zmíněných částic. Povrchové fibrily jsou ke kapsidě připojovány na periferii virové továrny, v oblasti nazývané jako oblast

získávání vláken (z angl. fibrils acquisition area). (Andrade et al. 2017) Pro upřesnění složení virové částice a její morfologie bude třeba dalšího výzkumu.



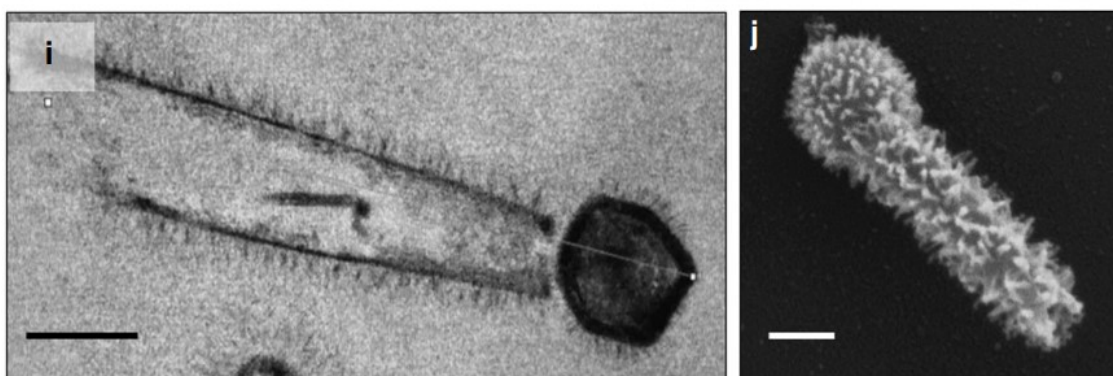
Obrázek č. 8 – Schéma replikační strategie virů čeledi *Mimiviridae*. Replikační cyklus začíná fagocytózou (I) a následným otevřením hvězdicovité brány „stargate“ (II) a fúzí virové a endosomální membrány (III). Poté, co je DNA uvolněna do cytoplazmy hostitele (IV), dochází k vytvoření virové továrny (V). Replikační strategie je ukončena morfogenezí nových částic z povrchu virové továrny a lýzí hostitelské buňky (VI). Převzato z (Abrahão et al. 2014).

3.1.2. Další významní zástupci čeledi *Mimiviridae*

Dalším významným zástupcem linie A čeledi *Mimiviridae* je *Acanthamoeba polyphaga mamavirus* (APMaV). Tento nejbližší fylogenetický příbuzný mimiviru byl izolován ze vzorku vody z chladicí věže v Paříži. Jedná se o prvního zástupce gigantických virů, v jehož genomu bylo nalezeno více než 1 000 otevřených čtecích rámců. (Colson, Yutin, et al. 2011) Důležitým objevem ve spojitost s APMaV byl objev virofága *Sputnik*. Virofág využívá aktivity replikačního cyklu gigantického viru pro to, aby byl sám schopen dokončit svoji vlastní replikaci v amébě (La Scola et al. 2008). Téma virofágů je podrobněji diskutováno v kapitole 4.

Megavirus chilensis je virus zastupující linii C. S hodnotou 1,259 Mbp se jedná o virus s jedním z nejdělsích popsanych genomů. V jeho genomu se nachází sedm genů pro aminoacyl tRNA syntetázy. Výjimečná je i přítomnost 11 transkripčních faktorů, proteinu funkčně podobného TATA-box vázajícímu proteinu či enzymů zajišťujících opravu DNA – DNA fotolyázu a uridin monosfát kinázu, enzym doposud nenalezený v genomu DNA virů. Genom megaviru chilensis kóduje i enzym superoxidodismutáza, která je uplatňována během oxidativního stresu, kdy katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu na molekulární kyslík a peroxid vodíku. (Arslan et al. 2011; Legendre et al. 2012)

Posledními, v letošním roce objevenými, zástupci zařazenými do čeledi *Mimiviridae* jsou viry rodu *Tupanvirus*. Jde o velmi specifický rod virů, ať už ve smyslu morfologie jeho virionů či funkční komplexnosti jeho genových produktů. Oba zástupci tohoto rodu virů byli izolováni z prostředí, jehož podmínky můžeme označit za extrémní. První z nich, *Tupanvirus Soda lake*, byl izolován z vody brazilského jezera, která vykazuje extrémní salinitu i pH. Druhý *Tupanvirus deep ocean* byl objeven ve vodách Atlantického oceánu v hloubce tři kilometrů. Viriony těchto virů jsou tvořeny ze dvou částí – kapsidy a „ocásku“. Kapsida má ikosahedrální symetrii o velikosti přibližně 450 nm, je pokryta fibrilami a obsahuje i strukturu hvězdčovitě brány. Virová částice je prodloužena o dosud nejdelší ocásek nalezený v celé virosféře, jehož délka se pohybuje v rozmezí 450–550 nm. Morfologie virionu tupanvirů je zobrazena na obrázku č. 9. Tupanviry v sobě ukrývají dosud objevený čtvrtý nejdelší virový genom, jehož délka činí 1,439 Mbp pro *Tupanvirus Soda lake* a 1,516 Mbp pro *Tupanvirus deep ocean*.



Obrázek č. 9 – Morfologie virionu *Tupanviru Soda lake*. Obrázek (i) představuje záběr z TEM po negativním barvení. Na obrázku je možné pozorovat kapsidu s ikosahedrální symetrií i dlouhý ocas *Tupanviru*. Celá částice je pokryta fibrilami, což je lépe pozorovatelné na záznamu z SEM, který představuje obrázek (j). Převzato z (Abrahão et al. 2018).

Mimo fascinující morfologii virionů je tento virus unikátní i přítomností prozatím největšího množství komponent translačního aparátu v celé virosféře. *Tupanvirus deep ocean* kóduje geny pro 20 aminoacyl tRNA syntetáz, 70 tRNA pro všech 21 aminokyselin s výjimkou selenocysteinu a 11 translačních faktorů, které se uplatňují při iniciaci, elongaci i terminaci translace. Rovněž byly objeveny faktory uplatňující se při maturaci a stabilizaci tRNA, maturaci mRNA, alternativním sestřihu mRNA a faktory spojené s modifikací ribozomálních proteinů. V průběhu infekce byl popsán pozoruhodný fenomén. Přítomnost virové částice tupanvirů indukuje snížení počtu hostitelské rRNA. Během infekce tupanviry dochází uvnitř cytoplazmy hostitele k výraznému snížení pH, degradaci jádra spolu s jadérkem a indukované tvorbě malých váčků odloučených z oblasti jaderné membrány. Tyto váčky, obsahující ribozomy, následně agregují a formují obrovské struktury obsahující velký počet ribozomů. Mechanismus a význam tohoto jevu je předmětem dalšího výzkumu. (Abrahão et al. 2018)

3.2. *Marseilleviridae*

Čeď *Marseilleviridae* reprezentuje čeď NCLDV virů, jejichž velikost je ve srovnání s ostatními gigantickými viry poměrně nižší. Velikost virových částic se pohybuje v rozmezí 200–250 nm s délkou genomu v průměru 360 kbp. (Colson, Pagnier, et al. 2013; Colson, La Scola, a Raoult 2017) Marseillevirus, první objevený zástupce, po němž nese čeď své jméno, byl izolován ze vzorku vody z chladicí nádrže v Paříži. (Boyer et al. 2009) Specifikem této čeledi je diverzita míst a vzorků, ze kterých byly tyto viry izolovány. Některé viry byly izolovány ze vzorků lidské krve, či stolice, čímž v době jejich objevu vyvstala otázka, zda zástupci čeledi *Marseilleviridae* představují zdravotní riziko pro člověka. S přibývajícím objevy došlo k významnému rozšíření čeledi, která v současnosti obsahuje 5 linií virů (A–E) a další dva nezařazené rody virů. Vnitřní klasifikaci čeledi *Marseilleviridae* prezentuje tabulka č. 2 (Colson, La Scola, a Raoult 2017). Stejně jako v případě čeledi *Mimiviridae*, nebyla tato klasifikace prozatím schválena ICTV. Prvním objeveným zástupcem této čeledi je *Marseillevirus*. Jeho viriony jsou pokryté fibrily, které dosahují délky přibližně 12 nm (Boyer et al. 2009). Jeho relativně menší velikost hraje významnou roli již v první fázi virového cyklu, během fagocytózy virové částice. Velikost fagocytovaných částic by měla v průměru dosahovat alespoň 500 nm (Arantes et al. 2016 podle Weisman a Korn 1967), což je podmínka, kterou virionu marseilleviru nespĺňují. V kontextu této informace byly zkoumány metody vstupu viru do buňky. Marseillevirus vstupuje do buňky dvěma způsoby. První popsanou cestou vstupují izolované částice do cytoplazmy pomocí endocytózy. Druhou možností je vstup viru ve formě membránového váčku naplněného virovými částicemi. Tento váček je hostitelskou buňkou fagocytován. Váčky jsou syntetizovány po dokončení maturace virionů v periferní oblasti virové továrny a dosahují velikosti až 500 nm. (Arantes et al. 2016) Obrázek č. 10 zobrazuje strukturu membránových váčků marseilleviru.



Obrázek č. 10 – Struktura membránového váčku. Záběr z transmisního elektronového mikroskopu zachycující váček, jehož syntéza probíhá na periférii virové továrny Marseilleviru. Váček schraňuje částice Marseilleviru a umožňuje jejich vstup do hostitelské buňky pomocí fagocytózy. Převzato z (Arantes et al. 2016).

Linie	Název viru	Velikost virové částice (nm)	Morfologie virionu	Velikost genomu (kbp)
A	Marseillevirus marseillevirus T19	250	ikosahedrální	368
	Cannes 8 virus	250	ikosahedrální	374
	Senegalvirus marseillevirus	250	ikosahedrální	373
	Melbournevirus	250	ikosahedrální	369
B	Lausannevirus	250	ikosahedrální	347
	Port-Miou virus	-	ikosahedrální	349
C	Tunis virus	250	ikosahedrální	380
	Insectomime virus	225	ikosahedrální	386
	Tokyovirus A1	200	ikosahedrální	373
D	Brazilian marseillevirus	250	ikosahedrální	362
E	Golden marseillevirus	200	ikosahedrální	361
nezařazeno	Noumeavirus	200	ikosahedrální	376
nezařazeno	Kurlavirus BKC-1	-	ikosahedrální	361

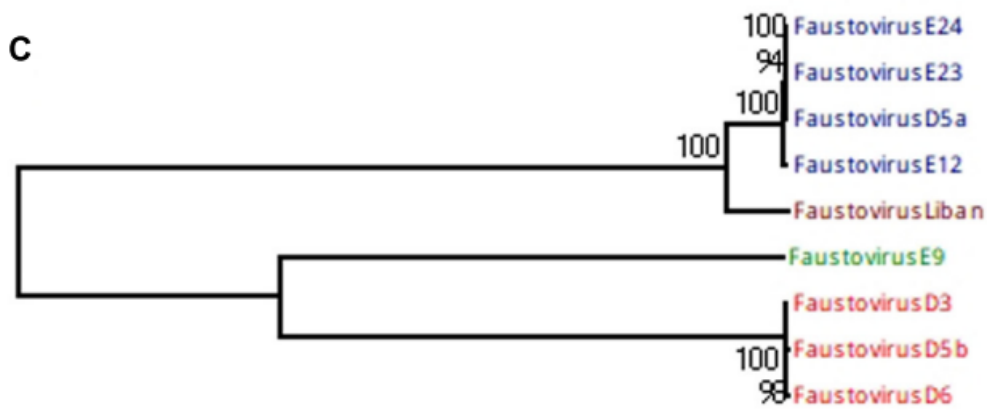
Tabulka č. 2 – Vnitřní klasifikace čeledi *Marseilleviridae*. Čeleď je složena z linií A-E a obsahuje navíc další 2 rody virů, jejichž fylogenetická příbuznost s ostatními liniemi nebyla prozatím zkoumána. Převzato a upraveno z (Colson, La Scola, a Raoult 2017).

Po vstupu viru do buňky dochází k vytvoření virových továren. Virové továrny Marseilleviru zabírají až polovinu cytoplazmy hostitele. V továrnách dochází k morfogenezi nových virionů. V buňkách jsou produkovány jednak samostatné viriony, jednak viriony sdružené do membránových váčků. (Arantes et al. 2016)

Často diskutovaným tématem bývá vliv přítomnosti virů z čeledi *Marseilleviridae* v lidském těle na zdraví infikovaného jedince. V lidském těle byly objeveny dva viry, které byly na základě fylogenetické analýzy zařazeny do čeledi *Marseilleviridae*. V obou případech byly viry objeveny ve vzorku od zdravého pacienta, který netrpěl symptomy žádného onemocnění. „Giant blood virus“ (GBV) byl objeven v krvi dárců metodou pyrosekvenování DNA z frakce obsahující vysoké procento virových genomů (Popgeorgiev, Boyer, et al. 2013). „Senegalvirus“ byl izolován ze vzorku lidské stolice (Colson, Fancello, et al. 2013). Na základě stávajících výsledků lze říci, že ani jeden z identifikovaných virů nepředstavuje pro pacienta s funkčním imunitním systémem žádné zdravotní riziko (Popgeorgiev, Colson, et al. 2013).

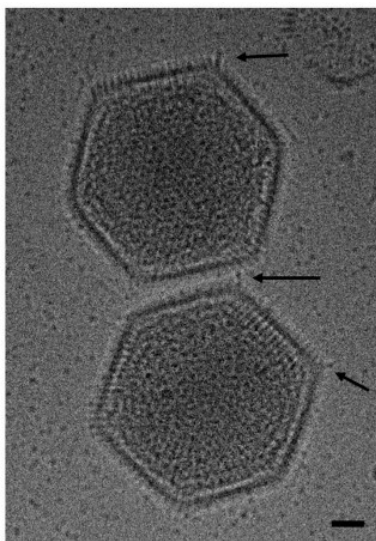
3.3. Faustoviry

Faustoviry jsou skupinou gigantických virů infikující améby rodu *Vermamoeba vermiformis* a fylogeneticky jsou blízkými příbuznými virů z čeledi Asfarviridae. (Reteno et al. 2015). Faustoviry jsou jedinečné tvorbou dvou morfologicky odlišných typů virových částic (Klose et al. 2016). V současné době bylo popsáno devět různých virů rodu Faustovirus. Jejich výčet a vzájemné fylogenetické vztahy zobrazuje obrázek č. 11 (Benamar et al. 2016).



Obrázek č. 11 – Fylogenetický strom virů rodu *Faustovirus*. Na základě fylogenetické analýzy 207 genů vyskytujících se v genomech virů rodu *Faustovirus*, byli zástupci tohoto rodu rozděleni do čtyř různých linií. Modře je označena linie M, hnědě linie L, zeleně linie E9 a červeně linie D. Převzato z (Benamar et al. 2016).

Vírové částice faustoviru mají ikosahedrální symetrii a jsou velké přibližně 200 nm. Jedinečnost jejich genomu spočívá v organizaci genu pro hlavní kapsidový protein, který má 11 exonů. Ty jsou přerušovány sérií intronů. Vlivem alternativního sestřihu mRNA dochází k odlišnému uspořádání následně syntetizovaného hlavního kapsidového proteinu. Díky této odlišnosti jsou vytvářeny dva typy virových částic – ostnaté a hladké. Ostnaté částice jsou větší, mají velikost přibližně 260 nm, zatímco částice hladké jsou velké 160–190 nm. Pozorování virionů na transmisním elektronovém mikroskopu ukázalo uvnitř ostnatých částic útvary podobné částicím hladkým. Následně bylo potvrzeno, že struktura menších hladkých částic je shodná s vnitřkem částic ostnatých. *Faustovirus* je tak prvním objeveným virem s dvouvláknovou DNA, který má dvouvrstevnou kapsidu. Proteinový motiv „double jelly-roll fold“, typický pro velkou část NCLDV, byl objeven pouze u vnější proteinové schránky. Vnitřní proteinová schránka je pravděpodobně tvořena jedním nebo více proteiny, které není podobný běžným kapsidovým proteinům. Povrch virových částic není kryt celistvou vrstvou fibril. Specifickým místem výstupu fibril jsou pětičetné vrcholy, odkud vystupují tři drobné fibrily o velikosti 5 nm, takzvané ostny. (Klose et al. 2016) Struktura virionu a fibrily faustoviru jsou zobrazeny na obrázku č. 12.



Obrázek č. 12 – Struktura ostnaté částice faustoviru. Snímek z TEM demonstruje kapsidu s ikosahedrální symetrií. Virus není pokryt hustou vrstvou fibril, nýbrž tvoří drobné snopce fibril, tzv. ostny, v pětičetných vrcholech kapsidy. Osten je znázorněn šipkou. Převzato z (Klose et al. 2016)

3.3.1. Replikační strategie faustovirů

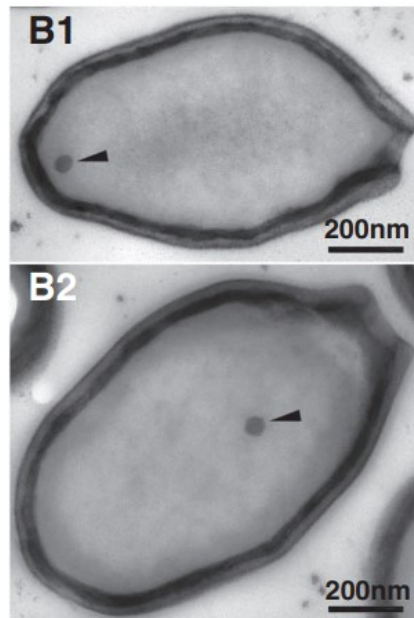
Po fagocytóze viru hostitelskou buňkou je zahájena fúze vnitřní virové lipidové membrány s membránou fagozómu, čímž dochází k uvolnění genomu viru skrze kanál do cytoplazmy hosteitele. Genom *Faustoviru E12* je tvořen dvouvláknovou molekulou DNA o délce přibližně 466 kbp. Během ekliptické fáze dochází ke změně v aktivitě i změně ve vnitřní organizaci jádra. Jádro ztrácí svůj sférický tvar. V další fázi dochází ke vzniku virových továren, které již 8 hodin po infekci produkují první maturované částice. Přibližně po 20 hodinách dochází k lyzi hostitelské buňky. (Reteno et al. 2015)

3.4. Pandoraviry

Po objevu virů z čeledi *Mimiviridae* a zejména jejich největšího zástupce, *Megavirus chilensis*, rezonovaly ve vědeckém světě otázky, zda je tato velikost virionů konečná, či jak velký může gigantický virus být? Částečnou odpověď na tyto otázky přinesl objev dvou částic vejcovitého tvaru, které na délku měří 1 μm a široké jsou přibližně 500 nm. Tyto částice byly objeveny na odlišných místech naší planety a odlišná byla i prostředí jejich výskytu. *Pandoravirus salinus* (PS) byl izolován z vrstvy mořského sedimentu na pobřeží Chile, zatímco *Pandoravirus dulcis* (PD) byl objeven ve vzorku bahna z mělkého sladkovodního jezírka v Austrálii. Morfologii virionu PS a PD demonstruje obrázek č.13. Velikost jejich virionů ovšem nebyla jediným překvapením, které na jejich objevitele čekalo. Při zkoumání jejich genomu bylo zjištěno, že se jedná o viry s nejdelším genomem z celé virosféry. Genom PS je velký 2,47 Mbp a obsahuje 2 556 genů kódujících proteiny, zatímco PD ukrývá uvnitř své kapsidy DNA o délce 1,9 Mbp, ve které bylo identifikováno 1 502 otevřených čtecích rámců. (Philippe et al. 2013) V úplně odlišném prostředí se vyskytoval třetí zástupce této skupiny virů. Byl izolován již v roce 2008 ve vzorku lidských buněk pacienta trpícího zánětem rohovky, ale vlivem nesprávné identifikace, byl *Pandoravirus inopinatum* znovuobjeven jako virus v Německu až v roce 2016. Velikost jeho genomu je 2,24 Mbp. (Scheid 2016) V létě letošního roku byly popsány 3 další pandoraviry: *Pandoravirus quercus*, objevený ve Francii, *Pandoravirus neocaledonia* pocházející z ostrova Nová Kaledonie v Tichém oceánu a *Pandoravirus macleodensis* objevený v Austrálii. Všechny 3 pandoraviry byly popsány skupinou Jean-Michel Claverie objevitelem virů *Pandoravirus dulcis a salinus* (Legendre et al. 2018). Ve stejné době byla publikována práce (Aherfi et al. 2018), popisující další 3 pandoraviry, *Pandoravirus pampulha*, *Pandoravirus braziliensis a Pandoravirus massiliensis* nalezené v Brazílii. *Pandoravirus braziliensis* má genom ještě o 200 kbp delší (2,69 Mbp) než dosud nejdelší genom *Pandoraviru salinus*. (Aherfi et al. 2018)

Analýzou genomu *Pandoraviru salinus* bylo zjištěno, že majoritní část (93 %) jeho protein kódujících sekvencí nemá homology v současných databázích a že s ostatními gigantickými viry améb sdílí pouze 17 protein kódujících sekvencí, z čehož vyplývá, že pandoraviry tvoří samostatnou vývojovou větev, která je fylogeneticky vzdálená od ostatních gigantických virů améb. Z analýzy genomu rovněž vyplývá, že pandoraviry nekódují homolog žádného ze známých hlavních kapsidových

proteinů. (Philippe et al. 2013) Selhaly i pokusy o nalezení sekvence, která by mohla pravděpodobně kódovat ještě neznámý kapsidový protein. Fylogenetická analýza genů, které genom pandoravirů sdílí s ostatními zástupci NCLDV, odhalila fylogenetickou příbuznost k *Emiliana huxleyi viru*, zástupci čeledi *Phycodnaviridae* (Yutin a Koonin 2013).



Obrázek č. 13 – Struktura virionu *Pandoravirus salinus* (B1) a *Pandoravirus dulcis*. (B2). Zástupci rodu *Pandoravirus* mají vejcovité viriony s výraznou vrstvou 70 nm silného tegumentu. Viditelná je i struktura apikálního póru, který umožňuje fúzi vnitřní virové membrány s membránou fagosomu, čímž umožňuje uvolnění virového genomu do cytoplazmy hostitele. Šípkami jsou označeny přibližně 50 nm velké útvary tvořené materiálem s vysokou hodnotou elektronové hustoty. Převzato z (Philippe et al. 2013).

3.4.1. Replikační strategie rodu *Pandoravirus*

Stejně fáze replikačního cyklu byly pozorovány u obou studovaných pandoravirů *Pandoravirus salinus* i *Pandoravirus dulcis*. Oba viry dokončují svoji replikační strategii přibližně 10–15 hodin po infekci hostitele. Po tom, co je virová částice fagocytována, se uvolňuje z fagosomu. To zajišťuje unikátní struktura apikálního póru, jehož otevřením dochází k fúzi vnitřní lipidové membrány viru s fagosomální, čímž dochází k uvolnění genomu viru do cytoplazmy hostitele. Následuje ekliptická fáze, během níž podobně jako u jiných gigantických virů dochází k výrazné změně ve struktuře jádra i jadérka. Vzhledem k tomu, že v genomu pandoravirů nebyl nalezen gen pro RNA polymerázu, je pravděpodobné, že časná transkripce genů se odehrává s účastí enzymu z jádra hostitele. Dalším důvodem podporujícím pozorovanou migraci virové DNA do oblasti jádra je přítomnost intronových sekvencí v genomu pandoravirů. Vzhledem k tomu, že virus nedisponuje sestříhovým aparátem, je zřejmé, že pro tyto účely využívá sestříhový aparát svého hostitele. (Philippe et al. 2013; Legendre et al. 2014) Ztráta sférického tvaru jádra odstartuje kaskádu přeměn, během níž dojde k úplné disperzi jadérka a současně se začínají objevovat váčky odloučené od jaderné membrány. Syntéza nových virionů probíhá v periferní oblasti jádra a na rozdíl od jiných gigantických virů améb probíhá syntéza

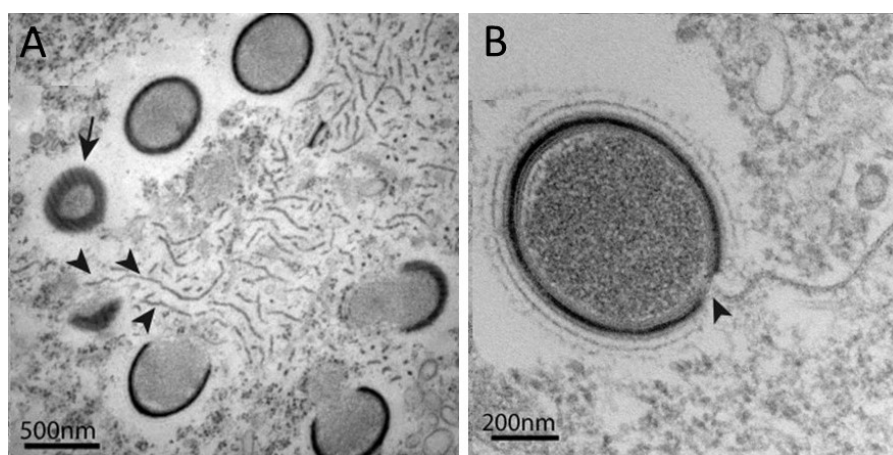
vnitřní i vnější části virionu souběžně. Virový cyklus končí lyzí hostitelské buňky, čímž se najednou uvolní okolo stovky nových virionů. (Philippe et al. 2013)

3.5. *Mollivirus sibericum*

Gigantickými viry dob minulých bychom mohli nazvat skupinu virů, jež byla objevena ve vzorku permafrostu ze Sibíře. Vzorek této trvale zmrzlé půdy byl dle dostupných informací 30 000 let starý a obsahoval dva nově objevené zástupce ze skupiny gigantických virů. Jeden z těchto virů tvoří viriony kruhového tvaru, ohraničené dvěma soustřednými kružnicemi různě dlouhých fibril. Tyto viriony, velké 500–600 nm v průměru, patří viru *Mollivirus sibericum*. Stejně jako u zástupců rodu *Pandoravirus* má morfologie virionu jeden, na první pohled okamžitě viditelný, znak a sice vrstvu tegumentu tvořenou materiálem s výrazně odlišnou hodnotou elektronové hustoty oproti svému okolí. Virion molliviru je na obrázku č. 14B. Genomem o velikosti 651 kbp je kódováno 523 proteinů a 3 tRNA. (Legendre et al. 2015)

3.5.1. Replikační strategie *Molliviru sibericum*

Vstup viru do hostitelské buňky je zajišťován rovněž pomocí fagocytózy. Viriony obsahují portál, který tvoří ve virionu prohloubení velké přibližně 160–220 nm. Role tohoto portálu spočívá v dopravení virové DNA do cytoplazmy, čehož je docíleno pomocí indukce fúze vnitřní virové a endosomální membrány. Pomocí metody fluorescenčního značení bylo objeveno, že virová DNA následně migruje do jádra hostitele, kde svojí přítomností vyvolává kaskádu změn v morfologii jádra samotného. V periferní oblasti jádra dochází i k syntéze nových virionů. V místech morfogeneze virionů se nachází množství vláknitých struktur (obrázek č. 14A). Hotové viriony se často nacházejí ve vakuolách, z čehož autoři studie usuzují, že většina virionů je z buňky uvolňována exocytózou. (Legendre et al. 2015)



Obrázek č. 14 – A: Ukázka místa morfogeneze virionů. Hlavičky šipek ukazují vláknité struktury. Šipka ukazuje organizaci tegumentu virové částice. B: Virová částice *Molliviru sibericum*. Snímek z TEM zobrazuje sférickou částici *Molliviru*, která je ohraničena silnou vrstvou tegumentu. Částici pokrývají fibrily o různé délce, což kolem virionu vytváří dvě soustředné kružnice. Šipka označuje apex, který indukuje fúzi virové a fagosomální membrány během stádia pozdní morfogeneze virionu. Jedno z mnohých vláken vyplňujících oblast morfogeneze virionu bývá reprodukovatelně vidět ve spojení s apexem. Převzato z (Legendre et al. 2015).

3.6. Pithoviry

3.6.1. *Pithovirus sibericum*

Živoucí fosilie. Tímto termínem můžeme označit hlavního zástupce navržené, dynamicky se zvětšující skupiny podobných virů – *Pithovirus sibericum*. Jeho stáří je datováno 30 000 let z doby pozdního Pleistocénu. *Pithovirus sibericum*, největší ze všech popsanych virů, byl izolován spolu s Mollivirem sibericum ze vzorku permafrostu odebraného v Kolymské nížině na severozápadě Jakutska (Sibiř, Rusko). Jeho protáhnuté viriony, oválného tvaru, dosahují velikost přibližně 1,5 μm na délku a jsou široké v průměru 600–900 nm. Morfologie virových částic se vyznačuje přítomností 60 nm silné obálky a tubulárním útvarem, který se táhne podél středové osy virionu až k samotnému apikálnímu póru. Genom pithoviru je překvapivě vzhledem k velikosti virionu „malý“, pouhých 610 kbp a obsahuje 467 sekvencí kódujících proteiny. (Legendre et al. 2014) Morfologii virové částice Pithoviru sibericum prezentuje obrázek č. 15. V souvislosti s objevem dalších virů, které jsou fylogeneticky příbuzné s Pithovirem, byla navržena nová čeleď *Pithoviridae*, zahrnující viry rodu *Pithovirus* spolu s rodem *Cedratvirus* (Andreani et al. 2016).



Obrázek č. 15 – Virová částice *Pithoviru sibericum*. Snímek z TEM zobrazuje 1,5 μm dlouhou virovou částici 30 000 let starého viru. Virion je krytý 60 nm silnou obálkou. V apikální části se nachází „zátka“, jež umožňuje rozbalení virové částice uvnitř hostitele. Šipka ukazuje na tubus, který se táhne podél středové osy virionu, jehož úlohou je dopravovat virový genom do cytoplazmy hostitele. Převzato z (Legendre et al. 2014).

3.6.1.1. Replikační strategie *Pithoviru sibericum*

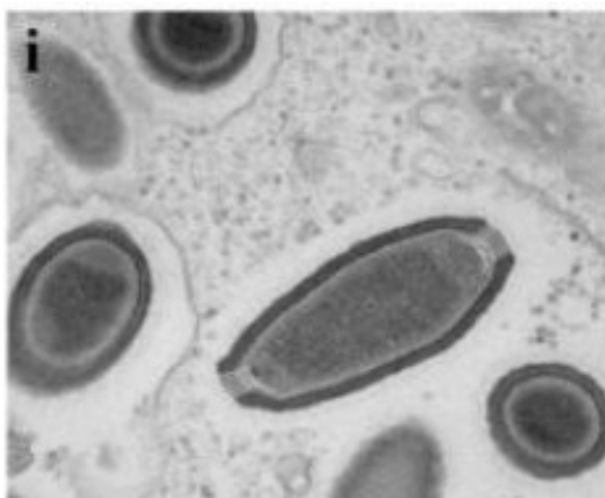
Stejně jako u jiných zástupců NCLDV je prvním krokem jeho replikačního cyklu fagocytóza virových částic hostitelem. Otevření apikálního póru umožňuje fúzi vnitřní virové membrány s membránou fagosomu a vstup virové DNA do cytoplazmy hostitele. Postupně se objevující váčky dávají vzniknout virové továrně, které na svém povrchu produkují první maturované viriony asi 4–6 hodin po infekci. Na rozdíl od jiných virů, není finální morfologie virionu ustanovena okamžitě.

Nejprve dochází k syntéze částic, které mají tvar vzdáleně připomínající obdélníky. Teprve poté, kdy je vnější stěna dostatečně zesílena, dosáhnou viry oválné morfologii virionu. Obálka viru je syntetizovaná postupně v průběhu procesu maturace jednotlivých virionů. Maturované viriony opouští hostitele dvěma způsoby – pomocí lyze buňky či exocytózou. (Legendre et al. 2014)

Později byl objeven další pithovirus, vykazující velmi vysoké množství (93,5 %) ortologních genů vůči *Pithovirus sibericum*. Přítomnost tak vysokého procenta ortologních virů naznačuje vysokou evoluční konzervovanost tohoto rodu virů. Nově objevený virus byl pojmenován *Pithovirus massiliensis*. (Levasseur, Andreani, et al. 2016)

3.6.2. *Cedratvirus*

Nově objevený rod unikátních gigantických virů, nesoucí název *Cedratvirus*, zaujal vědeckou komunitu zejména strukturou jeho virových částic. Jedná se o rod virů fylogeneticky příbuzných s pithoviry, s nimiž sdílí i hlavní morfologické znaky virionu. Zvláštností cedratviru je přítomnost struktury „zátky“ na obou apexech virion. Význam přítomnosti druhé „zátky“ je prozatím předmětem dalšího zkoumání. Unikátní struktura virionu je ukázána na obrázku č. 16. *Cedratvirus A11* má viriony o velikosti 1–1,2 μm a jeho je genom 589 kbp dlouhý. (Andreani et al. 2016) Rod *Cedratvirus* má v současné době tři zástupce – *Cedratvirus A11*, *Cedratvirus lausannensis* a *Cedratvirus getuliensis* (Andreani et al. 2016; Bertelli et al. 2017; Silva et al. 2018).



Obrázek č. 16 – Virová částice Cedratviru. Snímek z TEM zobrazuje virovou částici Cedratviru. Na obrázku jsou vidět 2 apikální struktury „zátky“ a silná vrstva tegumentu ohraničující virovou částici. Apikální „zátka“ hraje významnou roli během uvolňování virové DNA z virionu/fagosomu do cytoplazmy hostitele. Význam přídatného apikálního korku nebyl doposud objasněn. Převzato z Andreani et al. 2016.

3.6.2.1. Replikační strategie rodu *Cedratvirus*

Replikační cyklus cedratviru začíná stejně jako u většiny ostatních zástupců NCLDV fagocytózou virové částice. Přítomnost dvou apikálních zátkových struktur nemá, dle dosavadních informací, přímý vliv na průběh uvolňování DNA do cytoplazmy hostitele. Indukci fúze virové a fagosomální membrány zajišťuje pouze jeden apex. (Andreani et al. 2016) Virové továrny jsou rozděleny na dvě části, přičemž

každá má svoji definovanou funkci. V jedné z nich dochází k morfogenezi nových virionů, v druhé k syntéze a přenosu povrchových fibril. V průběhu replikačního cyklu dochází uvnitř hostitelské buňky k reorganizaci její struktury, což se projevuje například shlukováním mitochondrií kolem a uvnitř virových továren či postupnou akumulací struktur. Stejně jako v případě pithoviru jsou částice cedratviru skládány postupně. Nejprve jsou vidět částice přibližně 100 nm velké, které mají tvar půlměsíce. V dalších krocích dochází k protahování částice, jejíž tvar tak postupně připomíná kancelářskou sponku či podkovu. V této fázi již můžeme viditelně rozlišit první zátkovou strukturu na pólu, který byl místem počátku syntézy. Finální kroky syntézy tvoří naplnění virionu genomem, uzavření kapsidy a syntéza druhého zátky. Poté získává virion povrchové fibrily a maturuje na periferii virové továrny. Replikační cyklus je ukončen lyzí hostitelské buňky. Exocytóza jako druhá možnost odchodu virionů ven z hostitelské buňky byla rovněž pozorována. (Silva et al. 2018)

4. Virofágy gigantických virů améb

Viry, infekční a obligátně patogenní agens, napadají zástupce všech tří domén života (Lwoff 1957; Xiang et al. 2005). Objev gigantických virů améb přinesl nejen nový pohled na to, co je to virus, ale také poznání existence menších virů, které dokáží své gigantické protějšky úspěšně infikovat. Tato unikátní skupina virů byla nazvána virofágy. (La Scola et al. 2008) Dosud známé virofágy jsou DNA viry, jejichž replikace probíhá uvnitř virových továren jiného viru. Je tedy nutné, aby byla replikace obou virů realizována současně v jednom hostiteli. Virofágy jsou, stejně jako jiné viry, parazitickými agens. Jejich infekce má na hostitele patogenní účinky, podobně jako řada známých virů na své buněčné hostitele. Vlivem jejich aktivity dochází k znehodnocení struktury virionu hostitelského gigantického viru (La Scola et al. 2008), nebo je snížena produkce virionů hostitelského viru (Sun et al. 2010).

4.1. Virofágy rodu *Sputnik*

Prvním popsáním virofágem je *Sputnik 1*, který byl objeven ve virových továrnách *Acanthamoeba polyphaga Mamaviru* (APMaV), zástupce čeledi *Mimiviridae* (La Scola et al. 2008). Jedná se o malý neobalený virus o průměru 74 nm (Sun et al. 2010). Genom je tvořen kruhovou dvouvláknovou molekulou DNA dlouhou 18 343 bp. Třináct, z celkových 21, genomem kódovaných proteinů, nemá homology v současných proteinových databázích. V genomu byly nalezeny tři geny, které dle fylogenetické analýzy mají nejbližší homology v APMV a APMaV. Přítomnost těchto genů naznačuje, že je možné, aby během infekce virofágem docházelo v rámci rekombinace i k výměně jednotlivých genů mezi virofágem a jeho gigantickým virem replikujícím se ve stejné buňce. (La Scola et al. 2008) Replikační strategie virofága *Sputnik* je přímo závislá na gigantickém mamaviru. Do buňky vstupuje virofág fagocytózou, přichycený na virových částicích APMaV. (Desnues a Raoult 2010) Na povrchu kapsidy virofága se nacházejí drobné fibrily, jejich přítomnost může virofágu napomáhat s přichycením na částice APMaV (Sun et al. 2010). Genom virofága je uvolňován z kapsidy patrně vlivem nízkého pH

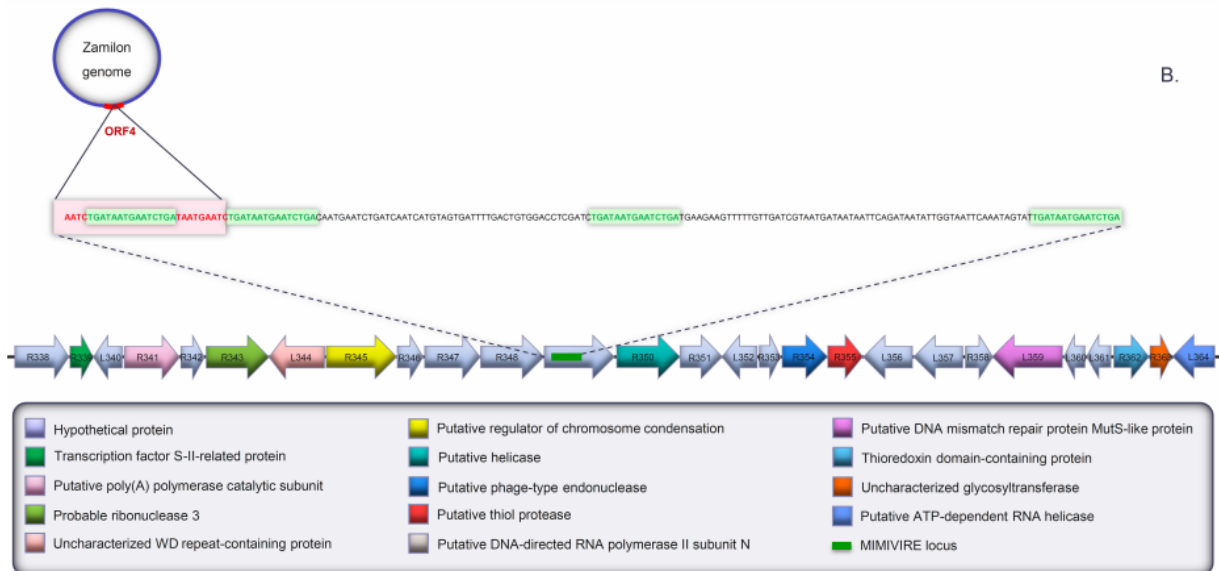
ve fagosomu, které způsobuje konformační změnu a odpadnutí jednoho z pentamerů tvořících kapsidu (Zhang et al. 2012). Po ustanovení virových továren, jejichž tvorbu indukuje APMaV, dochází k syntéze virionů virofága *Sputnik*, a to v odlišné části virových továren, než kde probíhá syntéza virionů APMaV. Maturace virových částic virofága *Sputnik* nastává výrazně dříve, než je dokončena syntéza virionů mamaviru. Replikační cyklus končí lyzí hostitelské buňky. (Desnues a Raoult 2010) V průběhu virového cyklu byly pozorovány defektní částice APMaV. Tyto jsou pravděpodobně poškozeny přítomností virofága *Sputnik*, jelikož v jeho nepřítomnosti nebyly tyto defektní částice pozorovány. Poškození virových částic spočívá v akumulaci kapsidových vrstev na pólu virionu APMaV, čímž dochází ke ztlouštění dané oblasti až na šestnásobek původní šířky. (La Scola et al. 2008)

Dalšími objevenými virofágy rodu *Sputnik* jsou *Sputnik 2*, který byl izolován spolu se svým hostitelským virem, Lentillevirem – zástupcem linie A čeledi *Mimiviridae*, izolován z roztoku kontaktních čoček pacienta trpícího zánětem rohovky (Deesnues et al. 2012) a *Sputnik 3*, který byl detekován pomocí metody PCR ve vzorku půdy (Gaia et al. 2013).

4.2. Virofágy druhu *Zamilon*

Významným zástupcem virofágů je virus *Zamilon*. Jeho objev odkryl unikátní procesy, které nebyly v kontextu virů nikdy předtím uvažovány. Tento virus, jehož částice mají sférický tvar a velikost přibližně 60 nm, byl objeven ve virových replikačních továrnách viru *Mont1*, zástupce linie C čeledi *Mimiviridae*. Genom tohoto viru tvoří kruhová dvouvláknová molekula DNA o velikosti 17 276 bp. Produkty kódované tímto virofágem vykazují ne zcela vysokou fylogenetickou příbuznost vůči virofágu *Sputnik*. Jeho replikační strategie nebyla prozatím dostatečně popsána. Pozorováním průběhu replikačního cyklu bylo zjištěno, že virofág *Zamilon* replikující se spolu s gigantickým virem nezpůsobuje produkci deformovaných částic, ani supresi replikačního cyklu hostitelského viru. To, co činí tento virus vskutku unikátním je jeho selektivní možnost replikace v rámci čeledi *Mimiviridae*. Experimentálně bylo zjištěno, že virus *Zamilon* je schopen se replikovat ve virových továrnách indukovaných pouze mimiviry z linie B a C této čeledi, ale nedokáže infikovat zástupce linie A. (Gaia et al. 2014) Specifita výběru hostitelského viru je zapříčiněna existencí unikátního imunitního systému, vzdáleně příbuzného systému CRISPR-Cas, který je využíván bakteriemi jako způsob imunitní ochrany před virovou nákazou, tím že rozeznává a ničí cizorodou DNA pomocí RNA interference (Makarova et al. 2006). Analýzou genomů zástupců čeledi *Mimiviridae* byl objeven úsek DNA dlouhý 28 nt, který je shodný se sekvencí lokalizovanou v otevřené čtecím rámci 4 virofága *Zamilon*. Tato sekvence je součástí genomu APMV jako gen R349, jakožto i součástí ortologních genů dalších zástupců linie A čeledi *Mimiviridae*. V rámci tohoto úseku genů byla nalezena repetitivní sekvence 15 nt, která je v tomto úseku přítomna ve čtyřech kopiích. Dále byly v genomu APMV popsány geny R350 a R354, jež kódují enzymy s helikázovou a endonukleázovou aktivitou, svojí strukturou a funkcí vzdáleně připomínající Cas3 protein. Oblast genomu APMV zahrnující geny R349, R350 a R354 byla nazvána MIMIVIRE (mimivirus virophage resistance element; element genomu

mimiviru zajišťující rezistenci vůči infekci virofágem). Oblast genomu, ve které je přítomný element MIMIVRE, zobrazuje obrázek č. 17. Biologická role MIMIVIRE byla potvrzena experimentem, ve které byly umlčeny výše zmíněné geny. Umlčením genů ztratil APMV schopnost imunitní ochrany proti infekci virofágem, v důsledku čehož došlo ke zvýšení koncentrace virofága v titru. (Levasseur, Bekliz, et al. 2016)



Obrázek č. 17 – MIMIVIRE. Zástupci linie A čeledi Mimiviridae mají ve svých genomech ukryté 4 kopie repetitivních sekvencí (zobrazeny zeleně v horní části obrázku), jež sekvenčně odpovídají otevřenému čtecímu rámci 4 virofága Zamilon. Tyto repetice jsou u APMV lokalizovány v genu R349. Tento gen spolu s geny R350 a R354 zajišťují ochranu viru proti infekci virofágem Zamilon, funkčně založenou na mechanismu systému CRISPR-Cas, který nacházíme u bakterií. Převzato z (Levasseur, Bekliz, et al. 2016).

5. Evoluce gigantických virů améb

Viry byly definovány Andre Lwoffem jako malé infekční a obligátně patogenní agens, jejichž částice dosahují nanejvýš velikosti 200 nm. Virus dále definuje syntéza kapsidového proteinu tvořícího kapsidu, proteinové schránky schraňující genom, genom tvořený jedním typem nukleové kyseliny a nemožnost rozmnožování pomocí binárního dělení. (Lwoff 1957) S objevem gigantických virů améb, dogma o velikosti virů padlo a objevily se snahy měnit definici virů. Didier Raoult a Patrick Forterre představili v kontextu objevu APMV světu svoji představu o uspořádání organismů, jejichž základem má být změna samotného pojmu organismus. Na základě komparativní analýzy genomu zástupců všech tří domén života s genomem Mimiviru, navrhli rozdělení organismů na dvě skupiny. První skupina, nazvaná „ribozomy kódující organismy“, zahrnuje zástupce všech tří domén života – archea, bakterie, eukaryota. Viry infikující tyto domény života byly sdruženy do druhé skupiny, která byla nazvána „kapsidu kódující organismy“. Zároveň bylo autory navrženo, aby jediným kritériem definujícím virus byla schopnost tvořit kapsidu. (Raoult a Forterre 2008)

Jednotná definice pojmu virus i přesný scénář evoluce gigantických virů jsou předmětem dalšího zkoumání virologů a evolučních biologů. Přestože neexistuje jednotný scénář, který by zodpovídal všechny otázky spojené s evolucí gigantických virů, bylo navrženo několik hypotéz, kterými byly popsány možné způsoby, jakými se gigantické viry vyvinuly a jaké jsou jejich vazby na tři domény života.

5.1. Teorie genového obohacení a genové ztráty

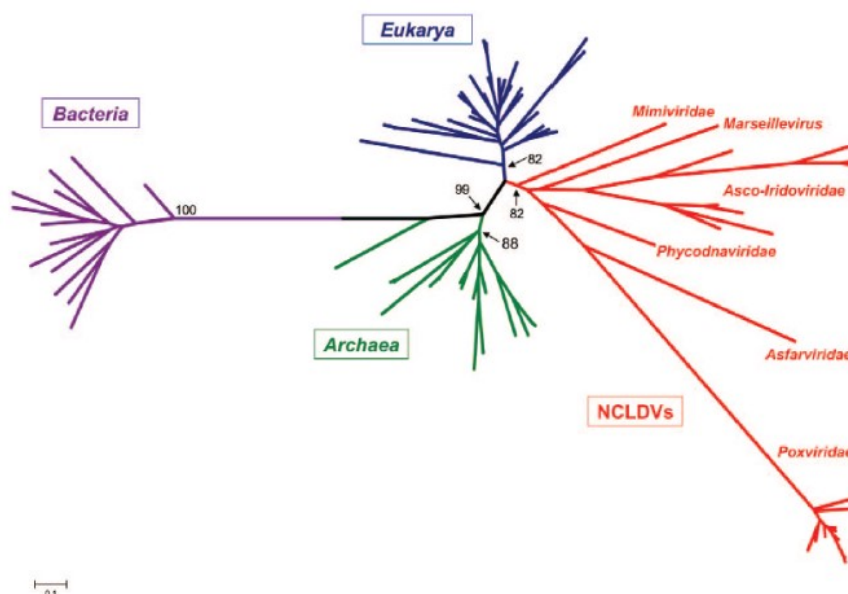
Existují dva přístupy, kterými můžeme sledovat evoluci genomů gigantických virů. Rozhodujícím parametrem je komplexnost genomu předka sledované skupiny virů. Budeme-li předpokládat, že předek současných gigantických virů byl výrazně menší a s ohledem na komplexitu genomu méně složitý virus, budeme parafrázovat teorii genového obohacení. Ta předpokládá, že genom předka byl postupně obohacován o laterálně přenesené geny. Tato teorie ovšem nevysvětluje, jakým způsobem byly v evoluci zvýhodňovány ty viry, které do svého genomu přenesly různý počet genů kódující součásti translačního aparátu, například aminoacyl tRNA syntetázy. V kontrastu s teorií genového obohacení je teorie genové ztráty. Ta vychází z předpokladu, že předkem gigantických virů byl patrně nějaký mikroorganismus, z něhož se vyvinul rovněž gigantický virus, jehož genom byl výrazně komplexnější než genomy současných gigantických virů. Tato teorie předpokládá, že v průběhu evoluce docházelo ke ztrátám vybraných funkcí, čímž se virový předek postupně adaptoval na parazitickou strategii života. V důsledku genové ztráty nacházíme v současných virech pouze izolované geny uplatňující se v translaci proteinů, nikoliv celý translační aparát, který byl pravděpodobně předkem gigantických virů kódován. (Claverie a Abergel 2013)

5.2. Čtvrtá doména života

Termín doména je nejvyšší užívanou taxonomickou jednotkou užívanou ke klasifikaci organismů. V roce 1990 byly vytyčeny tři domény života – Archea, Bakterie a Eukarya. Každá z těchto domén exprimuje unikátní ribozomální RNA, podle které jsou všechny buněčné organismy přiřazeny do příslušné domény. Doména Eukarya exprimuje 18S rRNA, domény Archea a Bakterie 16S rRNA. (Woese, Kandler, a Wheelis 1990) Většina genů, které obsahují genomy gigantických virů, postrádá v současných databázích své homology. Proteiny těmito geny kódované jen zřídka nacházejí homology v jedné ze tří domén života, současně jsou tyto proteiny nejčastěji fylogeneticky příbuzné vůči dalším čeledím gigantický virů bez výraznější vazby na tři domény života. Výše zmíněná fakta vedla k vyslovení vysoce kontroverzní hypotézy o existenci čtvrté domény života. Na základě fylogenetické analýzy β podjednotky RNA polymerázy II, byl vytvořen dendrogram, jež zobrazuje zástupce NCLDV jako samostatnou vývojovou větev vedle tří domén života. (Boyer et al. 2010) Tento dendrogram zobrazuje obrázek č. 18.

Tento koncept je častým terčem kritiky. Byly prezentovány závěry fylogenetických analýz, ze kterých vyplývá, že NCLDV nejsou samostatnou doménou života, nýbrž se větví z již stávající

domény Eukarya. Předpokladem této hypotézy je přenos genů do genomu NCLDV pomocí horizontálního transportu genů z hostitelských genomů. (Moreira a López-García 2009; Williams, Embley, a Heinz 2011)



Obrázek č. 18 – Dendrogram zahrnující navrhovanou čtvrtou doménu života. Fylogenetická analýza β podjednotky RNA polymerázy II poskytuje dendrogram, na kterém jsou vyčleněny čtyři domény života – Archea (zeleně), Bakterie (fialově), Eukarya (modře) a viry skupiny NCLDV (červeně). Převzato z (Boyer et al. 2010).

V souvislosti řešení problematiky čtvrté domény života bylo navrženo, aby byl termín doména používán pouze ve spojitost s ribozomy kódujícími organismy, tak aby bylo zajištěno výlučné spojení výrazu doména s ribozomální RNA (Forterre, Krupovic, a Prangishvili 2014).

5.3. Gigantické viry a Polintony

Další popsáný scénář evoluce gigantických virů staví do role hlavních aktérů skupinu DNA transpozonů zvaných Polintony. Polintony jsou typicky dlouhé 15-20 kbp a nacházejí se v širokém spektru eukaryotických genomů. Kódují až 10 různých proteinů, mezi kterými najdeme enzymy DNA polymerázu B, integrázu, proteázu a ATPázu. (Kapitonov a Jurka 2006) Mimo těchto proteinů byly v genomu nalezeny i sekvence kódující kapsidové proteiny, jež mají stejný strukturní motiv jako gigantické viry améb, tzv. „double jelly-roll fold“. Je tedy možné, že za určitých podmínek dokáží polintony tvořit virové částice. Geny pro tvorbu kapsidy se nenachází ve všech známých polintonech, což je pravděpodobně způsobeno ztrátou genů během evoluce. (Krupovic, Bamford, a Koonin 2014) Polintony kódující kapsidové proteiny byly nazvány Polintoviry (Koonin, Krupovic, a Yutin 2015). Scénář evoluce gigantických virů se podle autorů hypotézy začíná na úsvitu samotné eukaryogeneze, kdy se vyvinuly polintony z předka bakteriálních virů podobným čeledi *Tectiviridae*. Pravděpodobně rekombinací s eukaryotickým DNA transpozonem získaly polintony enzymy proteázu a integrázu. Po vstupu do proto-eukaryotického hostitele se polintony „ukryly“ do hostitelského jádra, kde došlo

k zásadnímu rozdělení polintonů na dvě skupiny, určené preferovanou replikační strategií. Jedna skupina zůstala v jádře hostitele a dala tak vzniknout dnešním polintonům, druhá unikla z jádra hostitele a získala geny pro enzymy účastnící se transkripce a gen pro enzym zajišťující syntézu čepičky na 5' konci mRNA. Posledním důležitým krokem byla výměna DNA polymerázy polintonu, za DNA polymerázu schopnou syntézy dle RNA primerů spolu s primázou-helikázou podobné typu D5, která zajišťuje syntézu primerů. Novou polymerázu získaly gigantické viry pravděpodobně od eukaryotického organismu. Následně došlo k expanzi genomu a vznikali tak první předci dnešních gigantických virů. (Krupovic a Koonin 2015)

6. Závěr

Objev gigantický virů můžeme zajisté popsat jako převratný. Především padlo dogma o velikosti virů. Gigantické viry améb produkují viriony o velikostech srovnatelných s velikostí malých jednobuněčných organismů. Genomová DNA gigantických virů dosahuje u některých pandoravirů větších velikostí, než které nacházíme u genomů některých bakterií ale dokonce i genomů nejmenších eukaryotických organismů. Objev gigantických virů neznamenal jen identifikaci zástupců celé řady nových čeledí a rodů virů, ale také získání nové informace o existenci unikátní skupiny DNA virů, tzv. virofágů, které dokáží parazitovat na replikačních centrech svých gigantických protějšků. V souvislosti s virofágy byl také objeven virový systém imunitní ochrany před infekcí gigantického viru virofágy. Sekvenování a analýzy genomů gigantických virů přineslo řadu překvapení. Jedním z nich byla přítomnost značného množství genů kódujících složky translačního aparátu i dalších genů dosud ve virových genomech nenacházených. Snad největším překvapením bylo, že naprostá většina genetické informace gigantických virů je neznámá, bez homologie s dosud shromážděnými sekvencemi v databázích. U zbytku genů byla nalezena homologie jak s dalšími DNA viry, tak i se zástupci všech tří domén – archeí, bakterií i eukaryot. Tato skutečnost rozpoutala bouřlivé diskuze o evoluci gigantických virů. Hypotézy popisující evoluci gigantických virů jsou prozatím v mnoha směrech nejednotné, až protichůdné. Rozvoj nových metod metagenomiky a rychlého sekvenování umožňujících analýzy vod, půd, složení různých biotopů i viromů různých organismů přinesl poznání, že sekvence gigantických virů jsou všudypřítomné a viry obecně jsou nejpočetněji zastoupené entity na Zemi. Jsou obrovským zdrojem genetické diverzity. Améby, které kromě gigantických virů fagocytují různé bakterie i s jejich bakteriofágy a také malé eukaryotické mikroorganismy, umožňují rozmanitou výměnu genetické informace. Nová data a přibývající informace o nových virech, organizaci a funkci jejich genomů i replikačních strategiích přinesou jistě ještě mnohá překvapení a dozajista přispějí k pochopení evoluce života na Zemi.

Seznam použité literatury

Abrahão, Jônatas, Lorena Silva, Ludmila Santos Silva, Jacques Yaacoub Bou Khalil, Rodrigo Rodrigues, Thalita Arantes, Felipe Assis, et al. 2018. „Tailed giant Tupanvirus possesses the most complete translational apparatus of the known virosphere". *Nature Communications* 9 (únor).

Aherfi, Sarah, Julien Andreani, Emeline Baptiste, Amina Oumessoum, Fábio P. Dornas, Ana Claudia Dos S. P. Andrade, Eric Chabriere, et al. 2018. „A Large Open Pangenome and a Small Core Genome for Giant Pandoraviruses". *Frontiers in Microbiology* 9: 1486.

Andrade, Ana Cláudia Dos Santos Pereira, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, Grazielle Pereira Oliveira, Kétyllen Reis Andrade, Cláudio Antônio Bonjardim, Bernard La Scola, Erna Geessien Kroon, a Jônatas Santos Abrahão. 2017. „Filling Knowledge Gaps for Mimivirus Entry, Uncoating, and Morphogenesis". *Journal of Virology* 91 (22).

Andreani, Julien, Sarah Aherfi, Jacques Yaacoub Bou Khalil, Fabrizio Di Pinto, Idir Bitam, Didier Raoult, Philippe Colson, a Bernard La Scola. 2016. „Cedratvirus, a Double-Cork Structured Giant Virus, Is a Distant Relative of Pithoviruses". *Viruses* 8 (11).

Arantes, Thalita Souza, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, Ludmila Karen dos Santos Silva, Grazielle Pereira Oliveira, Helton Luís de Souza, Jacques Y. B. Khalil, Danilo Bretas de Oliveira, et al. 2016. „The Large Marseillevirus Explores Different Entry Pathways by Forming Giant Infectious Vesicles". *Journal of Virology* 90 (11): 5246–55.

Arslan, Defne, Matthieu Legendre, Virginie Seltzer, Chantal Abergel, a Jean-Michel Claverie. 2011. „Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (42): 17486–91.

Benamar, Samia, Dorine G. I. Reteno, Victor Bandaly, Noémie Labas, Didier Raoult, a Bernard La Scola. 2016. „Faustoviruses: Comparative Genomics of New Megavirales Family Members". *Frontiers in Microbiology* 7 (únor).

Bertelli, Claire, Linda Mueller, Vincent Thomas, Trestan Pillonel, Nicolas Jacquier, a Gilbert Greub. 2017. „Cedratvirus Lausannensis - Digging into Pithoviridae Diversity". *Environmental Microbiology* 19 (10): 4022–34.

Boyer, Mickaël, Mohammed-Amine Madoui, Gregory Gimenez, Bernard La Scola, a Didier Raoult. 2010. „Phylogenetic and Phyletic Studies of Informational Genes in Genomes Highlight Existence of a 4th Domain of Life Including Giant Viruses". *PLoS ONE* 5 (12).

Boyer, Mickaël, Natalya Yutin, Isabelle Pagnier, Lina Barrassi, Ghislain Fournous, Leon Espinosa, Catherine Robert, et al. 2009. „Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (51): 21848–53.

Claverie, Jean-Michel, a Chantal Abergel. 2013. „Open Questions about Giant Viruses". *Advances in Virus Research* 85: 25–56.

Claverie, Jean-Michel, Hiroyuki Ogata, Stéphane Audic, Chantal Abergel, Karsten Suhre, a Pierre-Edouard Fournier. 2006. „Mimivirus and the Emerging Concept of ‚Giant‘ Virus". *Virus Research* 117 (1): 133–44.

- Colson, Philippe, Xavier De Lamballerie, Natalya Yutin, Sassan Asgari, Yves Bigot, Dennis K. Bideshi, Xiao-Wen Cheng, et al. 2013. „Megavirales’, a Proposed New Order for Eukaryotic Nucleocytoplasmic Large DNA Viruses". *Archives of Virology* 158 (12): 2517–21.
- Colson, Philippe, Laura Fancello, Gregory Gimenez, Fabrice Armougom, Christelle Desnues, Ghislain Fournous, Niyaz Yoosuf, Matthieu Million, Bernard La Scola, a Didier Raoult. 2013. „Evidence of the Megavirome in Humans". *Journal of Clinical Virology* 57 (3): 191–200.
- Colson, Philippe, Gregory Gimenez, Mickaël Boyer, Ghislain Fournous, a Didier Raoult. 2011. „The Giant Cafeteria Roenbergensis Virus That Infects a Widespread Marine Phagocytic Protist Is a New Member of the Fourth Domain of Life". *PloS One* 6 (4): e18935.
- Colson, Philippe, Bernard La Scola, a Didier Raoult. 2017. „Giant Viruses of Amoebae: A Journey Through Innovative Research and Paradigm Changes". *Annual Review of Virology* 4 (1): 61–85.
- Colson, Philippe, Xavier de Lamballerie, Ghislain Fournous, a Didier Raoult. 2012. „Reclassification of Giant Viruses Composing a Fourth Domain of Life in the New Order Megavirales". *Intervirology* 55 (5): 321–32.
- Colson, Philippe, Isabelle Pagnier, Niyaz Yoosuf, Ghislain Fournous, Bernard La Scola, a Didier Raoult. 2013. „Marseilleviridae”, a New Family of Giant Viruses Infecting Amoebae". *Archives of Virology* 158 (4): 915–20.
- Colson, Philippe, Natalya Yutin, Svetlana A. Shabalina, Catherine Robert, Ghislain Fournous, Bernard La Scola, Didier Raoult, a Eugene V. Koonin. 2011. „Viruses with More than 1,000 Genes: Mamavirus, a New Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus Strain, and Reannotation of Mimivirus Genes". *Genome Biology and Evolution* 3: 737–42.
- Desnues, C., a D. Raoult. 2010. „Inside the Lifestyle of the Virophage". *Intervirology* 53 (5): 293–303.
- Desnues, Christelle, Bernard La Scola, Natalya Yutin, Ghislain Fournous, Catherine Robert, Saïd Azza, Priscilla Jardot, et al. 2012. „Provirophages and Transpovirons as the Diverse Mobilome of Giant Viruses". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (44): 18078–83.
- Elalloway, E.a.g., R.a. Armstrong, R.a. Bird, S.l. Kelly, a S.n. Smith. 2004. „Analysis of Acanthamoeba Polyphaga Surface Carbohydrate Exposure by FITC–lectin Binding and Fluorescence Evaluation". *Journal of Applied Microbiology* 97 (6): 1319–25.
- Forterre, Patrick, Mart Krupovic, a David Prangishvili. 2014. „Cellular Domains and Viral Lineages". *Trends in Microbiology* 22 (10): 554–58.
- Gaia, Morgan, Samia Benamar, Mondher Boughalmi, Isabelle Pagnier, Olivier Croce, Philippe Colson, Didier Raoult, a Bernard La Scola. 2014. „Zamilon, a Novel Virophage with Mimiviridae Host Specificity". *PloS One* 9 (4): e94923.
- Gaia, Morgan, Isabelle Pagnier, Angélique Campocasso, Ghislain Fournous, Didier Raoult, a Bernard La Scola. 2013. „Broad Spectrum of Mimiviridae Virophage Allows Its Isolation Using a Mimivirus Reporter". *PLOS ONE* 8 (4): e61912.
- Iyer, L. M., L. Aravind, a E. V. Koonin. 2001. „Common Origin of Four Diverse Families of Large Eukaryotic DNA Viruses". *Journal of Virology* 75 (23): 11720–34.

- Iyer, Lakshminarayan M., S. Balaji, Eugene V. Koonin, a L. Aravind. 2006. „Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses". *Virus Research, Comparative Genomics and Evolution of Complex Viruses*, 117 (1): 156–84.
- Kapitonov, Vladimir V., a Jerzy Jurka. 2006. „Self-Synthesizing DNA Transposons in Eukaryotes". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12): 4540–45.
- Klose, Thomas, Yurii G. Kuznetsov, Chuan Xiao, Siyang Sun, Alexander McPherson, a Michael G. Rossmann. 2010. „The Three-Dimensional Structure of Mimivirus". *Intervirology* 53 (5): 268–73.
- Klose, Thomas, Dorine G. Reteno, Samia Benamar, Adam Hollerbach, Philippe Colson, Bernard La Scola, a Michael G. Rossmann. 2016. „Structure of Faustovirus, a Large DsDNA Virus". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (22): 6206–11.
- Koonin, Eugene V., Mart Krupovic, a Natalya Yutin. 2015. „Evolution of Double-Stranded DNA Viruses of Eukaryotes: From Bacteriophages to Transposons to Giant Viruses". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1341 (duben): 10–24.
- Krupovic, Mart, Dennis H. Bamford, a Eugene V. Koonin. 2014. „Conservation of Major and Minor Jelly-Roll Capsid Proteins in Polinton (Maverick) Transposons Suggests That They Are Bona Fide Viruses". *Biology Direct* 9 (duben): 6.
- Krupovic, Mart, a Eugene V. Koonin. 2015. „Polintons: A Hotbed of Eukaryotic Virus, Transposon and Plasmid Evolution". *Nature Reviews. Microbiology* 13 (2): 105–15.
- Kuznetsov, Yuri G., Thomas Klose, Michael Rossmann, a Alexander McPherson. 2013. „Morphogenesis of Mimivirus and Its Viral Factories: an Atomic Force Microscopy Study of Infected Cells". *Journal of Virology* 87 (20): 11200–213.
- La Scola, Bernard, Stéphane Audic, Catherine Robert, Liang Jungang, Xavier de Lamballerie, Michel Drancourt, Richard Birtles, Jean-Michel Claverie, a Didier Raoult. 2003. „A Giant Virus in Amoebae". *Science (New York, N.Y.)* 299 (5615): 2033.
- La Scola, Bernard, Christelle Desnues, Isabelle Pagnier, Catherine Robert, Lina Barrassi, Ghislain Fournous, Michèle Merchat, et al. 2008. „The Virophage as a Unique Parasite of the Giant Mimivirus". *Nature* 455 (7209): 100–104.
- La Scola, Bernard, Thomas J. Marrie, Jean-Pierre Auffray, a Didier Raoult. 2005. „Mimivirus in Pneumonia Patients". *Emerging Infectious Diseases* 11 (3): 449–52.
- Legendre, Matthieu, Defne Arslan, Chantal Abergel, a Jean-Michel Claverie. 2012. „Genomics of Megavirus and the elusive fourth domain of Life". *Communicative & Integrative Biology* 5 (1): 102–6.
- Legendre, Matthieu, Julia Bartoli, Lyubov Shmakova, Sandra Jeudy, Karine Labadie, Annie Adrait, Magali Lescot, et al. 2014. „Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (11): 4274–79.
- Legendre, Matthieu, Elisabeth Fabre, Olivier Poirot, Sandra Jeudy, Audrey Lartigue, Jean-Marie Alempic, Laure Beucher, et al. 2018. „Diversity and Evolution of the Emerging Pandoraviridae Family". *Nature Communications* 9 (1): 2285.

- Legendre, Matthieu, Audrey Lartigue, Lionel Bertaux, Sandra Jeudy, Julia Bartoli, Magali Lescot, Jean-Marie Alempic, et al. 2015. „In-Depth Study of Mollivirus Sibericum, a New 30,000-y-Old Giant Virus Infecting Acanthamoeba". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (38): E5327-5335.
- Levasseur, Anthony, Julien Andreani, Jeremy Delerce, Jacques Bou Khalil, Catherine Robert, Bernard La Scola, a Didier Raoult. 2016. „Comparison of a Modern and Fossil Pithovirus Reveals Its Genetic Conservation and Evolution". *Genome Biology and Evolution* 8 (8): 2333–39.
- Levasseur, Anthony, Meriem Bekliz, Eric Chabrière, Pierre Pontarotti, Bernard La Scola, a Didier Raoult. 2016. „MIMIVIRE Is a Defence System in Mimivirus That Confers Resistance to Virophage". *Nature* 531 (7593): 249–52.
- Lwoff, A. 1957. „The Concept of Virus". *Journal of General Microbiology* 17 (2): 239–53.
- Makarova, Kira S., Nick V. Grishin, Svetlana A. Shabalina, Yuri I. Wolf, a Eugene V. Koonin. 2006. „A Putative RNA-Interference-Based Immune System in Prokaryotes: Computational Analysis of the Predicted Enzymatic Machinery, Functional Analogies with Eukaryotic RNAi, and Hypothetical Mechanisms of Action". *Biology Direct* 1 (březen): 7.
- Moreira, David, a Purificación López-García. 2009. „Ten Reasons to Exclude Viruses from the Tree of Life". *Nature Reviews. Microbiology* 7 (4): 306–11.
- Mutsafi, Yael, Eyal Shimoni, Amir Shimon, a Abraham Minsky. 2013. „Membrane Assembly during the Infection Cycle of the Giant Mimivirus". *PLoS Pathogens* 9 (5): e1003367.
- Philippe, Nadège, Matthieu Legendre, Gabriel Doutre, Yohann Couté, Olivier Poirot, Magali Lescot, Defne Arslan, et al. 2013. „Pandoraviruses: Amoeba Viruses with Genomes Up to 2.5 Mb Reaching That of Parasitic Eukaryotes". *Science* 341 (6143): 281–86.
- Popgeorgiev, Nikolay, Mickaël Boyer, Laura Fancello, Sonia Monteil, Catherine Robert, Romain Rivet, Claude Nappéz, et al. 2013. „Marseillevirus-Like Virus Recovered From Blood Donated by Asymptomatic Humans". *The Journal of Infectious Diseases* 208 (7): 1042–50.
- Popgeorgiev, Nikolay, Philippe Colson, Isabelle Thuret, Jacques Chiarioni, Pierre Gallian, Didier Raoult, a Christelle Desnues. 2013. „Marseillevirus Prevalence in Multitransfused Patients Suggests Blood Transmission". *Journal of Clinical Virology* 58 (4): 722–25.
- Raoult, Didier, Stéphane Audic, Catherine Robert, Chantal Abergel, Patricia Renesto, Hiroyuki Ogata, Bernard La Scola, Marie Suzan, a Jean-Michel Claverie. 2004. „The 1.2-Megabase Genome Sequence of Mimivirus". *Science (New York, N.Y.)* 306 (5700): 1344–50.
- Raoult, Didier, a Patrick Forterre. 2008. „Redefining Viruses: Lessons from Mimivirus". *Nature Reviews. Microbiology* 6 (4): 315–19.
- Reteno, Dorine Gaëlle, Samia Benamar, Jacques Bou Khalil, Julien Andreani, Nicholas Armstrong, Thomas Klose, Michael Rossmann, Philippe Colson, Didier Raoult, a Bernard La Scola. 2015. „Faustovirus, an Asfarvirus-Related New Lineage of Giant Viruses Infecting Amoebae". *Journal of Virology* 89 (13): 6585–94.

- Rodrigues, Rodrigo Araújo Lima, Ludmila Karen dos Santos Silva, Fábio Pio Dornas, Danilo Bretas de Oliveira, Thais Furtado Ferreira Magalhães, Daniel Assis Santos, Adriana Oliveira Costa, et al. 2015. „Mimivirus Fibrils Are Important for Viral Attachment to the Microbial World by a Diverse Glycoside Interaction Repertoire". *Journal of Virology* 89 (23): 11812–19.
- Rodríguez-Zaragoza, Salvador. 1994. „Ecology of Free-Living Amoebae". *Critical Reviews in Microbiology* 20 (3): 225–41.
- Saadi, Hanene, Isabelle Pagnier, Philippe Colson, Jouda Kanoun Cherif, Majed Beji, Mondher Boughalmi, Saïd Azza, et al. 2013. „First Isolation of Mimivirus in a Patient with Pneumonia". *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 57 (4): e127-134.
- Scheid, P. 2016. „A Strange Endocytobiont Revealed as Largest Virus". *Current Opinion in Microbiology* 31 (červen): 58–62.
- Silva, Ludmila Karen Dos Santos, Ana Cláudia Dos Santos, Pereira Andrade, Fábio Pio Dornas, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, Thalita Arantes, Erna Geessien Kroon, Cláudio Antônio Bonjardim, a Jônatas Santos Abrahão. 2018. „Cedratvirus Getuliensis Replication Cycle: An in-Depth Morphological Analysis". *Scientific Reports* 8 (1): 4000.
- Sun, Siyang, Bernard La Scola, Valorie D. Bowman, Christopher M. Ryan, Julian P. Whitelegge, Didier Raoult, a Michael G. Rossmann. 2010. „Structural Studies of the Sputnik Virophage". *Journal of Virology* 84 (2): 894–97.
- Suzan-Monti, Marie, Bernard La Scola, Lina Barrassi, Leon Espinosa, a Didier Raoult. 2007. „Ultrastructural Characterization of the Giant Volcano-like Virus Factory of *Acanthamoeba Polyphaga* Mimivirus". *PloS One* 2 (3): e328.
- Weisman, Robert A., a Edward D. Korn. 1967. „Phagocytosis of Latex Beads by *Acanthamoeba*. I. Biochemical Properties*". *Biochemistry* 6 (2): 485–97.
- Williams, Tom A., T. Martin Embley, a Eva Heinz. 2011. „Informational Gene Phylogenies Do Not Support a Fourth Domain of Life for Nucleocytoplasmic Large DNA Viruses". *PloS One* 6 (6): e21080.
- Woese, C. R., O. Kandler, a M. L. Wheelis. 1990. „Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (12): 4576–79.
- Xiang, Xiaoyu, Lanming Chen, Xiaoxing Huang, Yuanmin Luo, Qunxin She, a Li Huang. 2005. „*Sulfolobus Tengchongensis* Spindle-Shaped Virus STSV1: Virus-Host Interactions and Genomic Features". *Journal of Virology* 79 (14): 8677–86.
- Xiao, Chuan, Paul R. Chipman, Anthony J. Battisti, Valorie D. Bowman, Patricia Renesto, Didier Raoult, a Michael G. Rossmann. 2005. „Cryo-electron Microscopy of the Giant Mimivirus". *Journal of Molecular Biology* 353 (3): 493–96.
- Xiao, Chuan, Yurii G. Kuznetsov, Siyang Sun, Susan L. Hafenstein, Victor A. Kostyuchenko, Paul R. Chipman, Marie Suzan-Monti, Didier Raoult, Alexander McPherson, a Michael G. Rossmann. 2009. „Structural Studies of the Giant Mimivirus". *PLOS Biology* 7 (4): e1000092.

Yoosuf, Niyaz, Natalya Yutin, Philippe Colson, Svetlana Shabalina, Isabelle Pagnier, Catherine Robert, Said Azza, et al. 2012. „Related Giant Viruses in Distant Locations and Different Habitats: Acanthamoeba polyphaga moumouvirus Represents a Third Lineage of the Mimiviridae That Is Close to the Megavirus Lineage". *Genome biology and evolution* 4 (prosinec).

Yutin, Natalya, Philippe Colson, Didier Raoult, a Eugene V Koonin. 2013. „Mimiviridae: clusters of orthologous genes, reconstruction of gene repertoire evolution and proposed expansion of the giant virus family". *Virology Journal* 10 (duben): 106.

Yutin, Natalya, a Eugene V Koonin. 2013. „Pandoraviruses are highly derived phycodnaviruses". *Biology Direct* 8 (říjen): 25.

Zauberman, Nathan, Yael Mutsafi, Daniel Ben Halevy, Eyal Shimoni, Eugenia Klein, Chuan Xiao, Siyang Sun, a Abraham Minsky. 2008. „Distinct DNA Exit and Packaging Portals in the Virus Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus". *PLOS Biology* 6 (5): e114.

Zhang, Xinzhen, Siyang Sun, Ye Xiang, Jimson Wong, Thomas Klose, Didier Raoult, a Michael G. Rossmann. 2012. „Structure of Sputnik, a Virophage, at 3.5-Å Resolution". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (45): 18431–36.