

Beata Tokarz-Deptuła^{1*}, Joanna Śliwa-Dominiak¹, Michał Kubiś¹, Wiesław Deptuła¹

¹ Katedra Mikrobiologii i Immunologii Wydziału Biologii US, ul. Felczaka 3c 71-412 Szczecin

Wpłynęło w marcu 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka wirusa APMV. 3. Mimiwirus APMV, a super-rodzina NCLDV (nucleocytoplasmic large DNA viruses). 4. Wirofag mamawirusa. 5. Podsumowanie

APMV Mimivirus, mamavirus and its virophage – structure and characteristics

Abstract: This paper describes APMV Mimivirus, which belongs to the NCLDV super-family. The representatives of this super-family shed light a lot of biological secrets. The role of this virus is not known and this fact forms the basis for the discussion about common origin of viruses and eukaryote. In this paper a new, not yet registered virophage is presented.

1. Introduction. 2. Characteristic of APMV virus. 3. Mimivirus and super-family of NCLDV (Nucleocytoplasmic Large DNA Viruses). 4. Mamavirus virophage. 5. Summary

Słowa kluczowe: mamavirus, mimiwirus, środowisko wodne, wirowfag, wirus olbrzymi
Key words: mamavirus, mimivirus, giant virus, virophage, water environment

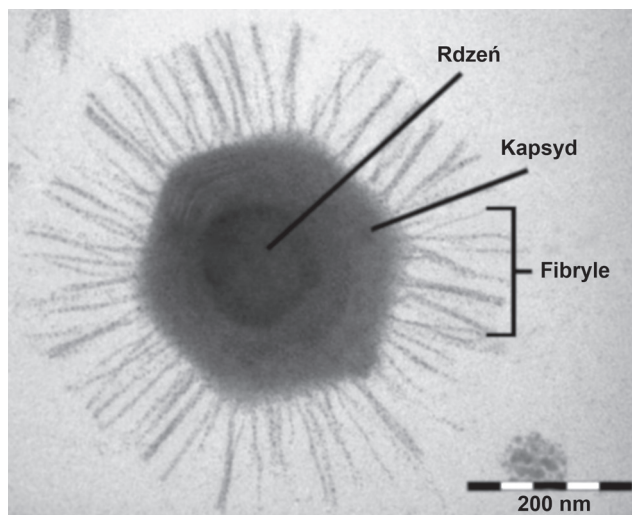
1. Wprowadzenie

Wirus APMV (*Acanthamoeba polyphaga mimivirus*) – to olbrzymi wirus DNA infekujący pierwotniaki z rodzaju *Acanthamoeba*, który został zidentyfikowany w 2003 roku [1,3,9], a według obowiązującej systematyki zaklasyfikowany jako jedyny gatunek należący do rodziny *Mimiviridae*, rodzaj *Mimivirus* [5]. Kompletny genom mimiwirusa APMV opublikowali Ghedin i Claverie w 2005 r. [3]. Jak wykazano, wirus ten jest najbardziej złożonym wirusem spośród wszystkich opisanych do tej pory [1–3, 7, 9]. Poza niezwykle dużymi rozmiarami, charakteryzuje się on posiadaniem, po raz pierwszy stwierdzonych u wirusów, homologów wielu genów organizmów wielokomórkowych [3]. Fakty te stały się powodem nowych rozważań dotyczących pochodzenia wirusów i roli jaką odegrały one przy powstawaniu komórek eukariotycznych [1, 3, 9]. Wykazano bowiem, że posiada on m.in. geny kodujące centralne elementy systemu translacji białek, które wcześniej znane były jedynie u organizmów eukariotycznych oraz unikalne cechy cyklu replikacji [1, 3]. Ponadto ciekawym jest też jego występowanie w środowisku wodnym, głównie w oceanach [1, 3]. Badania [3] sugerują, że w bliskim kontakcie z przodkiem mimiwirusa mogły być koralowce z rodzaju *Octocorallia*, mające w jamie chłonna-trawiącej 8 przegród i żyjące także głównie w wodach morskich i oceanicznych [6]. Prawdopodobnie także gąbki mogą być gospodarzem niezidentyfikowanych jeszcze, ale znacznie większych niż wirus APMV, członków rodziny *Mimiviridae* [3].

2. Charakterystyka wirusa APMV

Wirus APMV został zaobserwowany w 1992 roku w Wielkiej Brytanii w wodach przemysłowej wieży chłodniczej w Bradford [3, 7, 9]. Timothy Rowbotham, który wykrył ten mikroorganizm, o tak ogromnych rozmiarach, pomylił go z bakterią i stąd wzięła się nazwa mimiwirus (*Mimicking Microbe Virus* – wirus udające mikroba) [3, 9]. Ten nowo zarejestrowany „mikrob”, podobny do bakterii Gram-dodatnich, był w stanie namnażać się w warunkach laboratoryjnych, stąd początkowo jego odkrywca Rowbotham, nazwał go *Bradfordcoccus*, nie dostrzegając jego charakteru wirusowego [3]. Dopiero 10 lat później, francuscy badacze z Krajowego Centrum Badań Naukowych przy Uniwersytecie Śródziemnomorskim w Marsylii, zajmujący się riketsjami i nowymi patogenami, zidentyfikowali i opisali tego gigantycznego wirusa, infekującego ameby z rodzaju *Acanthamoeba* nadając mu, jak wspomniano wcześniej nazwę mimiwirus [1, 3, 9]. Atakowane przez ten wirus ameby osiągają rozmiary od 15 do 35 µm [8] i występują powszechnie w wodach (w tym słodkich), ale także w glebie, powietrzu oraz w innych środowiskach [3]. Mimiwirus (Rys. 1) to bezotczkowy wirus, o symetrii kubicznej i średnicy ok. 0,7 µm [2, 3, 7, 14]. Rozmiary jakie osiąga, jak na wirusy, są ogromne, ponieważ wielkości znanych wirusów oscylują w granicach od 0,03 µm (parwowirusy) do 0,27 µm (pokswirusy) [13] i dlatego nie trudno było go pierwotnie pomylić z bakterią, jako że te ostatnie mają od 0,03 µm (nanobakterie) do nawet 300 µm (*Thiomargarita namibiensis*) [13], choć

* Autor korespondencyjny: Beata Tokarz-Deptuła, Katedra Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, 71-412 Szczecin; tel. 91 444 1605; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl



Rys. 1. Schemat budowy mimiwirusa [12]

ich przeciętne rozmiary mieszczą się od 0,1 do 30 μm [13]. Genom mimiwirusa to dwuniciowe liniowe DNA (dsDNA) wielkości 1,185 Mbp, który koduje prawie 900 białek [2, 3, 7, 9].

Wyjątkowe są też elementy genomu pełniące określone funkcje, a niespotykane wcześniej u wirusów (Tabela I). Ważne cechy genomu APMV to m.in. obecność wielu elementów naprawy DNA, a także enzymy syntezy polisacharydów [1, 3, 7, 9, 10]. Wśród enzymów mimiwirusa odnotowano obecność m.in. kinazy deoksynukleozydów (DNK), deaminazy cytydyny, jak również pierwsze kinazy difosforanów nukleozydów (NdK) [10].

APMV jest jedynym wirusem, który posiada jednocześnie topoizomerazy typu IA, IB, a także typu II [10]. Jak wspomniano wcześniej, genom mimiwirusa posiada geny kodujące centralne elementy systemu translacji białek, które zauważalne były jedynie u organizmów eukariotycznych, a wśród których wymienić można

np.: syntetazę czterech aminoacylo-tRNA, czynnik inicjacji translacji 4E, czynnik translacyjny EF-TU, czynnik inicjacji translacji SUI1 oraz IF-4A, a także czynnik uwalniania łańcucha peptydowego eRF1 [10]. W genomie mimiwirusa zidentyfikowano pierwszy wirusowy homolog enzymu modyfikującego tRNA (uracylo-5-metylotransferaza tRNA) [1, 3, 7, 9, 10]. Analiza genomu APMV ujawniła także kilka rodzajów homologów enzymów zaangażowanych w naprawę DNA np. ORF R406 (Open Reading Frame – otwarta ramka odczytu), która jest homologiczna do wielu genów bakteryjnych biorących udział w naprawie DNA [10]. Niespotykane wcześniej u wirusów, a występujące u APMV, jest białko z rodziny cyklofilin (ORF L605) zaangażowane w związanie białek [10]. Nadto genom APMV koduje homologi wielu enzymów związanych z metabolizmem np.: syntetazę asparaginy (ORF R475) i GMP (ORF L716) oraz syntetazę glutaminy (ORF R565) [10]. Wszystkie te czynniki odnotowano po raz pierwszy w wirusowym DNA [10] i co ciekawe, niektóre białka tego wirusa są glikozylowane, głównie te, które budują jego kapsyd [10]. Jest też ciekawym, że cząsteczki APMV można barwić standardową metodą Grama, co sugeruje obecność siatki polisacharydów na jego powierzchni [10]. Wszystkie te informacje [1, 3, 7, 9, 10] stały się platformą dyskusji na temat pochodzenia tych dużych wirusów DNA i ich ewentualnej roli w powstawaniu organizmów eukariotycznych, a także w „przejściu” komórkowego genomu od RNA do DNA. Trzeba dodać także i to, że złożoność genomu tego olbrzymiego wirusa DNA, narzuca istnienie odpowiedniego planu w konstrukcji jego cząstek, co jest ważne przy wnikiwaniu do organizmu gospodarza i czasu jego infekcji. Wykazano, że jego występowanie w komórce gospodarza, przypomina rozwój komórki w komórce, bo następuje import energii i metabolitów z cytoplazmy gospodarza do struktur

Tabela I
Wybrane, nietypowe cechy genomu APMV [10]

ORF	Kodowane białka	Funkcja
R663	Syntetaza arginylo-tRNA	Translacja
L124	Syntetaza tyrozyno-tRNA	Translacja
L164	Syntetaza cysteino-tRNA	Translacja
R639	Syntetaza metionylo-tRNA	Translacja
R405	Metylotransferaza tRNA	Modyfikacja tRNA
L687	Endonukleaza naprawiająca uszkodzenia DNA spowodowane promieniowaniem UV	Naprawa DNA
L254 L393	Białka szoku termicznego	Rola przy budowaniu kapsydu APMV
R565	Syntetaza glutaminy	Metabolizm
R689	N-acetyloglukozamino-1-fosforan	Synteza polisacharydów
L612	Izomeraza mannozo-6P	Glikozylacja
L906	Cholinesteraza	Prawdopodobnie infekcja gospodarza
R807	Reduktaza 7-dehydrocholesterol	Prawdopodobnie infekcja gospodarza

wirusa [3]. Według Claverie i wsp. [3] pojawienie się w przyrodzie tych dużych wirusów DNA, może być wynikiem ewolucyjnych zmian w kierunku pasożytnictwa wewnątrzkomórkowego, w efekcie których kluczowym wydarzeniem jest utracenie zdolności translacji białek, ale nie szlaków metabolicznych. Stąd według tych autorów [3] badania dotyczące wyjaśnienia molekularnych szczegółów cyklu replikacji APMV w organizmie *Acanthamoeba*, są tak ważne, bo wiążą się z faktem ewentualnego uzyskania informacji odnośnie ewolucyjnego pochodzenia „wirusów olbrzymów” [3]. Jak wykazano, w wielu próbkach pochodzących ze środowiska wodnego, występuje wiele wirusów DNA zbliżonych do mimiwirusa [1, 3]. Stąd zakłada się [1, 3], że istnieje jeszcze wiele niezidentyfikowanych gatunków z rodziny *Mimiviridae* i są to prawdopodobnie czynniki infekujące nie tylko koralowce (*Octocorallia*), ale także pierwotniaki oraz morskie bezkręgowce. Autorzy ci [1, 3] sugerują, że są one powszechne w środowisku wodnym i mają znaczący wpływ na regulowanie planktonowych populacji oraz innych morskich bezkręgowców. Dowodem tego są badania [3], w których wykazano, że wyizolowany genom mimiwirusów z Morza Sargasowego, wykazał aż 43% genów rdzeniowych, homologicznych dla opisanego mimiwirusa APMV. Obecnie przyjmuje się, że istnieje wiele dowodów na ich istnienie i mimo braku izolacji i charakterystyki większości z tych metagenomów, nie przeszkadza, by twierdzić, że stanowią one znaczącą część wirusów infekujących wiele gatunków ze świata zwierząt żyjących w morzach i oceanach, a także prawdopodobnie w wodach słodkich [1, 3]. Dowodem pośrednim istnienia mimiwirusów w środowiskach wodnych, mimo braku ilościowej oceny ich częstości występowania, jest fakt powiązania ich np. z morskimi bezkręgowcami, jakimi są koralowce, ale także gąbki [3]. W badaniach tych wykryto, że w mitochondrialnym DNA koralowca *Sarcophyton glaucum*, są homologiczne geny do tych, które kodują bakteryjne białko MutS [3], będące komórkowym „strażnikiem wierności” replikacji, a które spośród milionów par zasad DNA, posiada zdolność rozpoznania pojedynczej niekomplementarności [11]. Efektem tego jest to, że białko MutS precyzyjnie nakierowuje maszynę biologiczną usuwającą błędy poreplikacyjne do ściśle określonej lokalizacji w DNA [11]. Te ostatnie fakty to swoiste cechy wirusa APMV, zwanego także wirusem olbrzymim, bo jedną z nich jest rozbieżność w kodowaniu genów homologów białek MutS [1–3, 7, 9]. Badania porównawcze białek MutS wykazały zależność między genami kodującymi homologię tych białek u mimiwirusa APMV, a genami mitochondrialnymi koralowców *Octocorales* [3], co tłumaczy, że dzięki mimiwirusom, u ameb stworzona została platforma umożliwiająca wymianę genów na zasadzie transferu między prokaryotami i eukaryotami [3].

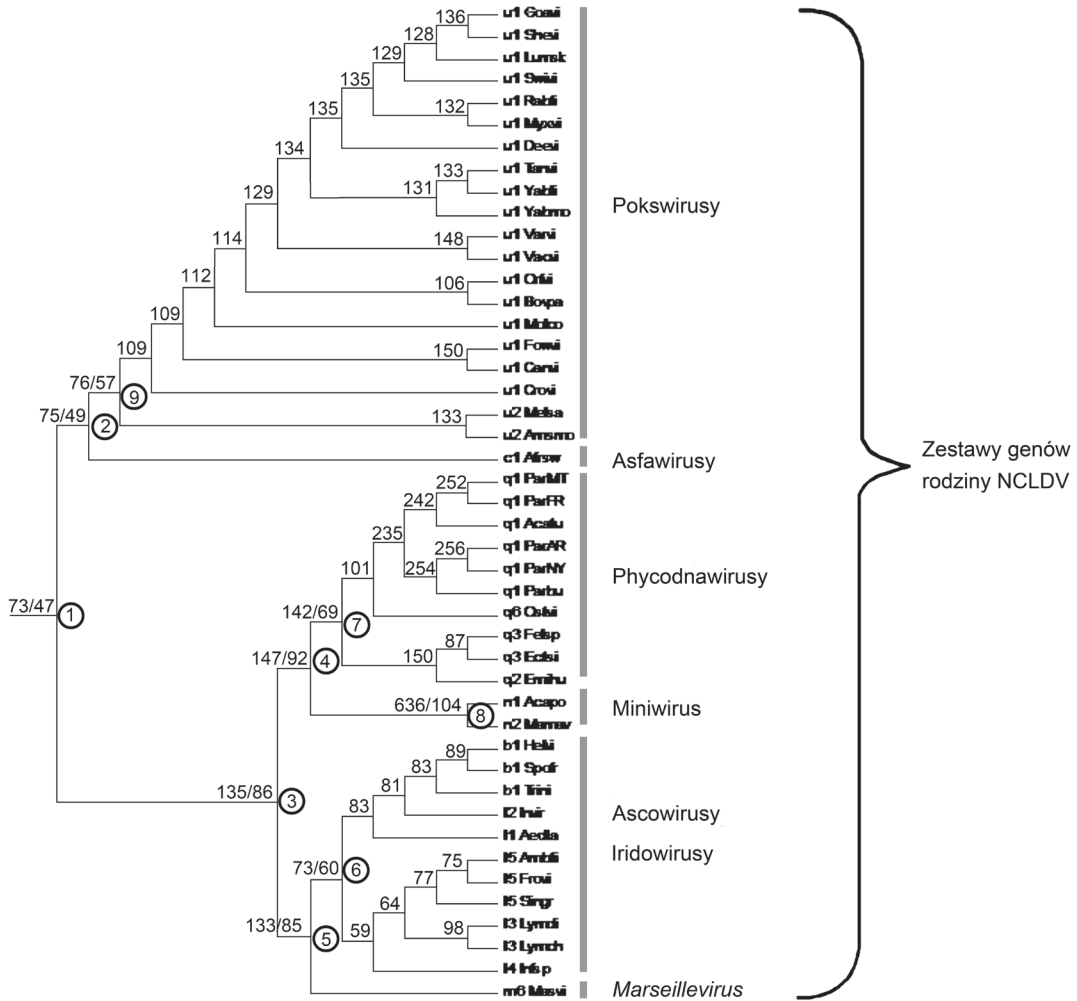
3. Mimiwirus APMV, a super-rodzina NCLDV (nucleocytoplasmic large DNA viruses)

Punktem zwrotnym w pracy nad genomiką porównawczą mimiwirusa APMV, były badania Iyer'a i wsp. [cyt. wg 3], którzy zaproponowali pogrupować wirusy z dużym dwuniciowym DNA w super-rodziny NCLDV [cyt. za 2, 3], do których zaliczono: phycodnawirusy – infekujące glony, iridowirusy – infekujące głównie ryby, ASF wirusy – wirus afrykańskiego pomoru świń i pokswirusy – zakażające ssaki [2, 3]. Wśród cech super-rodziny NCLDV, należy wymienić geny rdzeniowe, a także ich cykl replikacji odbywający się głównie w cytoplazmie żywiciela [3]. Wirusy należące do tej rodziny posiadają kapsyd o symetrii kubicznej (z wyjątkiem pokswirusów) i dość kompletny kodowany przez wirus aparat transkrypcji [3]. Podano także, że charakterystyczną cechą dla zakażeń wirusami z super-rodziny NCLDV, są widocznie inkluzje wewnątrz cytoplazmy, zwane „fabryką cząstek wirusa”. Natomiast badając sekwencje genomowe mimiwirusa APMV wykazano, że mimo iż należy on do super-rodziny NCLDV [2, 3], brak u niego wczesnej interakcji z materiałem genetycznym infekowanej komórki gospodarza [3]. Oznacza to, że u mimiwirusa APMV, funkcjonowanie kompleksu inicjującego transkrypcję wczesnych genów w cytoplazmie gospodarza, musi rozpocząć się natychmiast po infekcji [3]. Niezależnie od tych faktów wykazano, że mimiwirus APMV zajmuje istotne miejsce wśród wirusów super-rodziny NCLDV, ale bliskość filogenetyczną wykazuje tylko z phycodnawirusami i iridowirusami (Rys. 2), jak też podobny jest do nich w zakresie symetrii budowy [3, 15].

Dowiedziano, że APMV jest obdarzony pełnym aparatem replikacyjnym umożliwiającym rozpoczęcie początkowej fazy replikacji, niezależnie od jądra komórki gospodarza, co zbliża go pod tym względem do pokswirusów [3]. Przyjmuje się, że zgodnie z teorią zakładającą ewolucję redukcyjną, genom mimiwirusów posiada dużo cech wspólnych z hipotetycznymi wspólnymi przodkami super-rodziny NCLDV [2, 3].

4. Wirofag mamawirusa

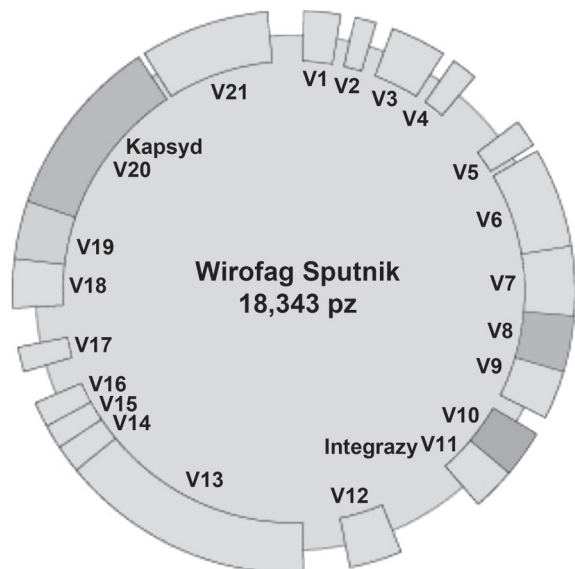
Wirus to zakaźny nukleoproteid posiadający tylko jeden rodzaj kwasu nukleinowego oraz receptor, który służy do przyłączania się do komórek gospodarza [4]. Stąd replikacja i „byt” wirusów są całkowicie zależne od żywych komórek eukariotycznych, bądź prokariotycznych, bo nie wykazują one metabolizmu [4]. Natomiast badania nad „olbrzymimi” wirusami wykazały, że mogą być one infekowane przez inne wirusy [1, 7, 9]. Fakt ten rzuca nowe światło na „życie” wirusów, a także sugeruje, że została przekroczona bariera dzieląca wirusy



Rys. 2. Rekonstrukcja rodowych zestawów genów rodziny NCLDV [15]

od organizmów komórkowych [1, 9]. Związane jest to z faktem opisania [cyt. wg 3] nowego przedstawiciela wirusów olbrzymów – mamawirusa, nazwanego tak, ponieważ był większy od opisanego mimiwirusa APMV [1, 3, 7, 9]. Obserwacje te [1, 3, 7, 9], prowadzone przy pomocy mikroskopu elektronowego, wykazały obecność na kapsydie mamawirusa, drugiego małego wirusa, ściśle z nim związanego. Nadano mu nazwę Sputnik (ros. „towarzysz podróży”) na cześć pierwszego satelity Ziemi [1, 7, 9]. Ten mały wirus ma wielkość ok. 50 nm, namnaża się gwałtownie po fazie eklipsy (utajenia) [7, 9], a jego genom w postaci dwuniciowego kolistego DNA posiada 18,393 pz [7, 14] (Rys. 3). Trzeba dodać, że kiedy mimiwirus APMV lub członkowie rodziny *Mimiviridae*, infekują żywą komórkę, tworzą w niej poprzez ekspresję genów „fabrykę cząsteczek wirusowych”, która bardzo przypomina jądro komórkowe [7, 9]. Taki sam schemat infekcyjny opisano u mamawirusa i to właśnie ta jego „fabryka cząsteczek wirusowych”, jest celem infekcji Sputnika [1, 7, 9]. Wykazano, że rozwój Sputnika jest szkodliwy dla mamawirusa, gdyż wywołuje produkcję niekompletnych form i anormalnych części kapsydu pierwotnego wirusa [7, 9].

Dowiedziano, że spośród 21 genów kodujących białka u Sputnika, co najmniej 3 wykazują wyraźną homologię do genów białek występujących u mimiwirusa APMV [7, 9]. Przyjęto, że najbardziej prawdopodobnym mode-



Rys. 3. Graficzne przedstawienie zestawu genomowego Sputnika [14]

lem tłumaczącym ten fakt jest to, że Sputnik nabył część genu (lub cały gen, który później został zredukowany) od mamawirusa, po jego oddzieleniu od wspólnego przodka jakim jest mimiwirus [7]. Biorąc pod uwagę analogię Sputnika do bakteriofagów, został on zaklasyfikowany jako wirofag (virophage), który może stanowić mechanizm pośredniczący w bocznym transferze genów między gigantycznymi wirusami [7, 9]. Zaobserwowano także, że koinfekcja Sputnika, była związana ze znaczącym wzrostem tworzenia się anormalnych wirionów mamawirusa, charakteryzujących się miejscowym zagęszczeniem kapsydu [7]. Stwierdzono także, że w niezainfekowanym wirionie mamawirusa, warstwa kapsydu miała grubość 40 nm, natomiast podczas obecności Sputnika wynosiła 240 nm [7]. Wykazano też, że zainfekowanie mamawirusa Sputnikiem, powoduje wzrost wydajności infekcyjnych mamawirusa ok. 70% oraz rejestruje się trzykrotne przyspieszenie lizy komórek ameby w ciągu 24 godzin po infekcji [7]. Te fakty obrazują, że Sputnik jest „pasożytem” mamawirusa, który wpływa znacznie na reprodukcję żywiciela [7, 9].

5. Podsumowanie

Przedstawione fakty [1–3, 7, 9, 10] upoważniają do przypuszczeń, że mimiwirusy, głównie w środowisku wodnym, wyewoluują do tego stopnia, że być może zainfekują także inne morskie zwierzęta, tak jak robią to obecnie wśród np. koralowców [1, 3]. Na razie jednak wiedza na temat tych „olbrzymów” wśród wirusów jest zbyt skąpa, chociaż rozważanie o nich pobudza ciekawość badaczy, bo niezwykłość wirusa APMV, ale także opisanego mamawirusa i jego wirofaga, dotyczy niespotykanych dotąd faktów wśród „obiektów” biologicznych [1–3, 7, 9, 10]. Nadto dane z tego zakresu doprowadziły do wznowienia dyskusji na temat wspólnego pochodzenia wirusów i organizmów komórkowych [1, 7, 9], a także wskazują, że czynniki zakaźne tak powszechnie występujące w środowisku wodnym, o tak ogromnych

rozmiarach jak mimiwirus APMV (także mamawirus), mimo wielu nowych metod stosowanych w naukach biologicznych, zostały odkryte i zidentyfikowane stosunkowo niedawno [1, 3, 7, 9], co dowodziłoby, że przyroda zawiera jeszcze wiele tajemniczych faktów dla człowieka, również w zakresie wirusologii.

Piśmiennictwo

1. Claverie J.M., Ogata H.: How to Infect a Mimivirus. *Science*, **321**, 1305–1306 (2008)
2. Claverie J.M., Abergel C.: Mimivirus and its Virophage. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 49–66 (2009)
3. Claverie J.M., Grzela R., Lartigue A., Bernadac A., Nitsche S., Vacelet J., Ogata H., Abergel C.: Mimivirus and Mimiviridae: Giant viruses with an increasing number of potential hosts, including corals and sponges. *J. Invertebr. Pathol.* **101**, 172–180 (2009)
4. Collier L., Oxford J.: *Wirusologia. Podręcznik dla studentów medycyny, stomatologii i mikrobiologii*. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2001
5. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV Master Species List 2009, <http://www.ictvonline.org>
6. Jura C.: *Bezkręgowce. Podstawy morfologii funkcjonalnej, systematyki i filogenezy*; Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2004
7. La Scola B., Desnues C., Pagnier I., Robert C., Barrassi L., Fournous G., Merchat M., Suzan-Monti M., Forterre P., Koonin E., Raoult D.: The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus, *Nature*, **455**, 100–105 (2008)
8. F. Marciano-Cabral, G. Cabral: Acanthamoeba spp. as Agents of Disease in Humans; *CMR*, 273–307 (2003) <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/16/2/273>
9. Pearson H.: ‘Virophage’ suggests viruses are alive, *Nature*, **454**, 677 (2007)
10. Raoult D. i wsp.: The 1.2-Megabase Genome Sequence of Mimivirus. *Science*, **306**, 1344–1350 (2004)
11. Sachadyn P.: <http://www.pg.gda.pl/chem/Katedry/Mikrobiologia/metagenomy.info.htm>
12. Science Photo Library <http://www.sciencephoto.com/media/78841/enlarge>
13. Śliwa J., Hukowska-Szematowicz B., Deptuła W.: Tajemniczy świat nanobakterii. *Laboratorium Medyczne*, **12**, 40–41 (2008)
14. Viralzone http://expasy.org/viralzone/all_by_species/670.html
15. Virology Journal <http://www.virologyj.com/content/6/1/223/figure/F8>