

Interakcije divovskih virusa i ameboidnih praživotinja

Blaznik, Mihaela Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:034660>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mihaela Kristina Blaznik

**Interakcije divovskih virusa i ameboidnih
praživotinja**

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Mihaela Kristina Blaznik

**Interactions of giant viruses and ameboid
protozoa**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu Preddiplomskog sveučilišnog studija Biologije na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Renate Matoničkin Kepčija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Interakcije divovskih virusa i ameboidnih praživotinja

Mihaela Kristina Blaznik

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Viralna infekcija slobodno-živićih ameba prvi je put zabilježena 2003. godine, a virus u pitanju je zbog veličine čestice, ali i genoma, proglašen prvim divovskim virusom. Nakon tog otkrića brojni su divovski virusi opisani u slobodno-živićim amebama, ali i u drugim skupinama eukariota. Divovski virusi djeluju tako da mijenjaju unutarstanični okoliš ameboidnih protozoa, što na razne načine utječe na replikaciju virusa te širenje virusa u nove domaćine. Ovaj rad opisuje značajke interakcija između stanica ameboidnih protozoa i čestica divovskih virusa koje se događaju prilikom infekcije. Razumijevanje mehanizama tih interakcija moglo bi razjasniti molekularne procese zaslužne za pravilno funkcioniranje replikacijskog ciklusa u patogenih virusa srodnih divovskim virusima.

Ključne riječi: protozoa, *Mimiviridae*, *Marseilleviridae*, interakcije domaćin-patogen, virofag

26 stranica, 4 slike, 0 tablica, 60 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Renata Matonićkin Kepčija

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Interactions of giant viruses and ameboid protozoa

Mihaela Kristina Blaznik

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Viral infection of free-living ameboid protozoa was observed for the first time in 2003. The virus in question was significantly bigger than other viruses, both particle and genome-wise, and therefore appointed the first giant virus. Since then, numerous giant viruses have been discovered in free-living amoebae, but also in other groups of eukaryotes. Giant viruses modulate the intracellular environment of amoebae, which works in different ways in regard to viral replication and dispersion to new hosts. This paper describes the characteristics of interactions between the amoeba cell and the giant virus particle during viral infection. Understanding of mechanisms included in these interactions could explain the molecular processes behind replication cycles in pathogenic viruses closely related to giant viruses.

Keywords: protozoa, *Mimiviridae*, *Marseilleviridae*, host-pathogen interactions, virophage

26 pages, 4 figures, 0 tables, 60 references, original in: Croatian
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Mimiviridae	5
2.1. <i>Acanthamoeba polyphaga</i> mimivirus	5
2.2. Tupanvirus	7
3. Marseilleviridae	11
3.1. Marseillevirus marseillevirus.....	11
4. Asfarviridae	13
5. Virofagi	15
6. Zaključak	18
7. Literatura	19
8. Životopis	26

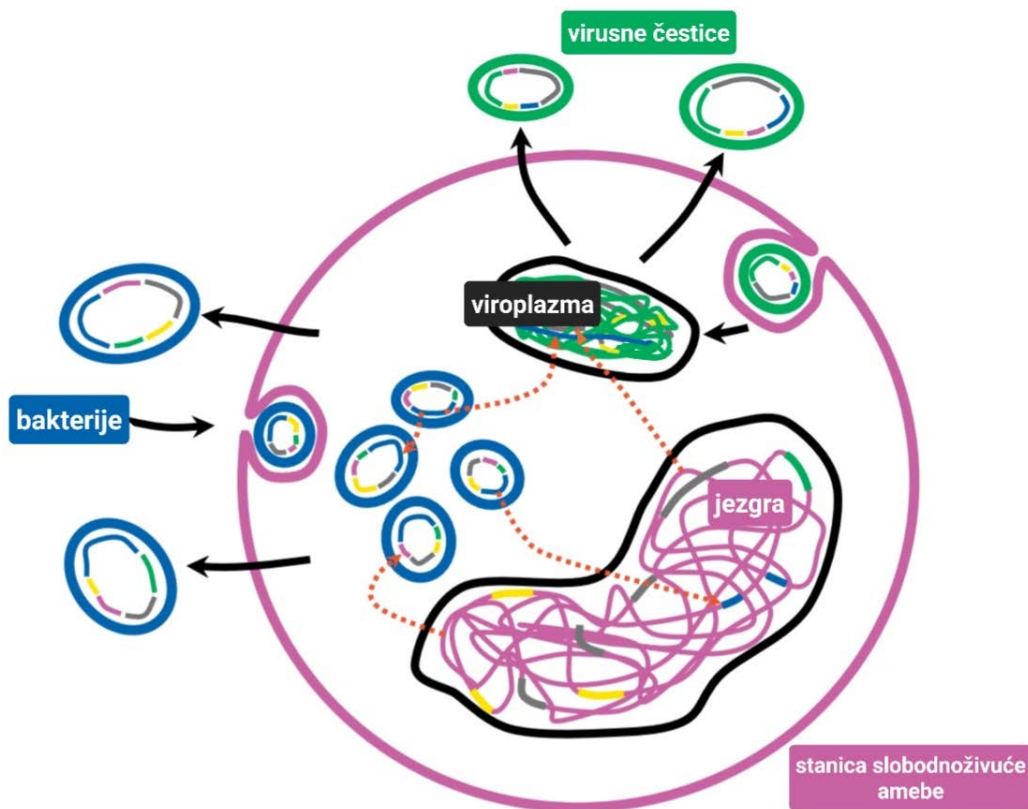
1. Uvod

Ameboidni protozoa jednostanični su fagotrofi koji se hrane uglavnom drugim mikroorganizmima, detritusom, manjim beskralješnjacima, ali je dio patogen za mnogostaničare. Žive u raznim ekosustavima, kao i unutar drugih živih bića. Usprkos sličnoj morfologiji tzv. golih oblika, danas se zna da su ameboidni protozoa filogenetski udaljeni te su svrstani u različite skupine. Adl i sur. (2019) ih svrstavaju u nekoliko kladova unutar Amoebozoa, Opisthokonta i zasebne super-skupine CRuMSs (Collodictyonid + Rigifilida + Mantamonas). Mogu se smatrati divljim makrofagima budući da će fagocitirati sve čestice čija veličina prelazi 0.5 μm , uključujući i perlice od lateksa (Boyer i sur. 2009). Da bi fagocitirale neku česticu, na površini čestice se ne trebaju nalaziti posebni markeri te tako često "progutaju" i neke organizme, poput gljiva, bakterija i divovskih virusa, koji potom žive unutar stanice amebe (Raoult i Boyer 2010). Iz tog razloga istovremeno mogu biti inficirane većim brojem različitih mikroorganizama. Kako žive skupa, mikroorganizmi unutar amebe imaju puno prilika za razmjenu genetske informacije (Moliner i sur. 2009). Velikim brojem istraživanja dokazano je da postoji lateralni prijenos gena između amebe i mikroorganizama koji žive u njoj, kao i između amebe i njenih domaćina te virusa i virofaga. Na taj se način unutar stanice amebe, uslijed selekcijskog pritiska unutarstaničnog okoliša, stvaraju i nove vrste miješanog repertoara gena, što im pomaže u slučaju promijene okolišnih uvjeta i u adaptaciji na novu ekološku nišu (Raoult i Boyer 2010). Iz tog je razloga stanicu amebe korisno zamisliti kao *meltingpot* genetskih informacija (**Slika 1**). To što mogu preživjeti i razmnožavati se unutar amebe, olakšava mikroorganizmima da to rade i u ostalim fagocitnim stanicama, kao što su primjerice ljudski makrofagi.

Genome ameboidnih protozoa karakterizira veliki broj gena dobivenih lateralnim prijenosom, a rekorderi su u veličini genoma među svim eukariotima. *Amoeba dubia* ima najveći genom koji je do sada otkriven, a sadrži 670 000 Mb, dok je genom ljudi, primjerice, preko 200 puta manji, s otprilike 2 900 Mb (Raoult i Boyer 2010).

Godine 2003. u vrste *Achantamoeba polyphaga* po prvi put je otkriven divovski virus, mimivirus (La Scola i sur. 2003). Među glavnim domaćinima svakako mu je rod *Achantamoeba*, iz kojega je veliki broj divovskih virusa po prvi put i izoliran. U ljudi je taj rod otprije poznat kao

patogen, ali ima i veliku ulogu u funkcioniranju raznih ekosustava, budući da predstavnici ovog roda djeluju i kao predatori i kao domaćini za razne mikroorganizme (Oliveira i sur. 2019a). Divovski su virusi, odnosno mimivirus kao njihov prvi otkriveni predstavnik, prvotno bili klasificirani kao gram-pozitivne bakterije, a tek kad je utvrđen nedostatak ribosomalne DNA u izolatima, utvrđeno je da se zapravo radi o virusima (La Scola i sur. 2003). Upravo iz tog razloga, ova je vrsta imenovana mimivirusom, ime nastalo iz akronima sintagme na engleskom - *mimicking microbe*. Sama virusna čestica može biti veća i od mnogih bakterija, budući da veličina kapside doseže i do 700nm, što je unutar rezolucije svjetlosnog mikroskopa (Oliveira i sur. 2019a).



Slika 1. Shematski prikaz stanice slobodnoživuće amebe koja razmjenjuje genski materijal s mikroorganizmima koji u njoj borave te tako djeluje kao genski *melting pot*. Genski materijal svakog organizma označen je drugom bojom: bakterijski plavo, virusni zeleno, eukariotski ružičasto, a žuto je označen genski materijal arhejskog porijekla. Crvene strelice pokazuju smjer lateralnog prijenosa gena između mikroorganizama i stanice amebe.(Prerađeno iz Raoult i Boyer 2010)

Do danas su opisane dvije porodice divovskih virusa koji inficiraju amebe. To su *Mimiviridae* i *Marseilleviridae*. Svrstane su u skupinu nukleocitoplazmatskih divovskih DNA virusa (engl. *nucleocytoplasmic large DNA viruses*, NCLDV) (Boughalmi i sur. 2013; Dornas i sur. 2014; Andrade i sur. 2015). To je šarolika skupina koju odlikuje veliki broj gena, a posebno onih nikad prije opisanih ni u jednoj drugoj skupini virusa. Genomi divovskih virusa dosežu veličine i preko 2.5 Mb. Kako su okolišni čimbenici evolucijski utjecali na to da su genomi ovih virusa dosegli tako divovsku veličinu, još nije u potpunosti definirano, ali je sigurno da tolika količina genske informacije, nastala duplikacijom gena, delecijama, lateralnim prijenosom gena te *de novo* kodirajućim genima, povlači i iznimnu razinu genomske plastičnosti (Boughalmi i sur. 2013; Dornas i sur. 2014; Andrade i sur. 2015). Obje skupine, *Mimiviridae* i *Marseilleviridae*, sadrže tek devet gena karakterističnih za sve NCLDV viruse te 180 gena koje dijele s barem dvije porodice unutar NCLDV (Yutin i sur. 2009; Yutin i Koonin 2012). Nekima od predstavnika veliki dio gena je relativno nov, odnosno vrlo nedavno prenesen iz drugih organizama. Iako dio tih gena potječe iz genoma eukariotskih domaćina, najveći je dio homologan bakterijskim genima (Moreira i Brochier-Armanet 2008). U njihovim vrlo kompleksnim genomima postoji mnogo gena koji prije nisu bili prepoznati kao atributi virusa, kao što su geni za proteine uključene u popravke DNA, sklapanje proteina, sintezu tRNA i translaciju (Raoult i sur. 2004). Također, uočeno je da neki geni kodiraju i za proteine vezane uz spajanje i obradu mRNA (Desnues i sur. 2012). Zbog veličine kapside i kompleksnosti genoma bogatog genima uobičajenih za eukariote, predloženo je da se virusi uključe u drvo života kao organizmi koji sadrže kodirajuće gene za kapsidu, za razliku od eukariota, prokariota i arheja, koji sadrže gene koji kodiraju za ribosome (Raoult i Forterre 2008).

Neke vrste interakcija koje se odvijaju između stanica ameboidnih protozoa i divovskih virusa nisu nikad prije zabilježene. U suštini, divovski virusi mijenjaju unutarstanični okoliš ameba, što na razne načine utječe na replikaciju virusa te širenje virusa u nove domaćine. Svi ameboidni protozoa hranjive tvari unose procesom fagocitoze, a upravo je taj proces vrlo važan za većinu divovskih virusa, budući da je to prvi korak u njihovim replikacijskim ciklusima (Ghigo i sur. 2008). Ključni koraci uvijek su isti (Colson i sur. 2017). Svi poznati divovski virusi, po ulasku u stanicu procesom fagocitoze, otpuštaju svoju DNA u citosol (Ghigo i sur. 2008). Replikacija virusa događa se u posebnim odjeljcima nastalim iz endoplazmatskog retikuluma koji se nalaze u citosolu i nazivaju se viroplazme (engl. *viral factories*) (Xiao i sur. 2009; Mutsafi i sur. 2010; Kuznetsov i sur. 2013). U ovim staničnim inkluzijama virusi svoj genski materijal pakiraju u nove

virusne čestice (Diesend i sur. 2018). Nakon toga, virus prebiva u *de novo* fagosomu, a zatim se fagosomalna i viralna membrana spoje, što omogućava izlazak virusne jezgre, u kojoj se nalazi genska informacija u obliku proteina, mRNA te samog genoma i ispuštanje u citosol (Zauberman i sur. 2008; Mutsafi i sur. 2010). Replikacija viralnog genoma počinje čim se genski materijal nađe u citosolu i ekspresijom ranih gena formiraju se rane viroplazme (Suzan-Monti i sur. 2007; Mutsafi i sur. 2013; 2014). U kasnijim fazama infekcije, viroplazme se spajaju u velike komplekse u kojima se događa replikacija i sastavljanje kapside (Suzan-Monti i sur. 2007; Mutsafi i sur. 2014).

Još jedna skupina zaraznih čestica koja modificira interakcije između divovskih virusa i ameboidnih praživotinja su virofagi. To su čestice koje parazitiraju na viroplazmama porodice *Mimiviridae*. Virofagi su po prvi puta zabilježeni 2008. godine, a od tada je otkriveno da su zapravo vrlo brojni u okolišu te okupiraju iste niše kao i *Mimiviridae* i njihovi domaćini.

Rasprava ovog rada opisuje strukturne i funkcionalne specifičnosti predstavnika porodica *Mimiviridae* i *Marseilleviridae* te interakcije sa stanicama ameboidnih protozoa koje se događaju prilikom infekcije. Poseban je naglasak stavljen na virofage i interakcije između stanice domaćina, divovskih virusa i virofaga.

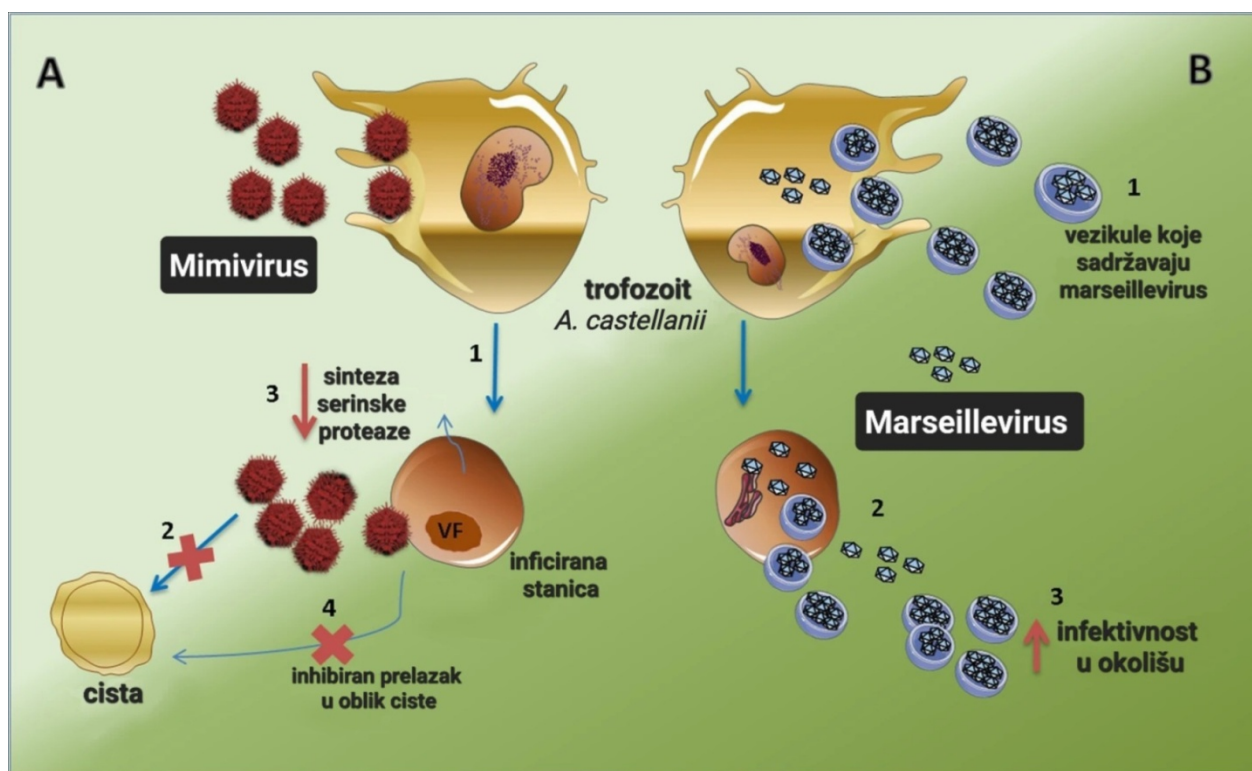
2. Mimiviridae

Prvi divovski virus, mimivirus, otkriven je 2003. godine i postao je prototip porodice *Mimiviridae*, kao i roda *Mimivirus* (La Scola i sur. 2003). Riječ je o virusu koji nosi naziv *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (APMV), a rod *Achantamoeba* je jedan od glavnih domaćina. Genomi nekih od predstavnika ove porodice sadrže mnogo gena dobivenih lateralnim prijenosom gena, paralognih gena i ORF gena (engl. *open reading frame genes*), odnosno gena koji kodiraju proteine još nepoznatih funkcija (Suhre 2005; Filée i sur.2007; Moreira i Brochier-Armanet 2008; Forterre 2010). Budući da ORF geni predstavljaju čak 50% genoma i kodiraju za oko 40% proteoma u nekih predstavnika *Mimiviridae*, mnogo je komponenata i njihovih funkcija, vezano uz replikaciju virusa, nepoznato (Renesto i sur. 2006). Kompleksnost genoma ovih virusa održala se da bi se mogli prilagoditi većem broju domaćina, sa specifičnim setom molekularnih alata za svakog od njih.

2.1. *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus

APMV je prvi otkriveni divovski virus. Među posebnostima ovog virusa je i veličina njegovog genoma kojeg čini čak 1.14 Mb, što ga čini većim od genoma nekih bakterija (Raoult i sur. 2004). Vrlo zanimljiva prilagodba ovog virusa, koja mu pomaže u opstanku, je modulacija životnog ciklusa stanice amebe. Fenomen u pitanju otprije je poznat i naziva se *Cheshire cat*. Prvi je put opisan u jednostaničnog eukariota *Emilianahuxleyi* koji pripada u kokolitoforide i *Emiliana huxleyi* virusa i predstavlja razlike u uspješnosti infekcije domaćina virusom u ovisnosti o tome je li stanica u haploidnoj ili diploidnoj fazi. Godine 2016. Silva i sur. uočili su da postoji dosta sličnosti između *Cheshire cat* fenomena u vrste *E. huxleyi* i infekcije u roda *Acanthamoeba* mimivirusom. Eksperimentalno je utvrđeno da virus može zaraziti samo diploidne stanice, dok su haploidne otporne na infekciju, a posebno je zanimljivo da diploidne stanice koje su bile izložene virusu, na još nepoznat način, potiču susjedne stanice na tranziciju u haploidnu fazu (Frada i sur. 2008). U roda *Acanthamoeba* *Cheshire cat* fenomen odražava se u različitoj uspješnosti infekcije

u svakom od dva životna oblika – trofozoit i cista. APMV ne može inficirati ciste, ali može inficirati trofozoite uz jasno vidljiv citopatogeni učinak (Borattoi sur. 2015; Silva i sur. 2016). Iz tog je razloga, prilikom virusne infekcije unutar populacije ameba, favorizirani životni oblik jedinki upravo cista.



Slika 2. Interakcije stanice domaćina *Acanthamoeba castellanii* prilikom zaraze mimivirusom i marseillevirusom. **A** Mimivirus inficira trofozoit i replicira se unutar stanice (1), ali ne može inficirati cistu (2). Prilikom infekcije, ekspresija gena za serinsku proteazu je inhibirana (3), kao i formiranje ciste (4). **B** Vezikule pune marseillevirusa fagocitozom ulaze u stanicu (1), u kojoj se događa replikacija virusa (2). Pakiranje virusnih čestica u vezikule povećava razinu infektivnosti koja se može postići u okolišu (3).

(Prerađeno iz Oliveira i sur. 2019a)

U procesu nastanka cisti stanica prolazi kroz niz metaboličkih promjena koje uzrokuju čimbenici poput osmotskog stresa, gladi i nepovoljne temperature, a u samom formiranju cisti važne uloge imaju elementi citoskeleta i serinske proteaze (Moon i sur. 2008). Serinska proteaza

koja je vezana uz formaciju cisti u *Acanthamoeba* naziva se EMSP (engl. *encystment-mediating subtilisin-like serine proteinase*). Dosadašnja istraživanja pokazala su da se prilikom infekcije mimivirusom u vrste *Acanthamoebacastellanii* snižavaju unutarstanične razine mRNA i proteina koji tvore EMSP. Kad su zaražene stanice bile inokulirane u otopinu koja inače u ameba potiče nastanak cisti, dogodila se inhibicija ekspresije gena koji potiču rad EMSP (Boratto i sur. 2015). Mehanizam interakcije u pitanju još nije poznat, ali je jasno da inhibicija gena za serinsku proteazu onemogućava stvaranje ciste, za što je zaslužno djelovanje virusa (**Slika 2**). Smatra se da je gen R700, inače prisutan u genomu APMV-a, a koji kodira za inhibitor serinske proteaze, jedan od gena uključenih u taj proces (Silva i sur. 2016).

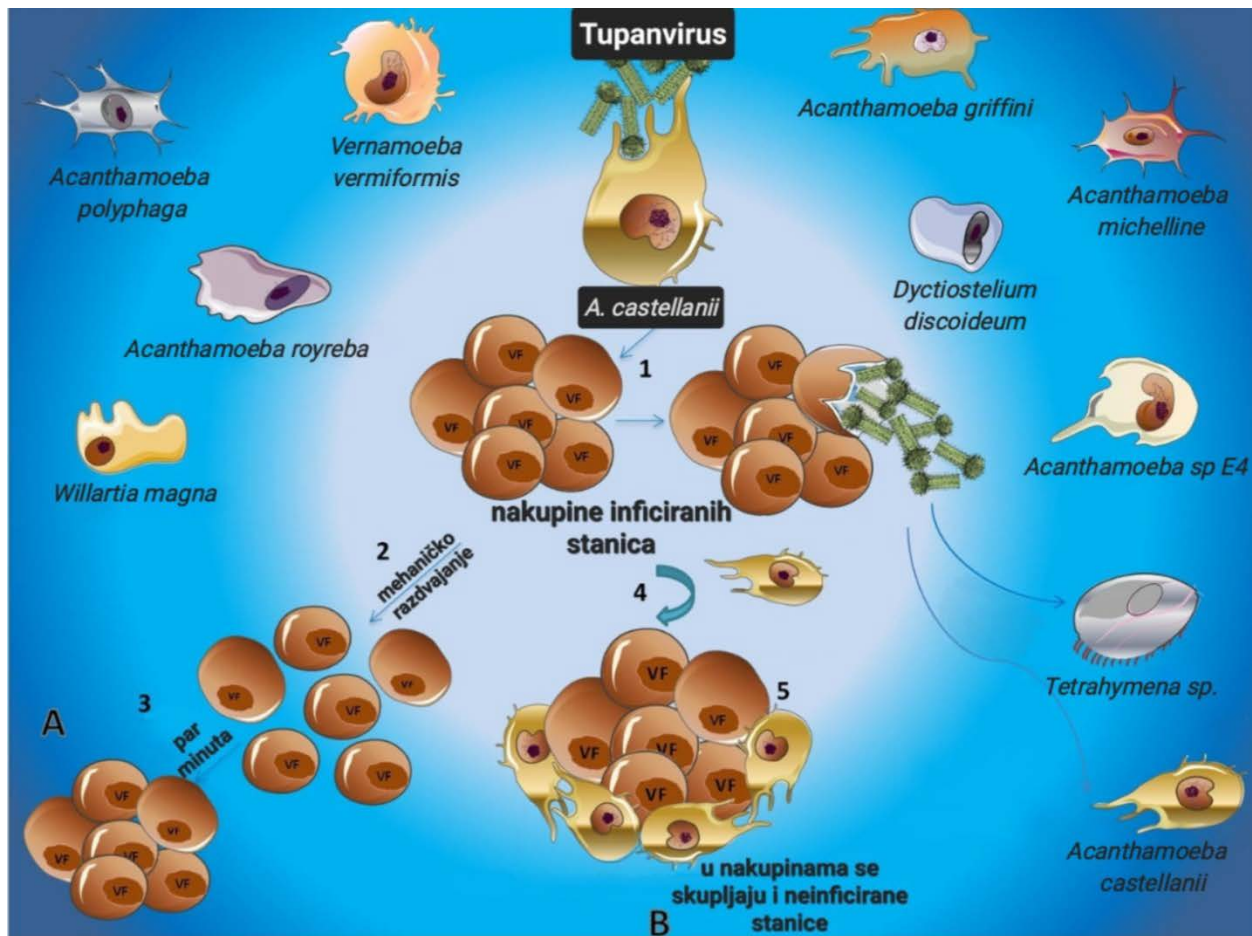
Favorizacija ciste, kao životnog oblika stanice dok prijete zaraza, odražava odgovor populacije *Acanthamoeba* na borbu protiv infekcije mimivirusom. Još nije razjašnjeno kako funkcionira komunikacija i signalni sustav unutar populacije ameba, stoga je to područje vrlo plodno za buduća istraživanja. S druge strane, zadivljujuća je prilagodba samog virusa da modulira životni ciklus stanica te tako sebi osigura opstanak i daljnju replikaciju sprječavanjem nastanka cisti.

2.2. Tupanvirus

Tupanvirus je prvi put otkriven u izolatima iz jezerskih i dubokooceanskih uzoraka, na dubini od čak 3000 m iz Brazila (Oliveira i sur. 2019a). Veličina čestice kreće se između 1.2 i 2.5 μm , a promjer kapside je oko 450 nm. Površina kapside prekrivena je fibrilima koji su zvjezdasto rascijepani na vrhovima. Zanimljiva morfološka značajka tupanvirusa je veliki rep koji se pruža u nastavku kapside, veličine oko 550 nm. Genom tupanvirusa sastoji se od linearne dsDNA, veličine i do 1.5Mb, što ga čini jednim od najvećih genoma u mimivirusa. DNA tupanvirusa čini preko 1250 gena, a među neočekivanim su geni vezani uz translaciju, uključujući i gene za 20 aminoacil tRNA sintetaza i 70 tRNA, uz druge čimbenike vezane uz translaciju, modifikaciju ribosomalnih proteina te maturaciju tRNA i mRNA (Abrahão i sur. 2018). Za razliku od drugih divovskih virusa, koji su najčešće ograničeni na samo jedan rod ameba, tupanvirus ima mogućnost inficirati širok dijapazon domaćina.

Otkriveno je da tupanvirus ima mogućnost inhibicije rada ribosoma svojih domaćina. Nakon što su dospjele u citoplazmu stanice, virusne čestice potiču stanični odgovor na citotoksičnost što uključuje gubitak pokretljivosti, povećanu stopu vakuolizacije i izlučivanje izvanstaničnih vezikula te smanjenu količinu fagocitoze i gašenje ribosoma (Oliveira i sur. 2019b). Kad su inficirane stanice bile podvrgnute elektroforezi, na gelu uopće nije bilo dokaza o postojanju ribosomalnih podjedinica u tim stanicama. Predloženo je objašnjenje da je došlo do autofagije, što je proces koji se odvija kad ameba gladuje, a ujedno i mehanizam programirane stanične smrti. Budući da je nedostajalo uobičajenih staničnih karakteristika koje se javljaju pri autofagiji, kao što su formacija dvostrukih membrana, zakiseljavanje autofagosoma te aktivacija gena povezanih s autofagijom, ta ideja je odbačena (Kraft i sur. 2008). Alternativno objašnjenje uključivalo je tupanvirus kao uzrok potpune degradacije ribosoma. Čestica tupanvirusa unutar stanice amebe prenosi nepoznati čimbenik koji uzrokuje degradaciju ribosoma, a u daljnjem promatranju, pokazalo se da taj čimbenik, iako u manjoj mjeri, potiče i degradaciju jezgri (i jezgrica) domaćina (Abrahão i sur. 2018). Jezgri su uključene u biogenezu ribosoma pa, ako su i one nefunkcionalne, stanica amebe ne može proizvoditi nove ribosome.

Kod ameba zaraženih tupanvirusom uočava se vrlo zanimljiva pojava. Riječ je o jednom citopatogenom učinku kojeg odražava stvaranju "nakupina" (engl. *bunches*) zaraženih stanica. Ova vrsta interakcije između virusa i amebe opisana je na vrsti *A. castellanii*. Slično kao kod ostalih divovskih virusa, na početku zaraze, stanica amebe se zaokružuje. Ono što je različito u odnosu na citopatogene učinke zaraze drugim divovskim virusima je stvaranje nakupina zaraženih stanica, koje vremenom postaju sve veće. Zanimljivo je da nakupine ne čine samo zaražene stanice, već i one koje su zdrave ili u drugim stadijima zaraze. Mlađe nakupine vrlo se lako mogu mehanički rastaviti, ali već par minuta nakon toga stanice se spontano iznova spoje. Nasuprot brzom reformaciji mlađih nakupina, starije se nakupine često ne uspiju iznova formirati zato što je većina tih stanica već mrtva (Oliveira i sur. 2019b).



Slika 3. Interakcije stanice *A. castellanii* tupanvirusa prilikom zaraze. **A** Zaraza tupanvirusom potiče stvaranje nakupina zaraženih stanica (1), koje se mogu mehanički razdvojiti (2), ali se već par minuta nakon toga spontano nanovo spoje (3). **B** Nezaražena stanica dolazi u kontakt sa nakupinom zaraženih stanica (4) i ostaje zarobljena u nakupini (5). Prikazane su i neke druge vrste slobodnoživućih ameba i svojta trepetljikaša kako bi se naglasio širok spektar domaćina koje tupanvirus može zaraziti. (Prerađeno iz Oliveira i sur. 2019a)

Istraživanjem biološke važnosti formacije nakupina u replikacijskom ciklusu tupanvirusa otkriveno je da tupanvirus može ekspimirati gen koji kodira za protein koji veže manozu (engl. *mannose-binding protein*; MBP), koji se pokazao kao vrlo važan čimbenik u formaciji nakupina (Oliveira i sur. 2019b). Taj je protein, u ovom kontekstu, otprije povezan s inhibicijom adhezije vrste *A. castellanii* na razne površine (Garate i sur. 2005). Istraživanja su pokazala da se u ranijim fazama infekcije tupanvirusom ekspresija gena koji kodira za MBP uvelike povećala, što znači da

se ova ekspresija MBP-a događa prije formiranja nakupina. S druge strane, slobodna manoza negativno utječe na ekspresiju gena za MBP i inhibira formaciju nakupina. Ovi su rezultati dokazali da formiranje nakupina ovisi o viralnoj i staničnoj ekspresiji gena za receptor za manozu. Inhibicija ekspresije gena za MBP smanjuje vjerojatnost za interakcijom među amebama, budući da MBP inhibira međusobnu adheziju stanica. To je za populaciju ameba vrlo važno, jer sprječava zaražene stanice u prianjanju na zdrave stanice koje bi zaglavile unutar zaraženih nakupina (Oliveira i sur. 2019b). Ipak, iz perspektive virusa, stvaranje nakupina zaraženih stanica povećava virusu šanse za daljnju replikaciju jer olakšava kontakt s nezaraženim stanicama (**Slika 3**). Svakako, treba uzeti u obzir da se ove interakcije događaju u vodenom staništu, tako da je formacija nakupina neobično bitna prilagodba na takav okoliš. Može se reći da se stanice zaražene tupanvirusom ponašaju kao "zombiji" jer se prihvaćaju za zdrave stanice i olakšavaju daljnju infekciju nezaraženih stanica.

3. Marseilleviridae

Marseillevirusi su druga otkrivena skupina divovskih virusa. Prvi je marseillevirus, nazvan Marseillevirus marseillevirus (MsV), izoliran iz vrste *A. castellanii* iz uzoraka vode uzetih iz rashladnog tornja u Parizu. Nakon tog otkrića, još ih je mnogo opisano u izolatima iz Francuske, Tunisa, Senegala, Australije, Japana, Malezije, Indije i Brazila (Boyer i sur. 2009). Genom MsV sastoji se od otprilike 400kb i za veliki dio gena se pretpostavlja da potječu iz genoma domaćina i njihovih parazita ili simbionata (Oliveira i sur. 2019a). To je još jedan slučaj koji potvrđuje da je stanica amebe zapravo *melting pot* genske informacije pa je tako moguć nastanak samih divovskih virusa, šarolikih i kompleksnih genoma.

3.1. Marseillevirus marseillevirus

Već je ranije naglašeno da svi poznati divovski virusi u stanicu ulaze fagocitozom i otpuštaju svoju DNA u citosol (Ghigo i sur. 2008). Da bi proces fagocitaze bio pokrenut, čestice moraju biti veličine od preko 500 nm (Arantes i sur. 2016). Marseillevirus marseillevirus (MsV) odlikuje ikosaedralna kapsida promjera od 190 do 250nm (Colson i sur. 2017). Na površini kapside nalaze se površinska vlakna od 12 nm (Boyer i sur. 2009). Iako veličina čestice MsV ne doseže potrebnih 500 nm veličine koji su okidač za fagocitozu, virus i dalje provodi uspješnu replikaciju unutar stanice domaćina što znači da mora postojati neki drugi mehanizam ulaska virusa u stanicu. Proučavanjem replikacijskog ciklusa MsV otkriveno je da marseillevirus može proizvesti divovske vezikule veličine od 300 do 1 000 nm, koje sadrže i preko 1 000 virusnih čestica. Vezikule se razlikuju i po broju membrana koje ih obavijaju. Otkriveno je da membrane vezikula potječu od endoplazmatskog retikuluma, a unutarnje membrane virusa od amebalnog endosoma (Arantes i sur. 2016). Te su divovske vezikule zaslužne za ulazak virusa u replikacijski ciklus preko fagocitoze (**Slika 2**). Ovaj mehanizam ulaska virusne čestice u stanicu domaćina je lukava prilagodba marseillevirusa koji koristi proces nužan za prehranu ameba, pa tako i njihov život, i okreće ga u svoju korist. Ovakva vrsta interakcije nije prije zapažena u DNA virusa. Proučavalo se kako broj membrana unutar vezikula utječe na ulazak MsV u stanicu. Iako nije u potpunosti

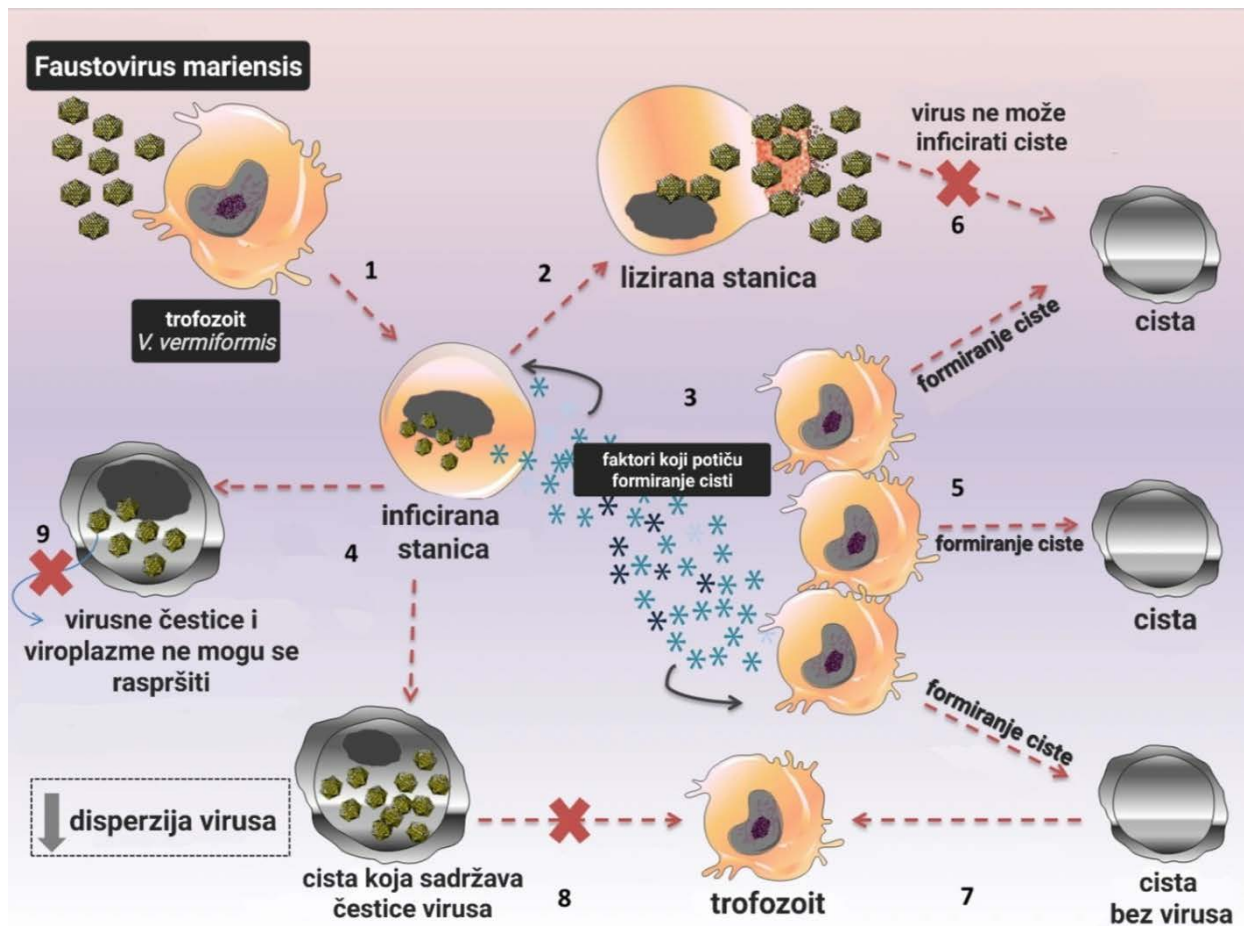
istraženo kako funkcionira proces razgradnje vezikula, pretpostavlja se da se vezikule izgrađene od samo jedne membrane spoje s membranom fagosoma i ispuštaju virusne čestice u citoplazmu amebe, dok se u slučaju vezikula s više membrana, vanjska spoji s fagosomom, a unutarnja se razgrađuje (Oliveira i sur. 2019a).

Zanimljivo je sagledati koja je adaptivna prednost formiranja vezikula kod MsV. Neki RNA virusi koriste vezikule kao sredstvo bijega od imunološkog sustava domaćina (Altan-Bonnet i Chen 2015). Budući da nije u potpunosti razjašnjena razina adaptivnosti imunološkog sustava u *A. castellanii*, ostaje otvorena mogućnost da i ova skupina virusa koristi vezikule na taj način. U prilog toj teoriji ide i činjenica daje porodica *Marseilleviridae* već korelirana s ljudima koje karakterizira vrlo složen imunološki sustav. MsV je vrlo čest u okolišnim uzorcima te je predloženo da stvaranje vezikula igra važnu ulogu u očuvanju virusa u okolišu zato što se inicijacija virusnog replikacijskog ciklusa događa puno brže u slučaju vezikula nego u slučaju zasebnih čestica. Također, virusne čestice unutar vezikula puno bolje podnose ekstremne temperature. Ciljana istraživanja razjasnit će evolucijske čimbenike i mehanizme koji su utjecali na razvoj ovog svojstva u ovog virusa.

4. Asfarviridae

Još jedna vrsta slobodno-živeće amebe poznata je kao domaćin za divovske viruse, a to je *Vernamoeba vermiformis* (Reteno i sur. 2015; Bajrai i sur. 2016; Abrahão i sur. 2018; Silva i sur. 2019). Od prije je poznato da ova vrsta živi i u ljudima, a promatranjem njenog životnog ciklusa otkriven je novi antiviralni mehanizam koji koristi u obrani od infekcije. Virus koji ju inficira je Faustovirus mariensis, izoliran iz uzoraka vode iz Brazila (Boratto i sur. 2015). Ikosaedralna kapsida mjeri otprilike 190nm, a genom faustovirusa čini kružna dsDNA od otprilike 460 kb (Borges i sur. 2019). Nije sigurno spada li faustovirus zapravo u porodicu *Asfarviridae* ili tvori novu, zasebnu porodicu, a do odgovora na to pitanje doći će se tek uz još istraživanja njegove morfologije, raspona domaćina, replikacijskog ciklusa i genoma (Reteno i sur. 2015).

Otkriveno je da faustovirus može potaknuti stvaranje *plaque-forming units* (čestica koje stvaraju plak) unutar stanica domaćina, a liza stanice je nužna za rasprostranjivanje virusa (Oliveira i sur. 2019a). Za razliku od zaraze drugim divovskim virusima, pri zarazi faustovirusom povišena je razina stvaranja cisti u domaćina, ali su i unutar citoplazme ciste pronađene čestice virusa. Virus uspije inficirati stanicu domaćina, ali ne uspije raspršiti nove virusne čestice jer su zarobljene unutar ciste. Već je spomenuto koliko su serinske proteinaze važne u procesu formiranja cisti, što u slučaju mimivirusa rezultira regulacijom djelovanja tih enzima da bi se spriječila formacija cisti u *A. castellanii*, budući da se virus može replicirati samo u trofozoitima, ali ne i u cistama (**Slika4**). S druge strane, Faustovirus mariensis nema mogućnost regulacije faktora koji potiču formiranje cisti, jer se, čak i za vrijeme zaraze, trofozoiti i dalje pretvaraju u ciste. U slučaju zaraze, cista je preferirani životni oblik amebe, a ovo je prvi zabilježeni primjer virusnih čestica i viroplazmi zarobljenih unutar ciste. Ipak, otkriveno je da stanice koje su u obliku ciste, a zaražene faustovirusom, nisu u mogućnosti promijeniti životni oblik, odnosno izaći iz oblika ciste, a za faustovirus to znači i nemogućnost daljnjeg rasprostranjivanja (Borges i sur. 2019).



Slika 4. Interakcije stanice *Vernamoeba vermiformis* faustovirusa prilikom zaraze. Faustovirus *mariensis* inficira trofozoite (1) i neke stanice mogu biti lizirane (2). Zaražene stanice ispuštaju faktore koji potiču formiranje cisti (3), tako da okolne stanice, bilo zaražene (4) ili nezaražene (5), prelaze u oblik ciste. Faustovirus *mariensis* ne može zaraziti ciste (6). Nezaražene stanice mogu izaći iz oblika ciste (7), ali zaražene stanice ne mogu (8) i tako virusne čestice i viroplazme ostaju zarobljene unutar ciste što smanjuje razinu daljnje disperzije virusa. (Prerađeno iz Oliveira i sur. 2019a)

5. Virofagi

Godine 2008. u vrste *A. polyphaga* otkrivena je čestica klasificirana kao virofag, a nazvana je Sputnik 1. Otkriven je kako inficira viroplazme mamavirusa, koji je bliski srodnik AMPV-u, a djeluje tako da prekida DNA replikaciju i biogenezu kapside (La Scola i sur. 2008). U tijeku su rasprave oko klasifikacije virofaga, ali veliki dio znanstvenika smatra da bi trebali biti klasificirani kao satelitni virusi (Krupovic i Cvirkaite-Krupovic 2011; Blanc i sur. 2015; Koonin i Krupovic 2017), koje karakterizira njihova ovisnost o virusu pomagaču. S druge strane, Sputnik se može proglasiti i virusom budući da kodira faktore uključene u virusnu replikaciju (La Scola i sur. 2008). Članovi skupine virofaga koji su do sad otkriveni podjeljeni su u dva roda, sputnikvirus i mavirus, a svrstani su u porodicu *Lavidaviridae*. Prvi od navedenih sadrži dvije vrste, *APMV-dependent sputnik virophage* i *APMV-dependent zamilon virophage*, a drugi samo jednu vrstu, koja parazitira na viroplazmama *Cafeteria roenbergensis* virusa (CroV) (Krupovic i sur. 2016). Na virofagima sputnik, zamilon i mavirus provedena su opsežna istraživanja o replikaciji virofaga.

Istraživanja na amebama inficiranim mimivirusima pokazala su da virofag sputnik može parazitirati na svim virusima koji spadaju u skupinu *Mimiviridae*, ali ne i onima iz skupine *Marseilleviridae* (Gaia i sur. 2013). Veličina čestice ovog virofaga mjeri oko 50nm, a genom se sastoji od 18 343 bp kružne dsDNA i sadrži 21 preklapajuću ORF (engl. *open reading frame*) regiju koja kodira za čimbenike u DNA replikaciji (La Scola i sur. 2008). Četiri od 21 ORF regije homologne su genima u APMV (La Scola i sur. 2008; Gaia i sur. 2013). Genom sputnika sadrži i gen za integrazu, što znači da ima alata koji mu omogućuju ugradnju u genom (La Scola i sur. 2008).

Virofag zamilon otkriven je zajedno s Mont1 mimivirusom u uzorcima tla iz Tunisa, a svrstan je u rod *Sputnikvirus* (Boughalmi i sur. 2013; Gaia i sur. 2014). Genom mu se sastoji od 17 276 bp i kodira za 20 gena, a, iako ima 76% sličnosti između genoma zamilona i sputnika, razlikuju se linije virusa na kojima mogu parazitirati (Gaia i sur. 2014). Otkriveno je da linije mimirusa, koje su otporne na infekciju zamilonom, u genomu imaju ponavljajuće sekvence genoma zamilona, a imenovane su MIMIVIRE, prema engleskoj kratici za *mimivirus virophage resistance elements*. MIMIVIRE regije kodiraju za nukleaze i helikaze, proteine bitne u degradaciji stranih nukleinskih

kiselina (Oliveira i sur. 2019a). To bi značilo da je taj lokus djeluje slično kao i CRISPR-Cas sistem (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) (Karginov i Hannon 2010). Pokazalo se da je, kad su MIMIVIRE geni utišani, zamilon ponovno sposoban zaraziti viroplazme. Gen R349 prisutan je u genomu mimivirusa i sadrži četiri ponavljanja homolognih sekvenci virofaga. Delecija ovog gena omogućava replikaciju zamilona, što znači da taj gen ima ključnu ulogu u MIMIVIRE obrambenom mehanizmu (Mougari i sur. 2019). To pokazuje da MIMIVIRE uistinu jest tip imunološkog sustava baziranog na nukleinskim kiselinama, odnosno obrambeni mehanizam protiv virofaga (Levasseur i sur. 2016).

Rod *Mavirus* predstavlja samo jedan član, Maverick-related virus (mavirus), koji parazitira na viroplazmama CroV koji inficira bakteriovornog morskog bičša *Cafeteria roenbergensis* (Fischer i sur. 2010; Fischer i Suttle 2011). Genom mu se sastoji od 19 063 bp i sadrži 20 ORF regija, uključujući i gen za retroviralnu integrazu (Fischer i Suttle 2011; Krupovic i sur. 2014; 2016). Na terminusima genoma mavirusa nalaze se duge ponavljajuće sekvence koje odražavaju povezanost s retroviralnim mehanizmima (Yutin i sur. 2013; Krupovic i sur. 2016). Provedeni su i eksperimenti promatranja integracije mavirusa u genom *C. roenbergensis* prilikom koinfekcije CroV i u mavirusa je pronađena promotorska sekvenca slična kasnoj promotorskoj sekvenci CroV (Fischer i Hackl 2016). Mavirus se replicira u viroplazmama CroV, ali otkriveno je da u *C. roenbergensis* može ući neovisno o CroV putem endocitoze te inhibirati proizvodnju novih čestica CroV, što pomaže preživljavanju jedinki vrste *C. roenbergensis* (Fischer i Suttle 2011). Otkriveno je da virofag ima sposobnost integrirati se u genom stanice. Genom mavirusa bioje integriran na različitim lokacijama genoma stanice i otkriveno je da je ekspresija gena mavirusa potaknuta infekcijom CroV, što dovodi do proizvodnje čestica mavirusa. Reaktivacija mavirusa nije dovela do sprječavanja replikacije CroV tako da su inficirane stanice i dalje uginule te tako otpustile mnoštvo čestica mavirusa i CroV. Zanimljivo je da je otpuštanje mavirusa smanjilo širenje CroV unutar populacije protista što je umanjilo infekciju i smrt okolnih stanica. Ovaj obrambeni mehanizam omogućava da smrću jedne zaražene stanice, ostale stanice u populaciji budu zaštićene od zaraze (Fischer i Hackl 2016). Moguće je da je i ovo primjer CRISPR-Cas imunskog sustava u kojemu je genom virofaga integriran u genom amebe koja ga koristi kao obranu od naknadnih napada divovskih virusa.

Istraživanja koja su tehnikama metagenomike, na osnovi matematičkog modela, pratila kretanja stope smrtnosti unutar populacija amebe, potvrdila su da infekcija virofagima utječe na

regulaciju populacije ameba, kao i drugih protista, u okolišu (Marie i Linn 2016). Mnogo novih virofaga otkriveno je analizom uzoraka vode metagenomskim pristupom, no njihovi domadari još nisu određeni (Krupovic i sur. 2016). Velika količina virofaga u okolišu, njihov životni ciklus koji uključuje parazitiranje na viroplazmama divovskih virusa i razmjene genetske informacije između stanice, virusa i virofaga stvaraju zamršenu mrežu interakcija. Virofagi djeluju kao moćno oružje protiv infekcije divovskim virusima i pomažu preživljavanju zaražene stanice prilikom infekcije. Daljnja istraživanja ovih interakcija mogla bi donijeti nova saznanja o mehanizmima djelovanja viroplazmi.

6. Zaključak

Stanice ameboidnih protozoa djeluju kao *melting pot* genske informacije. Brojni mikroorganizmi koji obitavaju unutar njihovih stanica imaju mnogo prilika za razmjenu genske informacije. Na taj način nastaju vrste mješovitih i uvelike promijenjenih genoma, zbog čega ameboidni protozoa zaslužuju priznanje kao vrlo važni suučesnici u kreiranju novih vrsta.

Većina je novih istraživanja, vezanih uz divovske viruse, orijentirana ka otkrivanju novih vrsta i njihovim principima evolucije. Veliki dio pitanja o mehanizmima i molekularnim interakcijama između divovskih virusa i domaćina te njihovim ekološkim ulogama još je bez odgovora. Ono što je sigurno je da se divovski virusi mogu pronaći u vrlo raznolikim okolišima, a sekvence nekih divovskih virusa pronađene su čak i u ljudskom mikrobiomu, no pozadina tog otkrića za sad još nije poznata. Širok dijapazon bića s kojima međusobno reagiraju zahvaljuju svojem vrlo složenom genomu koji nije ograničen samo na interakcije s amebama. Razumijevanje ovih i drugih interakcija moglo bi razjasniti molekularne procese koji su potrebni za pravilno funkcioniranje viroplazmi što bi bio velik korak u otkrivanju novih načina tretmana virusa koji tvore viroplazme.

Veliki problem u ovakvim istraživanjima je precizno otkrivanje mehanizama interakcija virusa i domaćina zbog toga što se neki od organizama ne mogu uzgojiti u kulturi. Tom problemu doskače metatranskriptomika koja je moćan alat za masovnu analizu uzoraka iz okoliša, pomoću čega je moguće uočiti organizme koji sudjeluju u interakcijama, a koje se ne može uzgojiti u kulturi.

Otkako je dokazano da živa bića ne slijede samo vertikalni prijenos gena, već da svaki od njih ima posebnu priču o tome kako je nastao, stablo života, kakvo je predložio Darwin, dovedeno je u pitanje (Raoult 2010). Prethodno prihvaćeno stablo života sastoji se od vrsta koje divergiraju, a geni se prenose s roditelja direktno na potomke (Darwin 1859). U ameba je pokazano da neke vrste nastaju i fuzijom vrsta različitog porijekla pa je predloženo je da se pojam "stablo života" zamijeni pojmom "rizom života", što bi odražavalo porijeklo živih bića kao zamršenu mrežu korijenja (Raoult 2009).

7. Literatura

- Abrahão, J., Silva, L., Silva, L.S., Khalil, J.Y.B., Rodrigues, R., Arantes, T., Assis, F., Boratto, P., Andrade, M., Kroon, E.G., Ribeiro, B., 2018. Tailed giant Tupanvirus possesses the most complete translational apparatus of the known virosphere. *Nature communications*, 9(1), p.749.
- Adl, S.M., Bass, D., Lane, C.E., Lukeš, J., Schoch, C.L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M.W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A.A., Hoppenrath, M., James, T.Y., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D.J.G., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., Mann, D.G., Massana, R., Mitchell, E.A.D., Morrow, C., Park, J.S., Pawlowski, J.W., Powell, M.J., Richter, D.J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F.W., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky, V., Zhang, Q., 2019- Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 66, pp. 4-119.
- Altan-Bonnet, N., Chen, Y.H., 2015. Intercellular transmission of viral populations with vesicles. *Journal of virology*, 89(24), pp.12242-12244.
- Andrade, K.R., Boratto, P.P., Rodrigues, F.P., Silva, L.C., Dornas, F.P., Pilotto, M.R., La Scola, B., Almeida, G.M., Kroon, E.G., Abrahão, J.S., 2015. Oysters as hot spots for mimivirus isolation. *Archives of virology*, 160, pp.477-482.
- Arantes, T.S., Rodrigues, R.A.L., dos Santos Silva, L.K., Oliveira, G.P., De Souza, H.L., Khalil, J.Y., de Oliveira, D.B., Torres, A.A., da Silva, L.L., Colson, P., Kroon, E.G., 2016. The large Marseillevirus explores different entry pathways by forming giant infectious vesicles. *Journal of virology*, 90(11), pp.5246-5255.
- Bajrai, L.H., Benamar, S., Azhar, E.I., Robert, C., Levasseur, A., Raoult, D., La Scola, B., 2016. Kaumoebavirus, a new virus that clusters with Faustoviruses and Asfarviridae. *Viruses*, 8(11), p.278.
- Blanc, G., Gallot-Lavallée, L., Maumus, F., 2015. Provirophages in the *Bigeloviella* genome bear testimony to past encounters with giant viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(38), pp.E5318-E5326.

Boratto, P., Albarnaz, J.D., Almeida, G.M.D.F., Botelho, L., Fontes, A.C.L., Costa, A.O., Santos, D.D.A., Bonjardim, C.A., La Scola, B., Kroon, E.G., Abrahão, J.S., 2015. *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus prevents amoebal encystment-mediating serine proteinase expression and circumvents cell encystment. *Journal of Virology*, 89(5), pp.2962-2965.

Borges, I., Rodrigues, R.A.L., Dornas, F.P., Almeida, G., Aquino, I., Bonjardim, C.A., Kroon, E.G., La Scola, B., Abrahão, J.S., 2019. Trapping the enemy: *Vermamoeba vermiformis* circumvents Faustovirus mariensis dissemination by enclosing viral progeny inside cysts. *Journal of Virology*, 93(14), pp.10-1128.

Boughalmi, M., Pagnier, I., Aherfi, S., Colson, P., Raoult, D., La Scola, B., 2013. First isolation of a giant virus from wild *Hirudo medicinalis* leech: Mimiviridae isolation in *Hirudo medicinalis*. *Viruses*, 5(12), pp.2920-2930.

Boyer, M., Yutin, N., Pagnier, I., Barrassi, L., Fournous, G., Espinosa, L., Robert, C., Azza, S., Sun, S., Rossmann, M.G., Suzan-Monti, M., 2009. Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), pp.21848-21853.

Colson, P., La Scola, B., Levasseur, A., Caetano-Anollés, G., Raoult, D., 2017. Mimivirus: leading the way in the discovery of giant viruses of amoebae. *Nature Reviews Microbiology*, 15(4), pp.243-254.

Darwin C. (1859): *On the Origin of Species*. New York, Harvard College Library.

Desnues, C., La Scola, B., Yutin, N., Fournous, G., Robert, C., Azza, S., Jardot, P., Monteil, S., Campocasso, A., Koonin, E.V., Raoult, D., 2012. Provirophages and transpovirons as the diverse mobilome of giant viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(44), pp.18078-18083.

Diesend, J., Kruse, J., Hagedorn, M., Hammann, C., 2018. Amoebae, giant viruses, and virophages make up a complex, multilayered threesome. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, p.527.

Dornas, F.P., Rodrigues, F.P., Boratto, P.V., Silva, L.C., Ferreira, P.C., Bonjardim, C.A., Trindade, G.S., Kroon, E.G., La Scola, B., Abrahao, J.S., 2014. Mimivirus circulation among wild and domestic mammals, Amazon Region, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 20(3), p.469.

Filée, J., Siguier, P., Chandler, M., 2007. I am what I eat and I eat what I am: acquisition of bacterial genes by giant viruses. *TRENDS in Genetics*, 23(1), pp.10-15.

Fischer, M.G., Allen, M.J., Wilson, W.H., Suttle, C.A., 2010. Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), pp.19508-19513.

Fischer, M.G., Hackl, T., 2016. Host genome integration and giant virus-induced reactivation of the virophage mavirus. *Nature*, 540(7632), pp.288-291.

Fischer, M.G., Suttle, C.A., 2011. A virophage at the origin of large DNA transposons. *Science*, 332(6026), pp.231-234.

Forterre, P., 2010. Giant viruses: conflicts in revisiting the virus concept. *Intervirology*, 53(5), pp.362-378.

Frada, M., Probert, I., Allen, M.J., Wilson, W.H., de Vargas, C., 2008. The “Cheshire Cat” escape strategy of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* in response to viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(41), pp.15944-15949.

Gaia, M., Benamar, S., Boughalmi, M., Pagnier, I., Croce, O., Colson, P., Raoult, D., La Scola, B., 2014. Zamilon, a novel virophage with Mimiviridae host specificity. *PLoS one*, 9(4), p.e94923.

Gaia, M., Pagnier, I., Campocasso, A., Fournous, G., Raoult, D., La Scola, B., 2013. Broad spectrum of mimiviridae virophage allows its isolation using a mimivirus reporter. *PLoS one*, 8(4), p.e61912.

Garate, M., Cubillos, I., Marchant, J., Panjwani, N., 2005. Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. *Infection and Immunity*, 73(9), pp.5775-5781.

Ghigo, E., Kartenbeck, J., Lien, P., Pelkmans, L., Capo, C., Mege, J.L., Raoult, D., 2008. Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. *PLoS pathogens*, 4(6), p.e1000087.

Karginov, F.V., Hannon, G.J., 2010. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Molecular cell*, 37(1), pp.7-19.

Koonin, E.V., Krupovic, M., 2017. Polintons, virophages and transpovirons: a tangled web linking viruses, transposons and immunity. *Current opinion in virology*, 25, pp.7-15.

Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., Peter, M., 2008. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nature cell biology*, 10(5), pp.602-610.

Krupovic, M., Bamford, D.H., Koonin, E.V., 2014. Conservation of major and minor jelly-roll capsid proteins in Polinton (Maverick) transposons suggests that they are bona fide viruses. *Biology direct*, 9(1), pp.1-7.

Krupovic, M., Cvirkaite-Krupovic, V., 2011. Virophages or satellite viruses?. *Nature Reviews Microbiology*, 9(11), pp.762-763.

Krupovic, M., Kuhn, J.H., Fischer, M.G., 2016. A classification system for virophages and satellite viruses. *Archives of virology*, 161(1), pp.233-247.

Kuznetsov, Y.G., Klose, T., Rossmann, M., McPherson, A., 2013. Morphogenesis of mimivirus and its viral factories: an atomic force microscopy study of infected cells. *Journal of virology*, 87(20), pp.11200-11213.

La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J. M., Raoult, D., 2003. A giant virus in amoebae. *Science*, 299(5615), 2033.

La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrassi, L., Fournous, G., Merchat, M., Suzan-Monti, M., Forterre, P., Koonin, E., Raoult, D., 2008. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature*, 455(7209), pp.100-104.

Levasseur, A., Bekliz, M., Chabrière, E., Pontarotti, P., La Scola, B., Raoult, D., 2016. MIMIVIRE is a defence system in mimivirus that confers resistance to virophage. *Nature*, 531(7593), pp.249-252.

Marie, V., Lin, J., 2016. Cannibalistic viruses in the aquatic environment: Role of virophages in manipulating microbial communities. *International journal of environmental science and technology*, 13, pp.2097-2104.

Moliner, C., Fournier, P.E., Raoult, D., 2010. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS microbiology reviews*, 34(3), pp.281-294.

Moon, E.K., Chung, D.I., Hong, Y.C., Kong, H.H., 2008. Characterization of a serine proteinase mediating encystation of *Acanthamoeba*. *Eukaryotic Cell*, 7(9), pp.1513-1517.

Moreira, D., Brochier-Armanet, C., 2008. Giant viruses, giant chimeras: the multiple evolutionary histories of Mimivirus genes. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), pp.1-10.

Mougari, S., Abrahao, J., Oliveira, G.P., Bou Khalil, J.Y., La Scola, B., 2019. Role of the R349 gene and its repeats in the MIMIVIRE defense system. *Frontiers in Microbiology*, 10, p.1147.

Mutsafi, Y., Fridmann-Sirkis, Y., Milrot, E., Hevroni, L., Minsky, A., 2014. Infection cycles of large DNA viruses: emerging themes and underlying questions. *Virology*, 466, pp.3-14.

Mutsafi, Y., Shimoni, E., Shimon, A., Minsky, A., 2013. Membrane assembly during the infection cycle of the giant Mimivirus. *PLoS pathogens*, 9(5), p.e1003367.

Mutsafi, Y., Zauberman, N., Sabanay, I., Minsky, A., 2010. Vaccinia-like cytoplasmic replication of the giant Mimivirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(13), pp.5978-5982.

Oliveira, G., La Scola, B., Abrahão, J., 2019a. Giant virus vs amoeba: fight for supremacy. *Virology journal*, 16, pp.1-12.

Oliveira, G., Silva, L., Leão, T., Mougari, S., da Fonseca, F.G., Kroon, E.G., La Scola, B., Abrahão, J.S., 2019b. Tupanvirus-infected amoebas are induced to aggregate with uninfected cells promoting viral dissemination. *Scientific reports*, 9(1), p.183.

Raoult, D., 2010. The post-Darwinist rhizome of life. *The Lancet*, 375(9709), pp.104-105.

Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., La Scola, B., Suzan, M., Claverie, J.M., 2004. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *science*, 306(5700), pp.1344-1350.

Raoult, D., Boyer, M., 2010. Amoebae as genitors and reservoirs of giant viruses. *Intervirology*, 53(5), pp.321-329.

Raoult, D., Forterre, P., 2008. Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), pp.315-319.

Renesto, P., Abergel, C., Decloquement, P., Moinier, D., Azza, S., Ogata, H., Fourquet, P., Gorvel, J.P., Claverie, J.M., 2006. Mimivirus giant particles incorporate a large fraction of anonymous and unique gene products. *Journal of Virology*, 80(23), pp.11678-11685.

Reteno, D.G., Benamar, S., Khalil, J.B., Andreani, J., Armstrong, N., Klose, T., Rossmann, M., Colson, P., Raoult, D., La Scola, B., 2015. Faustovirus, an asfarvirus-related new lineage of giant viruses infecting amoebae. *Journal of virology*, 89(13), pp.6585-6594.

dos Santos Silva, L.K., Boratto, P.V.M., La Scola, B., Bonjardim, C.A., Abrahão, J.S., 2016. *Acanthamoeba* and mimivirus interactions: the role of amoebal encystment and the expansion of the 'Cheshire Cat' theory. *Current opinion in microbiology*, 31, pp.9-15.

Silva, L.C., Rodrigues, R.A.L., Oliveira, G.P., Dornas, F.P., La Scola, B., Kroon, E.G., Abrahão, J.S., 2019. Microscopic analysis of the *Tupanvirus* cycle in *Vermamoeba vermiformis*. *Frontiers in microbiology*, 10, p.671.

Suhre, K., 2005. Gene and genome duplication in *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. *Journal of virology*, 79(22), pp.14095-14101.

Suzan-Monti, M., Scola, B.L., Barrassi, L., Espinosa, L., Raoult, D., 2007. Ultrastructural characterization of the giant volcano-like virus factory of *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. *PloS one*, 2(3), p.e328.

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., 2009. Structural studies of the giant mimivirus. *PLoS biology*, 7(4), p.e1000092.

Yutin, N., Koonin, E.V., 2012. Hidden evolutionary complexity of Nucleo-Cytoplasmic Large DNA viruses of eukaryotes. *Virology journal*, 9(1), pp.1-18.

Yutin, N., Raoult, D., Koonin, E.V., 2013. Virophages, polintons, and transpovirons: a complex evolutionary network of diverse selfish genetic elements with different reproduction strategies. *Virology journal*, 10(1), pp.1-15.

Yutin, N., Wolf, Y.I., Raoult, D., Koonin, E.V., 2009. Eukaryotic large nucleo-cytoplasmic DNA viruses: clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. *Virology journal*, 6, pp.1-13.

Zauberman, N., Mutsafi, Y., Halevy, D.B., Shimoni, E., Klein, E., Xiao, C., Sun, S., Minsky, A., 2008. Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *PLoS biology*, 6(5), p.e114.

8. Životopis

Rođena sam 15. svibnja 2001. godine u Zagrebu. Završila sam Osnovnu školu Josipa Jurja Strossmayera 2016. godine, a iste godine upisala sam Gimnaziju Tituša Brezovačkog. Godine 2015. završila sam i Osnovnu glazbenu školu Pavla Markovca, a odlučila sam nastaviti glazbeno obrazovanje te sam u istoj glazbenoj školi upisala i srednjoškolski program, koji sam pohađala paralelno s gimnazijom. Srednju glazbenu školu Pavla Markovca završila sam 2019. godine, čime sam stekla titulu glazbenca flautistica. Godine 2020. maturirala sam i u Gimnaziji Tituša Brezovačkog te upisala Preddiplomski sveučilišni studij Biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Iste godine upisala sam solo pjevanje u Glazbenoj školi Vatroslava Lisinskog, koju i dalje pohađam.