

Beata Tokarz-Deptuła<sup>1\*</sup>, Joanna Śliwa-Dominiak<sup>2</sup>, Mateusz Adamiak<sup>1</sup>,  
Michał Kubiś<sup>1</sup>, Anna Ogórkiewicz<sup>2</sup>, Wiesław Deptuła<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński  
<sup>2</sup>Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Wpłynęło w marcu 2013 r.

1. Wprowadzenie. 2. Wirofag Sputnik. 3. Wirofag Sputnik 2. 4. Wirofag Mavirus. 5. Wirofag OLV. 6. Inne wirofagi. 7. Wirofagi a wirusy satelitarne. 8. Podsumowanie

### Virophages – new biological elements

**Abstract:** Virophages are viruses which infect mainly giant viruses, from so-called super-family NCLD (nucleocytoplasmic large DNA viruses), which includes Mimivirus, Mamavirus, Lentille, CroV or Phycodna virus. They occur in the aquatic environment as infectious agents, especially for protozoa, flagellates, algae and micro-algae (mainly *Spirulina* sp. and *Chlorella* sp.). The first known virophage was Sputnik, for which the dominant host is Mamavirus living on the protozoa *Acanthamoeba* (*A.*) *polyphaga*. However, it can infect also Mimivirus living on protozoa *A. castellanii*. Sputnik was also considered as satellite virus, as its replication cycle requires the presence of Mamavirus or Mimivirus and also its genetic material is DNA. Thus, it is the first described dsDNA satellite virus. This virophage has its own gene encoding the capsid and its replication takes place in the Mamavirus and/or Mimivirus “factories”, creating a link between viruses and the animated world. The second discovered virophage after Sputnik was Sputnik 2, which was found in amoeba contaminated fluid (*Acanthamoeba polyphaga*) infected with the giant virus – *Lentille*. Sputnik 2, similarly to Sputnik, has the ability to introduce its DNA into the host genome, as evidenced by the discovery of its small fragments in the *Lentille* virus genome. The third discovered virophage was Mavirus, for which the host is a CroV virus (*Cafeteria roenbergensis virus*) infecting algae *Cafeteria* (*C.*) *roenbergensis*. Mavirus differs from Sputnik and Sputnik 2 as its cubic capsid has a diameter of 60 nm and its genome was found to be closely related to the class of eukaryotic DNA transposons. Thus, it has been proposed that Mavirus might have given a start to DNA transposons in Maverick/Polinton class. The fourth described virophage is the Organic Lake Virophage (OLV). It has been identified by similarity in its capsid protein sequence to the already discovered protein sequences in Sputnik. In addition to the four virophages described in this work, there are also other registered virophages, such as Yellowstone Lake Virophage (YSLCV) 1, 2, 3, 4 and Ace Lake Mavirus – ALM.

1. Introduction. 2. Sputnik virophage. 3. Sputnik 2 virophage. 4. Mavirus virophage. 5. OLV virophage. 6. Other virophages. 7. Virophages and satellite viruses. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** ALM, OLV, Sputnik 1, 2, wirofagi, YSLV

**Key words:** ALM, OLV, Sputnik 1, 2, virophage, YSLVs

## 1. Wprowadzenie

Jedną z najbardziej zdumiewających informacji z zakresu faktów biologicznych w ostatnich kilku latach była wiadomość o istnieniu wirusów mogących atakować wirusy, a które nazwano wirofagami – „pożeraczami wirusów” [29, 35]. Fakt, że wirusy atakują komórki bakteryjne był znany już od 1896 roku i te określono jako bakteriofagi. Wśród wirusów opisano również bardzo ciekawe, groźne patogeny infekujące rośliny, nazwane od 1971 roku wiroidami. Natomiast obecnie zarejestrowano zdumiewający fakt, że wirus nie będący organizmem komórkowym, potrafi atakować inne wirusy, też nie będące komórkami.

Wykazano, że wirofagi infekują głównie olbrzymie wirusy – powyżej 400 nm – m.in. z rodzaju Mimivirus, którego przykładem jest APMV (*Acanthamoeba polyphaga mimivirus*), pierwszy opisany przedstawiciel wirusów olbrzymich, czy wirusy olbrzymie z rodzaju

Mamavirus [8, 9, 29]. Według La Scola [22] oprócz tych dwóch wirusów olbrzymich – Mimi- i Mamawirusów – występują także inne wirusy olbrzymie, określane jako NCLDV (Nucleocytoplasmic Large DNA Viruses), których 19 wyizolowano z prób środowiskowych, w latach od 2008 do 2010. Przyjmuje się, że aż 14 z nich, to wirusy o wymiarze większym niż 400 nm, wykazujące podobieństwo do pierwszego scharakteryzowanego wirusa olbrzymia – Mimiwirusa, które są infekowane przez wirofagi [6, 8, 21, 26, 29]. Opisane obecnie wirofagi, rzucają nowe światło na istotę „życia”, w tym wirusów i pokazują, że została przekroczona bariera dzieląca wirusy od organizmów komórkowych [6, 26, 27, 35], co w szczególności wiąże się z faktem opisanym wirusa nazwanego Mamawirusem, większego od odkrytego wcześniej Mimiwirusa [5, 29]. Wykazano, że oba te wirusy olbrzymie (Mimiwirus i Mamawirus), pod wieloma aspektami są do siebie podobne [5, 6, 8, 21, 26], a ponadto wykazano, że na kapsydzie Mamawirusa

\* Autor korespondencyjny: Katedra Immunologii, Wydział Biologii US, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; tel. 91 444 16 10; fax 91 444 16 06; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl

Tabela I  
Opisane wirofagi [4, 7, 8, 14, 16, 27, 31, 34]

Lp.	Wirofagi	Miejsce występowania	Zaobserwowane miejsce zakażenia i miejsce odkrycia
1.	Sputnik	Mamavirus i Mimivirus	Pierwotniak ( <i>Acanthamoeba (A) polyphaga</i> ) – woda z wieży wiertniczej w Bradford Pierwotniak ( <i>A. castellanii</i> )
2.	Sputnik 2	Lentille virus	Pierwotniak ( <i>A. polyphaga</i> ) – płyn soczewek kontaktowych u kobiety
3.	Mavirus	CroV	Wiciowiec jednokomórkowy ( <i>Cafeteria roenbergensis</i> ) – woda morska Texasu bogata w zooplankton
4.	OLV (Organic Lake Virophage)	Phycodna virus	Glony morskie – woda silnie zasolonego Jeziora Organicznego na Antarktydzie
5.	YSLV 1 (Yellowstone Lake Virophage 1) – materiał metagenomowy	Phycodna lub Mimivirus (?)	Mikroalgi? – wody jeziora w pakru Yellowstone
6.	YSLV 2 (Yellowstone Lake Virophage 2) – materiał metagenomowy	Phycodna lub Mimivirus (?)	Mikroalgi? – wody jeziora w pakru Yellowstone
7.	YSLV 3 (Yellowstone Lake Virophage 3) – materiał metagenomowy	Phycodna lub Mimivirus (?)	Mikroalgi? – wody jeziora w pakru Yellowstone
8.	YSLV 4 (Yellowstone Lake Virophage 4) – materiał metagenomowy	Phycodna lub Mimivirus (?)	Mikroalgi? – wody jeziora w pakru Yellowstone
9.	ALM (Ace Lake Mavirus) – materiał metagenomowy	Mimivirus (?)	Pierwotniaki? – wody Antarktyki

jest mały intruz, będący także wirusem [5, 6, 8, 21, 26]. Temu „pasażerowi” nadano sympatyczną nazwę Sputnik (ros. „towarzysz podróży”), na cześć nazwanego tak pierwszego satelity Ziemi [6, 8, 20, 26, 28, 29]. Wykazano także, że dominującym gospodarzem dla Sputnika jest Mamavirus, żyjący na pierwotniakach *Acanthamoeba (A) polyphaga*, choć dowiedziono, że Sputnik może również skutecznie infekować Mimiwirusa żyjącego na pierwotniakach *A. castellanii* i co ważne, z tą samą kinetyką replikacji [8, 28]. Fakty te dały początek badaniom tych niecodziennych „elementów” biologicznych jakimi są opisane wirofagi (tab. I), spośród których, w obecnej pracy opisano cztery – to jest Sputnik, Sputnik 2, Mavirus i OLV.

## 2. Wirofag Sputnik

Sputnik można uznać za najstarszy i pierwszy poznany – w 2008 roku – wirofag, który jest małym dsDNA wirusem o ikosaedralnym kapsydie średnicy ok. 74 nm [5]. Jego kapsomery są formowane z trimerycznych cząsteczek głównego białka kapsydu, złożonych w pseudoheksamerycznych i pentamerycznych jednostkach, tworzących zewnętrzną powłokę kapsydu w wirionie [21] i są ulokowane w wierzchołkowej części kapsydu, nie tworząc wypukleń. W centralnej części pentameru tworzą jamę, która może służyć jako portal do wyjścia lub wejścia DNA [31, 34]. Badania mikroskopią elektronową wirofaga Sputnik wykazały także obecność dwuwarstwowej lipidowej błony pod jego kapsydem, co potwierdzono badaniami za pomocą spektrometrii mas,

a która to błona składa się od 12% do 24% z lipidów, w tym głównie z fosfatydyloseryny, co dowodzi o istnieniu tłuszczowej membrany wewnątrz Sputnika, otaczającej DNA [8]. Obecnie wiadomo, że infekcja ameb *A. polyphaga* przez Sputnik, zachodzi tylko z udziałem Mamawirusa oraz Mimiwirusa. Potwierdzeniem tych faktów są badania zespołu La Scola [8, 21], w których wykazano, że infekcja tych ameb Sputnikiem, przy jednoczesnym braku Mama- czy Mimiwirusa, nie spowodowała lizy komórek ameb, co potwierdzone zostało wykazaniem braku cząstek Sputnika w tych amebach, w obrazie mikroskopii elektronowej (TEM) i immunofluorescencyjnym, choć nadal droga wnikania Mama- czy Mimiwirusów do ameb, jest mało poznana [8, 21]. Jedynie wykazano, że w przypadku Mimiwirusa dostaje się on do ludzkich i mysich makrofagów na drodze fagocytozy, czyli mechanizmu najczęściej utożsamianego z pochłanianiem zarazków przez komórki fagocytyczne np. komórki PMN (polimorfonuklearne – granulocyty obojętnochłonne) [8]. Ponadto dowiedziono, że włókna powierzchniowe tak Mamawirusa jak i Mimiwirusa, mające glikozylowane białka długości ok. 140 nm i średnicy 1,4 nm, przyczyniając się do ich wyjątkowej wielkości i są oddzielone białkiem czołowym o około 25 kDa, które jest przymocowane do kapsydu [20]. To gęste pokrycie kapsydu tymi włóknami, tworzy warstwę ochronną, odporną na proteazy, co sprawdzono traktując te wirusy lizozymem [31]. Pokrycie to przypomina peptydoglikan występujący w bakteriach i możliwe, że ten element przyczynia się też do aktywacji mechanizmu wejścia Mamawirusa i Mimiwirusa, w tym także innych olbrzymich wirusów min. do ameb [6, 8, 20, 27,

31]. Wykazano, że dzięki włóknom powierzchniowym olbrzymich wirusów, wirofag Sputnik może być pochłaniany wraz z Mama- i Mimiwirusami przez ameby, do tej samej wakuoli endocytarnej [8, 29]. Dowiedziono to przy pomocy immunofluorescencji mysimi przeciwciałami anty-Sputnik, które wykryto wewnątrz ameby, już w 30 min po infekcji wirusami olbrzymimi (Mama- i Mimiwirusem) [8]. Ponadto lokalizacja sygnałów Sputnika i Mimiwirusa u ameb dodatkowo wskazuje, że oba te wirusy rozpoczynają funkcjonowanie, w tych samych endocytarnych wakuolach [8]. Natomiast jak do tej pory, nieopisano mechanizmu uwalniania genomu Sputnika z cytoplazmy ameb, choć przyjmuje się, że prawdopodobnie uwalnia się on dzięki „dostawom” do ameb między innymi Mimiwirusa [8]. Obecnie wiadomo jest, że w trakcie replikacji, genom Mimiwirusa wydostaje się przez otwór utworzony w błonie endocytarnej wakuoli w amebie i wewnętrznej błonie wirusowej, co stanowi element procesu związanego z przegrupowaniem na dużą skalę kapsydu Mimiwirusa [34]. Stwierdzono, że genom Mimiwirusa, jest zamknięty w pęcherzyku (rdzeń Mimiwirusa), który prawdopodobnie pochodzi z wewnętrznej błony wirusa [34]. Mikroskopią elektronową stwierdzono, że transkrypcja nowosyntetyzowanych cząsteczek mRNA Mimiwirusa zachodzi dość szybko, bo jego gromadzenie rejestruje się już 4 godziny po infekcji w obszarach położonych na obwodzie rdzenia wirusa, a uwalnianie wirionów potomnych Mimiwirusów zachodzi między 6 i 8 godziną po zakażeniu [8]. Ta mimiwirusowa „fabryka” działa tak, że potomne wiriony Sputnika zaczynają być wytwarzane na jednym biegunie, przed syntezą nowych cząsteczek Mimiwirusów, która zachodzi na drugim biegunie. Czasami proces ten wydaje się być podzielony na dwie części: A – część wypełniona „potomstwem” Sputnika i B – produkująca Mimiwirusa [8, 17]. Zarejestrowano, że po 16 godzinach od infekcji ameby przez Mimiwirus, komórki tych organizmów są całkowicie wypełnione nowo utworzonymi wirionami Mimiwirusa, ale także wirofagami Sputnika, z tym, że cząstki Sputnika lokalizują się w cytoplazmie ameby lub w okolicach lipidowej błony wakuoli [8, 17]. Wykazano też [8], że około 92% komórek ameb ulega lizie po 24 h hodowli z kulturami Mamawirusa, podczas gdy tylko 79% lizuje po infekcji Mamawirusem i koinfekcji Sputnikiem, to znaczy, że obecność Sputnika w 13% obniża miano zakażenia Mamawirusa, co wskazuje, że Sputnik jest „lekiem” dla ameb. Wykazano, że Sputnik związany jest tylko ze szczególnym typem gospodarza, bo np. nie replikuje z *Marseillevirus* – innym olbrzymim wirusem NCLDV, stwierdzonym w zainfekowanej amebie [2] i innymi wirusami, podobnymi do niego [1]. Zatem Sputnik może „żyć” – bytować, w tzw. związku z wirusami, ale tylko podobnymi do Mimi-, czy Mamawirusa, chociaż ma wyższe powinowactwo do Mamawirusa [8].

Genom (dsDNA) Sputnika jest wielkości 18,343 pz, którego 21 genów koduje białka o wielkości od 88 do 779 aminokwasów, a kodony START i STOP, to głównie AUG i UAA [21]. Organizacja jego genomu jest podobna do organizacji innych genomów wirusowych, w tym bardzo szczelny jest układ zbudowany z małych nakładających się otwartych ramek odczytu (ORF) [8, 21]. Średnia odległość między dwoma ORF wynosi ok. 190 reszt nukleotydów [8, 21]. Dystrybucja genów kodujących białka Sputnika wykazuje stronniczość nici w kierunku dodatniej nici 17 ORF, a wysoka zawartość A+T (73%) w jego genomie, upodabnia go do Mamawirusa i Mimiwirusa [8]. Zarejestrowano także, że ekspresja genów Sputnika nie koduje własnej zależnej od DNA polimerazy RNA, stąd przypuszcza się, że może on wykorzystywać tę z transkrypcji Mimiwirusa. Dowodem na to jest wykrycie sygnału poliadenylacji w unikalnej strukturze „spinki do włosów” Mimiwirusa [2, 3] oraz obecność późnego promotora w genomie Sputnika [8]. Podobnie jak w przypadku innych wirusów eukariotycznych, u Mimiwirusa białka kodujące geny ulegają ekspresji w postaci poliadenylowanych transkryptów. Ponad 80% z jego dojrzałych cząsteczek mRNA, na końcu 3', zawiera sekwencje palindromowe, umożliwiając doskonale sparowania, z co najmniej 13 kolejnymi nukleotydami o strukturze podobnej do struktur „spinki do włosów” [2], których jak się zakłada, w genomie Sputnika jest 16 [3]. Wykazano także, że rozkład tych sygnałów nie jest przypadkowy, ponieważ 14 z nich, znajduje się w regionach międzygenowych, natomiast tylko 2 znajdują się w samych genach. Badając transkrypty mRNA Mimiwirusa dowiedziono, że transkrypcja jego genów jest regulowana przez wczesne, średnie i późne promotory, tak jak ma to miejsce u Sputnika [8]. Oceniając białka z oczyszczonych cząsteczek Sputnika za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej wykazano [21], że białka kodowane przez ORF 20, są w 55 spośród 60 wykrytych miejsc i odpowiadają one głównie osłonce białkowej wirionów [21]. Zidentyfikowano też dwa inne białka kodowane przez ORF 8 i ORF 19, które mogą odpowiadać drobnym białkom wirionów, wykazujących acetylację ich N-końcowych aminokwasów, powszechnych w komórkach eukariotycznych. Dowiedziono, że wirusowe cząstki Sputnika zawierają wszystkie wirusowe RNA, z wyjątkiem ORF 17, który koduje transpozazy, choć ORF 17 mRNA, wykryto już po 4 h od infekcji, co dokumentuje, że gen ten jest funkcjonalny [10].

### 3. Wirofag Sputnik 2

Drugi po odkryciu Sputnika, stwierdzony w płynie zanieczyszczonym amebą (*Acanthamoeba polyphaga*) zakażoną przez olbrzymi wirus – *Lentille*, to wirofag,

który nazwano Sputnik 2. Ciekawym faktem w przypadku tego wirofaga jest to, że w jego wnętrzu znaleziono małe fragmenty DNA w postaci ruchliwych, niezależnych kawałków, które także stwierdzone były w genomie wirusa *Lentille*. Takie ruchliwe cząsteczki „pasożytniczego” DNA mogą się włączyć samodzielnie w genom gospodarza – tak jak to czynią inne wirusy (np. HIV i Herpeswirus) umieszczając swoje DNA w genomie np. zakażonych zwierząt, lub zostać na zewnątrz. Fragmenty tego DNA nazwano transpozonami, honorując podobny ich charakter do transpozonów – tzw. genów skaczących [5, 9]. Są przypuszczenia, że dzięki takiej cesze Sputnika 2, może on stanowić pewien „środek transportu” – przenoszenia genów pomiędzy gospodarzem (amebą), a wirusem olbrzymim – w tym przypadku wirusem *Lentille* [9]. Ponadto cecha ta może być wyjaśnieniem tego, że różne wirusy olbrzymie mają często podobne geny.

#### 4. Wirofag Mawirus

Podczas badań mających na celu lepsze poznanie biologii wirusa *CroV* (*Cafeteria roenbergensis virus*) infekującego algi *Cafeteria* (*C.*) *roenbergensis* odkryto wirofag, który nazwano Mawirusem (nazwa pochodzi od Maverick virus) [4, 7, 8, 14, 16]. Mawirus różni się od Sputnika i Sputnika 2 tym, że ma kubiczny kapsyd o średnicy 60 nm. U tego wirofaga nie znany jest skład białek jego wirionu, z wyjątkiem opisanego, głównego białka kapsydu MV18 (putative major capsid protein) [8, 15, 16]. Dodatkowo wykazano, że białka kapsydu, zarówno Mawirusa, jak i Sputnika są do siebie podobne, natomiast nie wykazują one podobieństwa w stosunku do białek kapsydu innych wirusów [15, 16].

Genom Mawirusa jest kolistą cząsteczką dwuniciowego DNA (dsDNA) i składa się z 19 063 pz. W jego genomie stwierdza się obecność 20 sekwencji CDSs (protein-coding sequences) o średniej długości 883 nt, nazwanych MV01, MV02, MV03, MV06, MV13, MV15, MV16, MV18, MV19 i MV20 [15]. Ekspresja genów Mawirusa podlega „maszynerii” transkrypcyjnej wirusa *CroV* w późnym stadium infekcji [15, 16]. Dziesięć sekwencji CDSs Mawirusa wykazało homologię z sekwencjami białkowymi eukariontów, retrovirusów i bakterii oraz wirusów dsDNA, a także, co najmniej z czterema genami opisanymi u Sputnika [15, 16]. Stwierdzono, że Mawirus i Sputnik mają homologiczne geny kodujące białko kapsydu i stąd jak wspomniano, białko kapsydu tych dwóch wirofagów jest podobne [15,16]. Zarejestrowano, także, że gen MV01 koduje superrodzinę 3 helikaz (SF3H helicase) podobnych do D5 ATPazy, która jest uważana za główną helikazę replikacyjną u wirusów NCLDV [18].

W przeciwieństwie do NCLDV, gdzie domena SF3H znajdująca się na C-końcu primazy-helikazy białka fuzyjnego, domena S3H Mawirusa zlokalizowana jest na N-końcu i niewyjaśniono do tej pory jej funkcji [14, 16, 18]. Natomiast gen MV02 koduje integrazę należącą do superrodziny retrovirusowych integraz (rve-INTs) [11]. Odkryto również, że zarówno integrazy Mawirusa, jak i organizmów eukariotycznych zawierają C-terminalną domenę CHROMO, która jest konserwatywnym regionem ~60 aa, zdolnym do interakcji z poszczególnymi częściami chromatyny [14, 15, 16]. MV03 koduje polimerazę B DNA (predicted protein-primed DNA polymerase B), której homologi występują u bakteriofagów, adenowirusów, jak również jako genom mitochondrialny roślin, grzybów i śluzowców [15]. MV06 koduje endonukleazy GIY-GIY, zaś MV13 zawiera domeny hydrolaz alpha/beta podobne do domen znalezionych w lipazach [35]. MV15 koduje ATPazę FtsK-HerA, zaś MV16 proteazę cysteinową, natomiast MV18 koduje główne białko kapsydu [15]. Wykazano, że domena C-terminalna MV19 ma znaczące podobieństwo do łańcuchów powierzchniowych ściany komórkowej *Bdellovibrio bacterivorous*, zaś ostatnie białko MV20 tego wirofaga zwiera trzy powtórzenia FNIP/IP22 [15]. Te trzy powtórzenia o długości ~22 aa, są obecne u Mimiwirusów, śluzowców *Dictyostelium discoideum* i *Polysphondylium pallidum*, alg *Ectocarpus siliculosus*, a także w genomie wirusa olbrzymiego *CroV* [25]. Wykazano, że genom Mawirusa okazał się być ściśle związany z klasą eukariotycznych transpozonów DNA i stąd zaproponowano, by Mawirus dawał początek transpozonom DNA w klasie Maverick/Polinton. Powstała hipoteza, że pierwotne jego formy stanowiły ochronę przed infekcjami wirusów litycznych, co doprowadziło do transformacji, rozproszenia i utrwaleńia pochłoniętych wirusów w genomie wielu komórek eukariotycznych [14, 16]. Mimo, że nie jest możliwe odtworzenie tak wczesnych ewolucyjnych wydarzeń, wydaje się, że wirusowa teoria transpozogenezy tworzy nowe pytania, m.in. czy wirofagi mogą ingerować do genomu komórki eukariotycznej oraz czy wirofagi mogą uczestniczyć w poziomym transferze genów pomiędzy gigantycznymi wirusami [14, 16]. Przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego dowiedziono, że wirofag Mawirus dostaje się do komórki *C. roenbergensis* na drodze endocytozy, za pośrednictwem białka klatryno-zależnego i rozpoczyna replikację w *CroV*, co prowadzi do powstawania nieprawidłowych struktur jego kapsydu [15, 16]. Wykazano, że w trakcie zakażenia jądro gospodarza (*C. roenbergensis*) pozostaje nienaruszone, a cząsteczek wirusów, zarówno *CroV*, jak i Mawirusa nie zaobserwowano w nim aż do późnych etapów infekcji, co sugeruje, że replikacja tych wirofagów następuje wyłącznie w cytoplazmie [15, 16].

## 5. Wirofag OLV

Wirofag Jeziora Organicznego (OLV – Organic Lake Virophage,) został opisany po raz pierwszy podczas badań prowadzonych w latach 2006–2008 w wodach antarktycznego Jeziora Organicznego, przez australijski zespół badawczy prowadzony przez mikrobiologa Ricardo Caviccholi z Uniwersytetu Nowej Południowej Walii [33]. Zidentyfikowano go dzięki podobieństwu jego sekwencji białkowych w kapsydzie do odkrytych już wcześniej sekwencji białkowych znajdujących się w Sputniku [33]. Jego genom został wykryty między sekwencjami genomowymi Phycodnawirusów, które są dużymi wirusami atakującymi algi morskie z rodzaju *Pyramimonas* [32, 33]. OLV infekując Phycodnawirusy stwarza w tym środowisku warunki do lepszego wzrostu glonów w wodach jeziora i stwarza im warunki przetrwania [24, 32, 33]. Analiza sekwencji nukleotydowych pochodzących z próbek wody pobranej z Jeziora Organicznego, wykazała obecność nowych Phycodnawirusów – dużych dsDNA wirusów infekujących glony, wśród których zidentyfikowano wirowag OLV, posiadający kulisty genom o wielkości 26 421 pz. Przyjmuje się, że OLV replikuje w komórkach zakażonych Phycodnawirusem, hamując jego dalszą replikację [24, 32, 33]. Wykazano, że aż sześć genów OLV jest związanych z genami Phycodnawirusów, co sugeruje, że nastąpiła wymiana genów między wirusami, a wirowagami prawdopodobnie podczas jednoczesnego zakażenia tego samego gospodarza. W związku z tym, że jeziora antarktyczne mają długie cykle dnia i nocy, to wzrost śmiertelności Phycodnawirusów spowodowany atakiem wirowagów, może mieć istotny wpływ na utrzymanie stabilności mikrobiologicznej. Sekwencje genomu OLV stwierdzono również w próbkach wody pobranych z jeziora Ace [24, 32, 33], co sugeruje, że OLV może występować w środowiskach wodnych na różnych obszarach naszej planety [32]. Ciekawym jest fakt wykrycia homologów Sputnika w OLV, w regionach V20 kodujących białka chemotaktyczne monocyta MCP, V3 – kodujące ATPazę DNA oraz białka V13 – kodujące domniemaną polimerazę DNA, a także homologii genów o nieznannej funkcji w regionach V9, V18, V21 i V32 [33]. Ponadto, w genomie OLV wykryto region OLV12 pochodzący od wirusa infekującego *Chlorella*, co oznacza, że musiała nastąpić wymiana materiału genetycznego między OLV, a dsDNA Phycodnawirusem. Porównując genom OLV z genomem OLPV (*Organic Helper Phycodnaviruses*) wykazano, że 7408 pz OLV, kodujących 6 białek (OLV17–22) jest podobnych w 32–65% do sekwencji zarówno w regionach OLPV-1 i OLPV-2, obecnych u Phycodnawirusa atakującego algi morskie. Badania te umożliwiły zrozumienie roli niektórych regionów wykazując, że regiony OLV20 i OLV13, kodującą trójniciową strukturę kolagenu [33]. Stwier-

dzono, że OLV22 koduje małe białko (152AA) o nieznannej funkcji, jednak o wysokim podobieństwie do APMV. Natomiast niektóre geny znajdujące się w regionach OLV19 i OLV20 kodujące – podobnie jak regiony OLV20 i 13 – białka takie jak kolagen, prawdopodobnie ułatwiają interakcje pomiędzy wirowagiem, a atakowanym przez nie wirusem [33]. Opisano, że region OLV12 jest unikalny dla OLV, ponieważ składa się z C-końca i posiada konserwatywną domenę hipotetycznych białek należących do *Chlorella* wirusów oraz domenę N-końcową najbardziej zbliżoną do 3 klasy lipaz, które mogą odpowiadać za selektywność OLV w stosunku do PVs (Protein Variability Server), jak też homologii NCLDV, które są zaangażowane w replikacji DNA [33]. Domena helikaz OLV25 jest podobna do białka obecnego u zielonej algi morskiej *Ostreococcus lucimarinus*, co sugeruje związek OLV z gospodarzem. Wykazano, że geny charakterystyczne dla OLV, wskazują na umiejętność dostosowania się do systemu replikacyjnego OLPV [30]. Wirus OLV przede wszystkim posiada N6 adenospecyficzną metylotransferazę DNA, podobnie jak OLPV. W OLPV-1 geny bakteryjne restrykcyjnego systemu modyfikacji znajdują się w sąsiedztwie genu kodującego metylazę-S typu I, rozpoznającą białko domeny i helikazę DNA odległą ale związaną z III typem podjednostki endonukleazy restrykcyjnej [33]. Zarejestrowano, że prototyp *Chlorella* wirusa PBCV-1, ma zdolność ograniczania aktywności endonukleaz dostających się do wirionu i degradującego DNA gospodarza wkrótce po zakażeniu [33]. Wskazuje to, że N6 adenospecyficzna metylotransferaza DNA obecna w OLV, zmniejsza atak endonukleolityczny za pośrednictwem OLPV na komórki gospodarza [33]. W celu dokonania oceny, w jaki sposób OLV wpływa na aktywność OLPV oraz dynamikę wzrostu i rozwoju populacji gospodarza, wykonano stymulację Lotka-Volterra, w której założono, że OLV jest drapieżnikiem atakującym OLPV. To doświadczenie wykazało, że zmniejszyła się liczba OLPV w komórkach populacji algi morskiej, co udowadnia, że wirowag zmniejsza ogólną śmiertelność glonów, na których bytuje oraz co manifestuje się zwiększoną ich częstotliwością zakwitów w okresach letnich [19, 23, 33].

## 6. Inne wirowagi

Poznanie istoty głównie występowania wirowaga Sputnika, choć zapewne także i występowanie innych wirowagów (tab. I), rzuca nowe światło na temat „życia” w tym wirusów [6, 8, 26, 28, 35]. Wśród innych wirowagów oprócz Sputnika, Sputnika 2, Mawirusa, Organic Lake Virophage – OLV, zarejestrowano występowanie jeszcze 5 innych tj. Yellowstone Lake Virophage 1, 2, 3, 4 – YSLV-1, 2, 3, 4 i Ace Lake Mavirus – ALM (tab. I). Wirowagi te występują głównie na wirusach olbrzymich

z tak zwanej super – rodziny NCLD – nucleocytoplasmic large DNA viruses, jak Mimivirus, Mamavirus, Lentille, CroV czy Phycodna, które są głównie ich gospodarzem i które występują w środowisku wodnym jako czynniki zakaźne głównie dla mikroalg (głównie *Spirulina* sp. i *Chlorella* sp.) jak i prawdopodobnie pierwotniaków (tab. I). Przypuszcza się i to, że wirusy te mogą z czasem wyewoluować i zakażać także inne morskie organizmy [8]. Ponadto zwracając uwagę na obserwowane miejsca zakażenia i miejsce odkrycia wszystkich opisanych dotąd wirofagów (tab. I), jak wody z wieży wiertniczej w Bradford, płyn do soczewek kontaktowych, wody morskie Texasu, silnie zasolone wody Jeziora Organicznego na Antarktydzie czy wody jeziora parku Yellowstone (tab. I) wskazują, że nie ma granicy środowiska wodnego, co do ich obecności [8]. Przypuszcza się, że być może już wkrótce, będzie można klasyfikować opisane wirofagi (tab. I) jako czwartą domenę życia, co jeszcze kilka lat temu wydawałoby się absurdalne, bo przecież o samym wirusie wciąż nie można powiedzieć, że „żyje”, chociaż fakt, że może on być infekowany przez inne wirusy, zmienia podejście do istotnych aspektów definiujących „życie”, właśnie tych czynników zakaźnych [6, 8, 26, 28, 35]. Najbardziej poznany spośród wirofagów Sputnik [29], stał się ogniwem łączącym wirusy ze światem ożywionym, stąd można założyć, że w świecie mikrobiologii, w tym wirusologii, fakty z nim związane rzucają nowe spojrzenie, na te zdawałoby się dobrze dotąd poznane czynniki zakaźne, jakimi są wirusy, a wśród których dochodzi do licznych zmian ewolucyjnych. Ponadto metagenomiczne badania oceanu z ostatnich lat, ujawniły mnóstwo sekwencji genetycznych ściśle związanych z wirusami olbrzymimi, co nasuwa podejrzenia, że są one pasożytami planktonu i możliwe, że nośnikami nowych wirofagów, do tej pory nie zarejestrowanych. Ważnym wydaje się być i to, że podczas tych badań wód oceanu, wśród zidentyfikowanych w nich genów, ponad 70% jest takich, których nigdy wcześniej nie identyfikowano [26].

## 7. Wirofagi, a wirusy satelitarne

Wirusy satelitarne są czynnikami, które zależą od innego wirusa tzw. pomocniczego, który jest im potrzebny do replikacji. Ponieważ pierwszy opisany wirofag Sputnik wymaga obecności Mamawirusa lub Mimiwirusa aby osiągnąć swój cykl replikacji ale posiadający własny gen kodujący kapsyd, można go uznać za wirus satelitarny. Termin wirus satelitarny – satelita, został po raz pierwszy wprowadzony w 1962 roku przez Kassinis'a, opisującego związek między wirusem nekrozy tytoniu (TNV) i towarzyszącym mu małym wirusem nekrozy tytoniu (STNV) [8]. Wśród wirusów satelitarnych są dwie klasy, to jest wirusy wewnętrzne – o geno-

mie kodującym własne białka kapsydu oraz kwasy nukleinowe (ssDNA lub ssRNA) i wirusy o genomie nie kodującym żadnych białek strukturalnych [8].

Pierwsza klasa jest reprezentowana przez jeden z ludzkich wirusów związanych z adenowirusami – wirusami towarzyszącymi adenowirusom – AAV, (*adeno-associated virus*), które zostały odkryte w 1965 roku w preparatach wirusowych jako małe, bezosłonkowe wirusy z kapsydem ikosaedralnym w zakresie od 20 do 24 nm średnicy [8]. Obecnie AAV są sklasyfikowane jako *Dependovirus* w rodzinie *Parvoviridae*, ale nie są ujęte w grupie satelitarnych wirusów w klasyfikacji ICTV [12]. Druga klasa satelitarnych wirusów obejmuje wszystkie wirusy satelitarne [12] składa się z wirusów ssRNA infekujących owady (podgrupa 1) i rośliny (podgrupa 2). Przykładem wirusa z podgrupy 1 jest wirus satelitarny powodujący chroniczny paraliż pszczoł (CBPSV), który po raz pierwszy został opisany w 1980 roku [12], charakteryzujący się wielkością ok. 17 nm i posiadający jedno białko kapsydowe wielkości ok. 15 kDa [8]. Genom wirusa CBPSV, składa się z trzech fragmentów ssRNA równej wielkości i około 1100 reszt nukleotydowych każdy, o różnych strukturach drugorzędowych. Jednak nie jest do końca pewne, czy CBPSV jest prawdziwym wirusem satelitarnym [8]. Obecnie, za najbardziej uznane wirusy satelitarne uważa się jednak te, które przypominają STNV (wirusem nekrozy tytoniu), będący przedstawicielem podgrupy 2 i wszystkie one zależą od wirusów roślinnych, potrzebnych im do replikacji. Stąd w przypadku Sputnika można uznać go za satelitę (wirus satelitarny), gdyż wiadomo, że do swojej replikacji wymaga on obecności Mamawirusa i/lub Mimiwirusa. Sputnik jest pierwszym opisanym wirusem satelitarnym dsDNA, posiadającym genom o wielkości 18,3 pb i kapsydie o około 50 nm (średnicy o około 74 nm) i o głównej masie cząsteczkowej białka kapsydu wynoszącej 65 kDa, co pokazuje jego wielkość i co oznacza, że jest on większy niż obecnie znane wirusy satelitarne. Ponadto w przeciwieństwie do AAV, Sputnik nie może zainfekować ameb w przypadku braku Mamawirusa i/lub Mimiwirusa, stąd stwierdza się, że namnożenie Sputnika odbywa się w „fabrykach” Mamawirusa i/lub Mimiwirusa, co potwierdzono hybrydyzacją *in situ*, za pomocą sondy specyficznej dla Sputnika w Mamawirusie [8]. Ponadto zarejestrowano, że obniżenie zjadliwości wirusów jest m.in. związane ze zmniejszeniem ich replikacji, co jest często obserwowane w związku z wirusami satelitarnymi, choć w takich przypadkach nie zarejestrowano zmian w ich morfologii. Warto dodać, że wirofag Sputnik różni się od innych wirusów satelitarnych i tym, że nie hamuje procesu replikacji gospodarza, co prowadzi do wytwarzania cząstek Mamawirusa, ale z nadmierną grubością warstwy osłonki i niekompletnych skupisk włókien na obwodzie jego cząstek [8, 28].

## 8. Podsumowanie

Wśród takich niecodziennych form życia, jakim są wirofagi, w tym wirofag Sputnik, który można tak nazwać głównie w ze względu na jego miejsce występowania i możliwość zakażenia, zarejestrowano także i takie, które kolonizują wirusy ale i atakują wyższe organizmy, nie tylko pierwotniaki, ale także wiciowce, glony i mikroalgi. Te formy „życia”, wydaje się, że stwarzają nadzieję, iż w niedługim czasie mogą stać się nowymi elementami i formami, wśród opisanych obecnie trzech domen życia.

## Piśmiennictwo

- Boyer M., Raoult D. i wsp.: Gigant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 21848–21853 (2009)
- Byrne D., Grzela R., Lartigue A., Audic S.P., Chenivesse S., Encinas S.P., Claverie J.M., Abergel C.: The polyadenylation site of Mimivirus transcripts obeys a stringent „hairpin rule”. *Genome Res.* **19**, 1233–1242 (2009)
- Claverie J.M., Abergel C.: Mimivirus and its Virophage. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 49–66 (2009)
- Claverie J.M., Abergel C.: Mimivirus: the emerging paradox of quasi-autonomous viruses. *Trends Genet.* **26**, 431–437 (2010)
- 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. Invert. Pathol.* **101**, 172–180 (2009)
- Claverie J.M., Ogata H.: How to Infect a Mimivirus. *Science*, **321**, 1305–1306 (2008)
- Culley A.: Virophages to viromes: a report from the frontier of viral oceanography. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 52–57 (2011)
- Desnues C., Boyer M., Raoult D.: Sputnik, a virophage infecting the viral domain of life. *Adv. Virus. Res.* **82**, 63–89 (2012)
- Desnues C., Raoult D. i wsp.: Provirophages and transpovirons as the diverse mobilome of giant viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 18078–18083 (2012)
- Desnues C., Raoult D.: Inside the lifestyle of the virophage. *Inter-virology*, **53**, 293–303 (2010)
- Desnues C., Raoult D.: Virophages question the existence of satellites. *Nature Rev. Microb.* **10**, 234 (2012)
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A.: *Virus Taxonomy: VIII<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, London, 2005
- Fischer M.G., Allen M.J., Wilson W.H., Suttle C.A.: Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 19508–19513 (2010)
- Fischer M.G., Suttle C.A.: A virophage at the origin of large DNA transposons. *Science*, **332**, 231–234 (2011)
- Fischer M.G.: Genetic and ultrastructural characterization of Cafeteria roenbergensis virus and its virophage Mavirus. *PhD thesis, Univ. Brit. Columbia*, Vancouver, 2011
- Fischer M.G.: Sputnik and Mavirus: more than just satellite virus. *Nat. Rev. Microb.* **10**, 88 (2012)
- Fischer M.G.: Wenn viren viren infizieren. *BIOspektrum*, **19**, 619–621 (2013)
- Iyer L.M., Balaji S., Koonin E.V., Aravind L.: Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res.* **117**, 156–184 (2006)
- Kurpovic M., Cvirkaite-Krupovic V.: Virophages or satellite viruses? *Nature*, **9**, 762–763 (2011)
- Kuznetsov Y.G., Xiao C., Sun S., Raoult D., Rossmann M., McPherson A.: Atomic force microscopy investigation of the giant mimivirus. *Virology*, **1**, 127–137 (2010)
- La Scola B., Raoult D. i wsp.: The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature*, **455**, 100–105 (2008)
- La Scola B., Campocasso A., N’dong R., Fournous G., Barrassi L., Flaudrops C., Raoult D.: Tentative characterization of new environmental giant viruses by MALDI-TOF mass spectrometry. *Intervirology*, **53**, 344–353 (2010)
- La Scola B., Raoult D.: The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature*, **455**, 100–104 (2008)
- Nature Website, <http://www.nature.com/news/2011/110328/full/news.2011.188.html> (17 Marca 2014 roku)
- O’Day D.H., Suhre K., Myre M.A., Chatterjee-Chakraborty M., Chavez S.E.: Isolation, characterization, and bioinformatic analysis of calmodulin-binding protein cmbB reveals a novel tandem IP22 repeat common to many *Dictyostelium* and Mimivirus proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**, 879–888 (2006)
- Pearson H.: ‘Virophage’ suggests viruses are alive. *Nature*, **454**, 677 (2007)
- Raoult D., Audic S., Robert C., Abergel C., Renesto P., Ogata H., La Scola B., Suzan M., Claverie J.M.: The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science*, **306**, 1344–1350 (2004)
- Ruiz-Sanez J., Rodas J.D.: Viruses, virophages, and their living nature. *Acta Virol.* **54**, 85–90 (2010)
- Tokarz-Deptuła B., Śliwa-Dominiak J., Kubiś M., Deptuła W.: Mimiwirus APMV, Mamawirus oraz jego wirofag – budowa i charakterystyka. *Post. Mikrobiol.* **52**, 105–109 (2013)
- ViralZone Website, [http://expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/670.html](http://expasy.org/viralzone/all_by_species/670.html) (17 Marca 2014 roku)
- Xiao C., Kuznetsov Y.G., Sun S., Hafenstein S.L., Kostyuchenko V.A., Chipman P.R., Suzan-Monti M., Raoult D., McPherson A., Rossmann M.G.: Structural studies of the giant mimivirus. *PLoS Biol.* **7**, 92 (2009)
- Yau S., Cavicchioli R.: Microbial communities in Antarctic lakes: entirely new perspectives from metagenomics and metaproteomics. *Microbiol. Austr.* **11**, 157–159 (2011)
- Yau S., Cavicchioli R. i wsp.: Virophage control of Antarctic algal host-virus dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **108**, 6163–6168 (2011)
- Zauberman N., Mutsafi Y., Halevy D.B., Shimoni E., Klein E., Xiao C., Sun S., Minsky A.: Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba* polyphaga mimivirus. *PLoS Biol.* **6**, 114 (2008)
- Zhou J., Zhang W., Yan S., Xiao J., Li B., Pan Y., Wang Y.: Diversity of virophages in metagenomic data sets. *J. Virol.* **87**, 4225–4236 (2013)