


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

О природе пикобирнавирусов

А.Ю. Кашников , Н.В. Епифанова, Н.А. Новикова

Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора,
Нижний Новгород, Россия

 a.kashn@yandex.ru

Аннотация. Считается, что пикобирнавирусы (*Picobirnaviridae*, *Picobirnavirus*, ПБВ) являются вирусами животных, так как их обычно находят в образцах стула животных. Однако до сих пор не найдена модель животного или клеточная культура для их размножения. В 2018 г. было выдвинуто и экспериментально обосновано гипотетическое предположение о принадлежности ПБВ к вирусам прокариот. Эта гипотеза основана на присутствии в геноме всех ПБВ перед тремя открытыми рамками считывания (ORF) в сайте связывания с рибосомой последовательностей Шайна–Дальгарно, которыми насыщен геном прокариот, тогда как в геноме эукариот такие участки встречаются с низкой частотой. Насыщенность генома последовательностями Шайна–Дальгарно, а также сохранение такой насыщенности у потомства, по мнению ученых, позволяет отнести ПБВ к вирусам прокариот. В то же время существует вероятность принадлежности ПБВ к вирусам эукариотических хозяев – грибов или беспозвоночных, поскольку были обнаружены ПБВ-подобные последовательности, сходные с геномом вирусов грибов из семейств митовирусов и партитивирусов. В связи с этим возникло представление, что по способу репродукции ПБВ напоминают вирусы грибов. Расхождение во взглядах на истинного хозяина (хозяев) ПБВ вызвало дискуссию среди ученых и потребовало дальнейших исследований для выяснения их природы. В обзоре освещены результаты исследований по поиску хозяина ПБВ. Проанализированы причины появления среди множества характерных для ПБВ последовательностей генома атипичных последовательностей, используемых для трансляции вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) вместо стандартного генетического кода альтернативный митохондриальный код низших эукариот (грибов и беспозвоночных). Цель обзора состояла в сборе аргументов в поддержку гипотезы, полагающей фаговую природу ПБВ и поиск наиболее реалистичного объяснения причин выявления нестандартных для ПБВ геномных последовательностей. Опираясь на гипотезу о генеалогическом родстве ПБВ с РНК-вирусами из других семейств со сходным сегментированным геномом, такими как *Reoviridae*, *Cystoviridae*, *Totiviridae* и *Partitiviridae*, вирусологи поддерживают предположение о решающей роли в происхождении атипичных ПБВ-подобных штаммов реассортации между ПБВ и вирусами перечисленных семейств. Собранные аргументы свидетельствуют о большой вероятности фаговой природы у ПБВ. Представленные в обзоре данные свидетельствуют, что принадлежность ПБВ-подобного потомства к вирусам прокариот или эукариот определяется не только степенью насыщения его генома прокариотическим мотивом, стандартным или митохондриальным генетическим кодом. Решающим фактором может являться также первичная структура гена, кодирующего белок вирусного капсида, отвечающего за наличие или отсутствие специфических протеолитических свойств у вируса, определяющих его способность к самостоятельному горизонтальному распространению в новые клетки.


Ключевые слова: пикобирнавирус; сегмент генома; клетка-хозяин; митохондриальный генетический код; филогенетическое дерево; реассортация.

Для цитирования: Кашников А.Ю., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. О природе пикобирнавирусов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(3):264-275. DOI 10.18699/VJGB-23-32

On the nature of picobirnaviruses

A.Yu. Kashnikov , N.V. Epifanova, N.A. Novikova

I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia

 a.kashn@yandex.ru

Abstract. The picobirnaviruses (*Picobirnaviridae*, *Picobirnavirus*, PBVs) are currently thought to be animal viruses, as they are usually found in animal stool samples. However, no animal model or cell culture for their propagation has yet been found. In 2018, a hypothetical assumption about PBVs belonging to prokaryotic viruses was put forward and experimentally substantiated. This hypothesis is based on the presence of Shine–Dalgarno sequences in the genome of all PBVs before three reading frames (ORF) at the ribosomal binding site, with which the prokaryotic genome is saturated, while in the eukaryotic genome such regions occur with low frequency. The genome saturation with the Shine–Dalgarno sequences, as well as the preservation of this saturation in the progeny, according to scientists, allows us to attribute PBVs to prokaryotic viruses. On the other hand, there is a possibility that PBVs belong to viruses of eukaryotic hosts – fungi or invertebrates, since PBV-like sequences similar to the genome of fungal viruses from the families of mitoviruses and partitiviruses have been identified. In this regard, the idea arose that, in terms of reproduction

mode, PBVs resemble fungal viruses. The divergence of views on the true PBV host(s) has sparked discussions among scientists and required further research to elucidate their nature. The review highlights the results of the search for a PBV host. The reasons for the occurrence of atypical sequences among the PBV genome sequences that use an alternative mitochondrial code of lower eukaryotes (fungi and invertebrates) for the translation of viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) instead of the standard genetic code are analyzed. The purpose of the review was to collect arguments in support of the hypothesis about the phage nature of PBVs and to find the most realistic explanation of the reasons for identifying non-standard genomic sequences for PBVs. Based on the hypothesis about the genealogical relationship of PBVs with RNA viruses from other families with similar segmented genomes, such as *Reoviridae*, *Cystoviridae*, *Totiviridae* and *Partitiviridae*, virologists support the assumption of a decisive role in the origin of atypical PBV-like reassortment strains between PBVs and viruses of the listed families. The collected arguments given in this review indicate a high probability of a phage nature of PBVs. The data presented in the review show that the belonging of PBV-like progeny to prokaryotic or eukaryotic viruses is determined not only by its genome saturation level with a prokaryotic motif, standard or mitochondrial genetic code. The primary structure of the gene encoding the viral capsid protein responsible for the presence or absence of specific proteolytic properties of the virus that determine its ability for independent horizontal transmission into new cells may also be a decisive factor.

Key words: picobirnavirus; genome segment; host cell; mitochondrial genetic code; phylogenetic tree; reassortment.

For citation: Kashnikov A.Yu., Epifanova N.V., Novikova N.A. On the nature of picobirnaviruses. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3):264-275. DOI 10.18699/VJGB-23-32

Введение

Пикобирнавирусы (ПБВ) – это мелкие безоболочечные вирусы с бисегментированным двуцепочечным РНК-геномом, которые были обнаружены у самых разных видов животных, включая беспозвоночных, а также в образцах окружающей среды. Их находили в содержимом кишечника у людей и животных с диареей и без нее, вследствие чего ПБВ считались условно-патогенными кишечными вирусами млекопитающих и птиц. Однако культура клеток животных или животное-гнотобиот, где мог бы размножаться этот вирус, до сих пор не подобраны. Данный факт заставил некоторых исследователей усомниться в принадлежности пикобирнавирусов к вирусам эукариот. Индийские ученые S.R. Krishnamurthy и D. Wang (2018) проанализировали большое число полноразмерных (почти полноразмерных) геномных последовательностей ПБВ, обнаруженных в фекалиях людей, животных и образцах окружающей среды. В результате в геноме ПБВ были выявлены прокариотические мотивы (участки), расположенные перед открытыми рамками считывания в сайте связывания с рибосомой. На основании полученных данных выдвинута и экспериментально обоснована гипотеза о принадлежности ПБВ к вирусам прокариот – бактериофагам (Krishnamurthy, Wang, 2018), которая в дальнейшем была подкреплена рядом других исследований (Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Kleymann et al., 2020).

С другой стороны, после обнаружения новых ПБВ-подобных нуклеотидных последовательностей, кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу, но использующих для трансляции альтернативный (нестандартный) митохондриальный генетический код (плесени или беспозвоночных животных), было высказано предположение, что ПБВ могут быть грибковыми вирусами со способом репродукции, напоминающим таковой у митовирусов (Yinda et al., 2019; Kleymann et al., 2020).

Эти противоречия, вызвавшие дискуссию среди ученых по вопросу о природе истинного хозяина (хозяев) ПБВ, может разрешить гипотеза, выдвинутая в 2018 г. Y.I. Wolf с коллегами (Wolf et al., 2018) и поддержанная другими исследователями (Chauhan et al., 2021). Данная гипотеза

объясняет происхождение аномальных штаммов ПБВ склонностью этих вирусов к резкой генетической модификации вследствие реассортации сегментов генома, описанной ранее (Conceição-Neto et al., 2016), и приобретением способности бактериофага к репродукции в клетках организма другой таксономической группы – низшего эукариота.

В настоящем обзоре проанализированы имеющиеся публикации, освещающие современные представления о происхождении и эволюции ПБВ, а также проведена дискуссия по вопросу о прокариотической или эукариотической природе их истинных хозяев. Цель работы состояла в сборе аргументов в поддержку гипотезы, полагающей фаговую природу ПБВ, и поиске наиболее реалистичного объяснения причин выявления нестандартных для ПБВ геномных последовательностей.

Характеристика ПБВ

Пикобирнавирусы – это безоболочечные вирусы с икосаэдрическим типом симметрии ($T = 2$), диаметром ~ 33 – 37 нм, принадлежащие к единственному роду *Picobirnavirus* в семействе *Picobirnaviridae* порядка *Diplohnvirales*. Двуцепочечный (дц) РНК-геном ПБВ состоит из двух отдельных сегментов размерами 2525 и 1745 п. н. (рис. 1). Информация о структуре вириона и генома ПБВ, ареале распространенности, связи с диареей, уровне экскреции, оппортунистическом (условно-патогенном) и зоонозном характере вируса, широком тканевом тропизме и генетической вариабельности приведена в обзорах (Ganesh et al., 2014; Кашников и др., 2020; Ghosh, Malik, 2021). Там же описаны способы амплификации, ПЦР-диагностики и секвенирования генома этих вирусов.

Используя филогенетический анализ на основе нуклеотидной последовательности гена РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), расположенного в сегменте 2 генома, исследователи делят ПБВ на пять геногрупп: GI, GII (Rosen et al., 2000), GIII (Smits et al., 2014), GIV и GV (Li et al., 2015), среди которых встречаются генетически вариабельные кластеры. Геногруппы GI и GII чаще встречаются в кластере ПБВ, выявляемых у позвоночных животных и человека. Геногруппа GIII была обнаружена

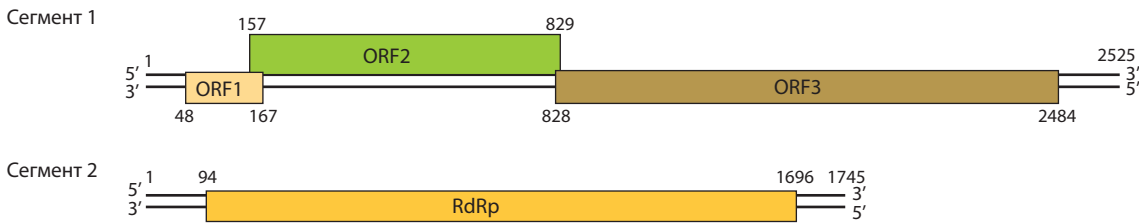


Рис. 1. Организация генома ПБВ человека (штамм Hu005102), относящегося к геногруппе I (Ghosh, Malik, 2021).

Сегмент 1 генома Hu005102 состоит из трех открытых рамок считывания (ORF) – ORF1, ORF2 и ORF3. Рамка ORF3 кодирует предшественник белка капсида вируса. Сегмент 2 имеет одну ORF, кодирующую вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp). Продукты ORF1 и ORF2 не идентифицированы.

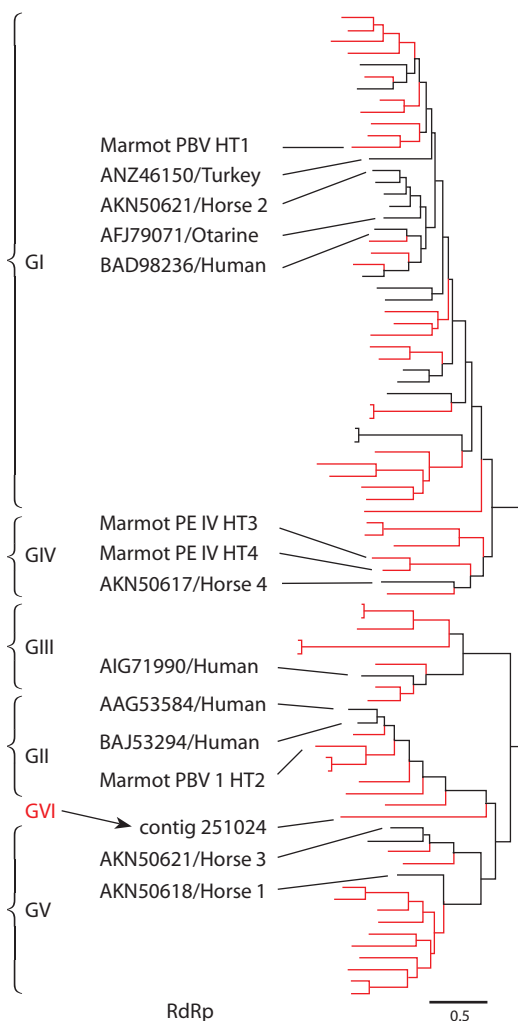


Рис. 2. Филогенетическое дерево, демонстрирующее наличие пяти предполагаемых геногрупп ПБВ, выявленных у сурка.

Построено на основе нуклеотидных последовательностей полного гена RdRp. Красным цветом обозначены последовательности геномов ПБВ сурка, черным – последовательности генома ПБВ от других хозяев (Luo et al., 2018, с модификациями).

у беспозвоночных (Shi et al., 2016), а GIV и GV выявлены в грибковых и прокариотических клетках-хозяевах (Knox et al., 2018). Все пять геногрупп ПБВ, найденные у одного хозяина (сурка), представлены на филограмме (рис. 2) в исследовании (Luo et al., 2018). Основными геногруппами ПБВ являются GI и GII, из которых наиболее распростра-

нены ПБВ геногруппы I (Shi et al., 2016; Kumar et al., 2020; Ghosh, Malik, 2021).

Установлено, что ПБВ, относящиеся к одной RdRp-геногруппе, могут быть выявлены у принадлежащих разным видам предполагаемых хозяев. Также показано, что у «хозяина» одного вида обнаруживаются ПБВ разных геногрупп (Ganesh et al., 2014; Malik et al., 2014; Woo et al., 2014, 2019; Li et al., 2015; Gallagher et al., 2017; Navarro et al., 2017; Boros et al., 2018; Duraisamy et al., 2018; Ghosh et al., 2018; Yinda et al., 2019; Joycelyn et al., 2020; Kleymann et al., 2020; Ghosh, Malik, 2021). В то же время настоящий хозяин ПБВ до настоящего времени не определен. Среди высших эукариот не удалось подобрать ни культуру клеток, ни животных-гнотобионтов для успешного размножения вируса (Ganesh et al., 2014; Malik et al., 2014; Delmas et al., 2019; Kleymann et al., 2020).

В дальнейшем, по мере изучения ПБВ, у исследователей появились сомнения по поводу того, что хозяевами этих вирусов могут являться клетки высших эукариот (Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Krishnamurthy, Wang, 2018). Недавно обнаружено, что от дцРНК-вирусов высших эукариот (*Reoviridae*) ПБВ отличаются не только архитектурой капсида, но и тем, что, предположительно, могут инфицировать прокариотические клетки (Knox et al., 2018; Krishnamurthy, Wang, 2018).

Гипотеза о фаговой природе ПБВ и связанные с ней противоречия

До появления гипотезы S.R. Krishnamurthy, D. Wang (2018) считалось, что ПБВ являются вирусами эукариот, так как их обнаруживали у самых разных видов животных, включая беспозвоночных. Поскольку ПБВ-подобные последовательности чаще всего находили в содержимом кишечника людей и животных с диареей или без нее, они считались условно-патогенными кишечными вирусами. Но виром кишечника у животных содержит не только эукариотические, но и прокариотические вирусы, которые обычно составляют наибольшую его долю (Yinda et al., 2018). Логично предположить, что ПБВ присутствуют не в клетках кишечника, а в его содержимом и могут быть прокариотическими вирусами микробиома кишечника (Adriaenssens et al., 2018; Kunz et al., 2018; Delmas et al., 2019; Bell et al., 2020; Guajardo-Leiva et al., 2020; Ghosh, Malik, 2021).

В этом случае уровень выявления ПБВ должен соответствовать количеству бактерий, в которых они размножаются. В частности, в исследовании (Kleymann et al., 2020)

сообщалось о высоких показателях обнаружения (35.36 %, 29/82) ПБВ GI в образцах фекалий индийского мангуста на о. Сент-Китс (один из малых Антильских островов), что могло означать сосредоточение бактерий-хозяев ПБВ в данной местности. Причем наблюдалась разница частоты обнаружения ПБВ у мангустов из городской среды и диких мест обитания, которая составляла 33.33 % (19/57) и 40.00 % (10/25) соответственно и могла свидетельствовать о разнице в бактериальной нагрузке в этих местах.

Предположение, что ПБВ могут представлять собой вирусы прокариот, появилось, когда исследователи стали проводить анализ разнообразия полноразмерных (почти полноразмерных) последовательностей их генома. С помощью технологий секвенирования нового поколения (NGS – next generation sequencing) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением неспецифических праймеров удалось выявить некоторые особенности генома ПБВ, которые свидетельствуют, что эти вирусы на самом деле могут быть прокариотическими или грибковыми (Shi et al., 2016; Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Krishnamurthy, Wang, 2018; Wolf et al., 2018; Yinda et al., 2018; Delmas et al., 2019; Kleymann et al., 2020; Ghosh, Malik, 2021).

В 2018 г., анализируя разные эталонные геномы РНК-содержащих вирусов индивидуально и на уровне семейств, индийские ученые S.R. Krishnamurthy и D. Wang обнаружили в геноме ПБВ консервативные участки, называемые последовательностями Шайна–Дальгарно (Shine–Dalgarno sequence) или SD-последовательностями (Krishnamurthy, Wang, 2018). Такие участки присутствуют в геномах всех прокариотических и эукариотических вирусов и состоят, как правило, из шести нуклеотидов AGGAGG. Они расположены в 5'-нетранслируемой области перед открытыми рамками считывания (ORF) на расстоянии от 1 до 18 нуклеотидов (спейсерный участок) до стартового кодона (AUG), инициирующего трансляцию продуктов вирусного генома (Krishnamurthy, Wang, 2018; Ghosh, Malik, 2021). Функционально SD-последовательности являются сайтами связывания с рибосомой и служат для усиления эффективности трансляции вирусных белков.

Однако обогащение генома SD-последовательностями наблюдалось только в семействах вирусов, которые инфицируют прокариот, но не в семействах, инфицирующих эукариот. Это наблюдение позволило S.R. Krishnamurthy и D. Wang предположить, что высокая частота встречаемости SD-последовательностей в геномах вирусов может быть определяющим признаком прокариотического типа вируса и любые вирусные семейства, чьи геномы обогащены такими SD-участками, являются прокариотическими. Среди вирусов, инфицирующих прокариот, высоким содержанием SD-последовательностей обладают, например, некоторые бактериофаги семейства *Cystoviridae*, геном которых состоит из нескольких фрагментов дцРНК (Mindich, 1988; Boros et al., 2018).

В геноме ПБВ SD-последовательности присутствовали перед всеми ORF в сегментах 1 и 2. Уровень обогащения SD-участками у ПБВ был выше, чем у любого известного семейства прокариотических вирусов, и такой уровень отличался постоянством (у 100 % исследованных гено-

мов), в то время как не у всех прокариотических вирусов он сохраняется в процессе репродукции. Столь высокий уровень сохранения прокариотических участков в геноме ПБВ должен коррелировать с уровнем их сохранения в геноме бактерий определенного типа из спектра хозяев, которых могут заражать ПБВ. Этот уровень неодинаков в разных вирусных семействах (Krishnamurthy, Wang, 2018). Сохранение уровня обогащения прокариотическими участками в геномах вирусов прокариот зависит от того, сохраняет ли их в своих генах сама бактерия-хозяин. Известно, что не все виды бактерий сохраняют прокариотическую последовательность Шайна–Дальгарно в одинаковой степени. Например, в геноме бактерий, относящихся к типу *Firmicutes*, прокариотический мотив сохраняется более чем в 80 % генов, тогда как у *Bacteroides* – менее чем в 10 % (Omotajo et al., 2015). Известно, что разные семейства бактериальных РНК-вирусов могут состоять из эволюционно родственных вирусов, способных инфицировать один тип бактерий. Из этого факта следует, что ПБВ могут заражать бактерии в пределах типа *Firmicutes*, который по уровню сохранения прокариотического мотива в генах (более 80 %) более всего соответствует ПБВ и наиболее распространен в фекальной микробиоте (Sekelja et al., 2011).

Подтверждением гипотезы о фаговой природе ПБВ (Krishnamurthy, Wang, 2018) служат результаты, полученные другими учеными (Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Kleymann et al., 2020). В частности, в работе (Boros et al., 2018) в геноме куриных ПБВ было выявлено присутствие SD-участков, которые располагались в сегменте 1 перед тремя ORF и в сегменте 2 перед ORF выше кодонов инициации. Исследователям с помощью мечения bхHis и вестерн-блоттинга 1-го геномного сегмента ПБВ, содержащего SD-мотив, удалось *in vivo* выявить возможность его экспрессии и функционирования в *Escherichia coli* (Boros et al., 2018). Полученные результаты, по мнению авторов, служат доказательством существования бактериальной культуры для размножения ПБВ.

Предположение, что ПБВ представляют собой новое семейство РНК-бактериофагов с высоким уровнем геномного разнообразия, нашло подтверждение и в работе (Adriaenssens et al., 2018). Ее авторы обнаружили гексамерный прокариотический мотив AGGAGG в 100 % геномных последовательностей ПБВ, в то время как у вирусов эукариот из различных семейств SD-участки встречались с низкой частотой и в основном представляли собой тетрамеры (AGGA, GGAG, GAGG) (Adriaenssens et al., 2018). В обзоре (Ghosh, Malik, 2021) приведен ряд консервативных прокариотических SD-последовательностей (мотивов), обнаруженных перед всеми ORF в сегментах 1 и 2 ПБВ и ПБВ-подобных геномов с указанием расположения и с номерами доступа в GenBank.

Несмотря на полученные практические результаты, свидетельствующие о возможной принадлежности ПБВ к вирусам прокариот, многие авторы считают, что окончательным доказательством фаговой природы ПБВ подобрать преждевременно (Ramesh et al., 2021). Еще не подобран хозяин, в котором бы ПБВ успешно размножались, а учитывая, что кишечный микробиом состоит из нескольких сотен в основном некультивируемых бактерий,

идентификация истинного бактериального или архейного хозяина ПБВ (если таковые имеются) будет сложной задачей (Boros et al., 2018).

Кроме того, в геноме некоторых штаммов ПБВ были обнаружены открытые рамки считывания (ORF), кодирующие ген RdRp, в которых при трансляции вместо ожидаемого стандартного генетического кода использовался альтернативный митохондриальный код грибов и беспозвоночных (Shi et al., 2016; Yinda et al., 2018, 2019; Kleymann et al., 2020). Так появилось предположение, что хозяевами ПБВ могут являться клетки низших эукариот.

ПБВ-подобные штаммы с нестандартным генетическим кодом

Как известно, последовательности генов в геномах вирусов имеют характерные для них консервативные участки – «мотивы», по которым вирусы идентифицируют. К характерным для ПБВ и ПБВ-подобных геномов мотивам относятся: прокариотический участок Шайна–Дальгарно AGGAGG (Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Ghosh et al., 2018; Krishnamurthy, Wang, 2018; Yinda et al., 2018, 2019; Guajardo-Leiva et al., 2020; Joycelyn et al., 2020; Kleymann et al., 2020), концевые последовательности 5'-GUAAA и 3'-ACUGC (Ghosh et al., 2018; Delmas et al., 2019; Woo et al., 2019; Kleymann et al., 2020) и три участка, представленные в последовательностях аминокислот, – DFXXKFD, SGSGGT и GDD (Kleymann et al., 2020).

При трансляции гена RdRp большинства пикобирнавировусов используется стандартный генетический код. Однако недавно в образцах фекалий людей (Woo et al., 2019), мангустов (Kleymann et al., 2020), летучих мышей (Yinda et al., 2018) и беспозвоночных (Shi et al., 2016) были выявлены новые ПБВ-подобные последовательности гена RdRp с альтернативным (нестандартным) митохондриальным генетическим кодом. Митохондриальный код характерен для вирусов плесневых грибов и беспозвоночных. В частности, из содержимого кишечника летучих мышей было выделено пять ПБВ-подобных геномных последовательностей, состоящих из дцРНК с митохондриальным генетическим кодом (Yinda et al., 2018). У четырех из них (P11-300, P11-378, P14-90 и P15-218) не удалось идентифицировать присутствие гена капсида. Эти ПБВ-подобные геномы содержали только последовательность гена RdRp с митохондриальным генетическим кодом плесени. Отсутствие гена белка капсида в них напоминало геном митовирусов из семейства *Mitoviridae*, которые, как известно, инфицируют митохондрии одноклеточных плесневых грибов (рис. 3) (Hillman, Cai, 2013; Shi et al., 2016).

Геном митовирусов, как и четыре аномальных ПБВ-подобных генома, состоит из дцРНК и кодирует только RdRp. Митовирусы лишены капсида, воспроизводятся в митохондриях и для трансляции своего RdRp обычно используют генетический код митохондрий плесени. Так появилось предположение, что хозяевами ПБВ могут являться плесневые грибы (Yinda et al., 2018; Kleymann et al., 2020).

Однако, в отличие от митовирусов, у выявленных С.К. Yinda с коллегами (Yinda et al., 2018) безкапсидных ПБВ-подобных штаммов в единственном сегменте гено-

ма RdRp присутствовали характерные для ПБВ консервативные участки. В геноме пятого ПБВ-подобного штамма (P16-366), кроме характерных консервативных для ПБВ особенностей гена RdRp, была обнаружена последовательность, кодирующая белок капсида. Этот штамм клас-теризовался на филогенетическом древе вместе с ПБВ геногруппы GII, но он использовал альтернативный генетический код и в плане организации генома был очень похож на вирусы грибов семейства *Partitiviridae* (Duquergo et al., 2009). Эти семейства имеют минималистичный геном, состоящий из двух сегментов дцРНК, кодирующих RdRp и белок капсида соответственно, который у этих семейств явно гомологичен (Wolf et al., 2018).

Аналогично у мангуста среди типичных ПБВ-подобных штаммов был выделен штамм M17A (Kleymann et al., 2020), ген RdRp которого сохранял все консервативные для ПБВ мотивы, но имел альтернативный митохондриальный код плесени. Последовательность капсида в геноме этого штамма отсутствовала. Предположение, что ПБВ могут быть вирусами грибов или беспозвоночных, как справедливо замечено S. Ghosh, Y.S. Malik (2021), еще более усложнило дискуссию об истинных хозяевах ПБВ.

Дискуссия о происхождении аномальных ПБВ-подобных штаммов

В ходе дискуссии об истинных хозяевах ПБВ исследователи предприняли попытки интерпретации причин появления ПБВ-подобных штаммов (Shackelton et al., 2008; Wolf et al., 2018; Yinda et al., 2018; Shahi et al., 2019; Ghosh, Malik, 2021). В частности, С.К. Yinda с соавторами (Yinda et al., 2018) предположили, что ПБВ-подобные штаммы, обнаруженные в содержимом кишечника разных эукариотических хозяев, с геномом, напоминающим геном митовирусов, могут иметь способ воспроизводства, сходный с митовирусами. При таком способе воспроизводства ген белка капсида не нужен, поскольку митовирусы не используют путь самостоятельного горизонтального переноса от клетки к клетке, а передаются вертикально от материнских клеток дочерним (при делении) или горизонтально (посредством слияния гиф). Аналогично при сборке новых ПБВ-подобных частиц могут формироваться упрощенные структуры с характерной для митовирусов адаптацией к существованию в клетке гриба и утратившие ген белка капсида. Такая трактовка появления безкапсидных РНК-вирусов согласуется с одной из тенденций в эволюции РНК-вирусов, связанной с потерей их геномом структурного модуля, замеченной Y.I. Wolf с коллегами (Wolf et al., 2018).

Тенденцию в эволюции РНК-вирусов, связанную с потерей сегмента генома с геном капсида, демонстрирует схема родословной эукариотических вирусов с РНК-геномом, представленная на рис. 4. Эта схема объясняет и происхождение капсидированных РНК-вирусов одноклеточных эукариот.

Эволюция безкапсидных вирусов низших эукариот (грибов и беспозвоночных) идет по пути сокращения генома ввиду утраты гена белка капсида их вероятного предка – левивируса, инфицирующего прокариот (вектор эволюции под цифрой 1 на рис. 4, ведущий к появлению в конце семейства *Narnaviridae*). В соответствии со схемой

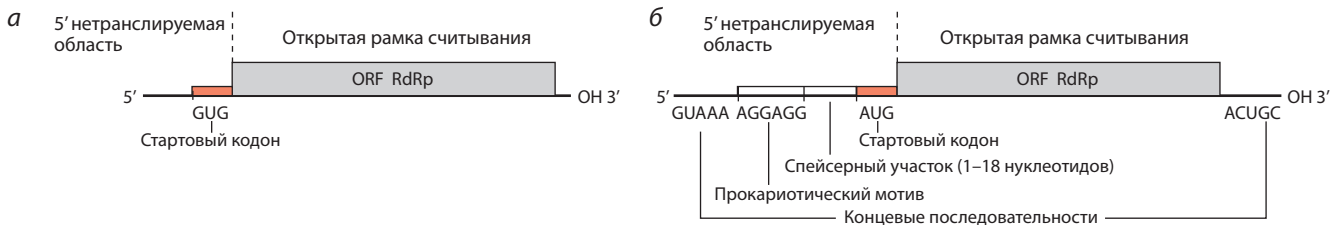


Рис. 3. Геномы митовируса (а) и пикобирнавируса (б).

В геноме митовируса с митохондриальным генетическим кодом (а) отсутствуют мотивы, характерные для вирусов со стандартным генетическим кодом. Геном пикобирнавируса со стандартным генетическим кодом (б) содержит характерные для ПБВ мотивы и прокариотический мотив.

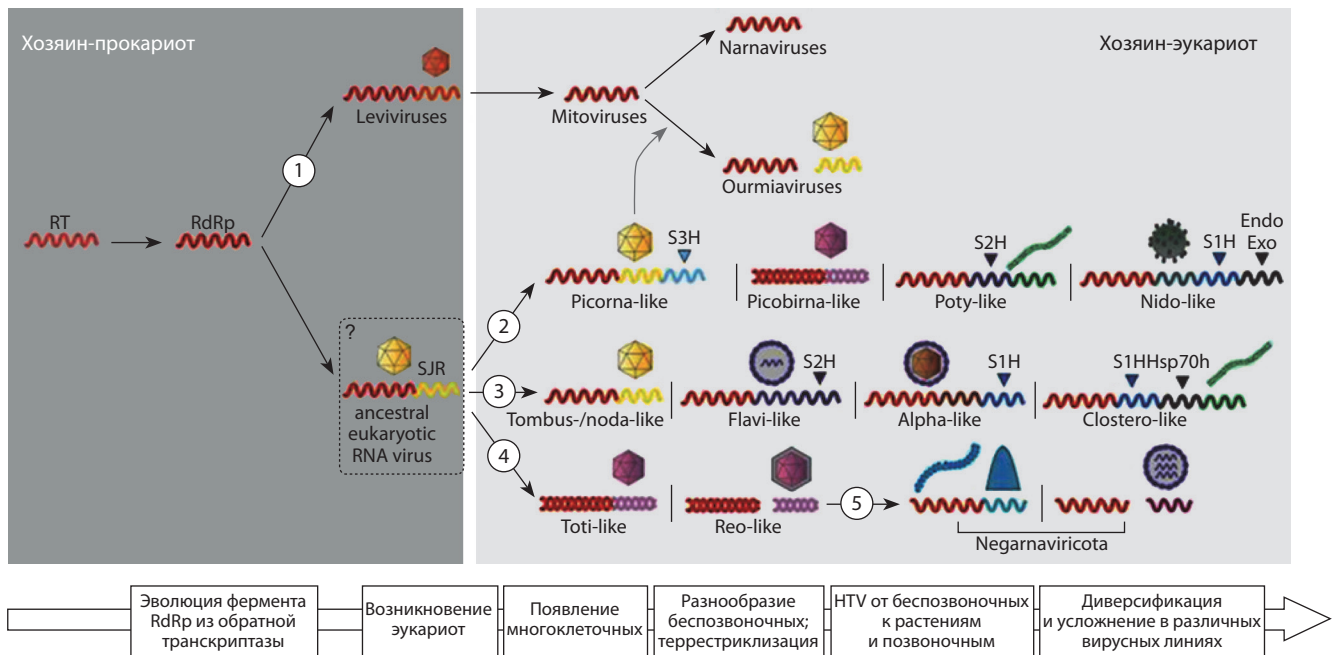


Рис. 4. Схема, демонстрирующая родословную (происхождение) эукариотических вирусов с РНК-геномом (Wolf et al., 2018).

предок митовирусов из семейства *Mitoviridae* произошел от семейства *Leviviridae*, ранее содержащего ген капсидного белка. Показательным примером сокращения генома служат гиповирусы – безкапсидные вирусы с дцРНК, структура и филогенетический анализ генома которых показали, что они произошли от потивирусов, утративших капсидный белок (Dawe, Nuss, 2013; Chauhan et al., 2021) и ген белка капсида, попав в клетки одноклеточных эукариот. Репликация митовирусов осуществляется только в митохондриях, где реплицируются их безкапсидные («голые») РНК-геномы (репликоны). С потерей структурного гена митовирусы утратили и способность к самостоятельной горизонтальной передаче (Shackelton, Holmes, 2008).

Происхождение группы безкапсидных ПБВ-подобных штаммов, выделенных (Yinda et al., 2018; Kleymann et al., 2020) у камерунских летучих мышей (P11-300, P11-378, P14-90 и P15-218) и у мангуста (штамм M17A), также можно объяснить потерей родительским штаммом сегмента генома, кодирующего капсидный белок.

В то же время безкапсидный РНК-вирус (митовирус) мог в процессе эволюции приобрести капсид (конечное направление вектора 1, ведущее к появлению семейства

Ourmiaviridae) за счет слияния своего голого РНК-репликона с репликоном белка капсида +РНК-вируса эукариот, возможно, имеющего в качестве предка вирус эукариот (вектор эволюции 2 на рис. 4). Таким эволюционным путем могли появиться инкапсидированные штаммы РНК-вирусов и, вероятно, ПБВ-подобные аналоги.

Слияние или утрату сегментов генома у РНК-вирусов исследователи объясняют другой тенденцией в их эволюции – способностью к реассортации, т.е. перераспределению генных модулей (RdRp и белка капсида) между близкородственными семействами вирусов со сходными генами. Реассортационная модификация генома замечена и у ПБВ (Conceição-Neto et al., 2016). Творческой ролью реассортации между семействами РНК-вирусов со сходными генами сторонники данного механизма генетического изменения вирусов объясняют происхождение ПБВ-подобного штамма P16-366, обнаруженного у летучих мышей (Yinda et al., 2018). Данный штамм содержал вместе с последовательностью гена RdRp (с нестандартным митохондриальным кодом) последовательность, кодирующую белок капсида. Предполагаемое генетическое сходство между семействами вирусов с бисег-

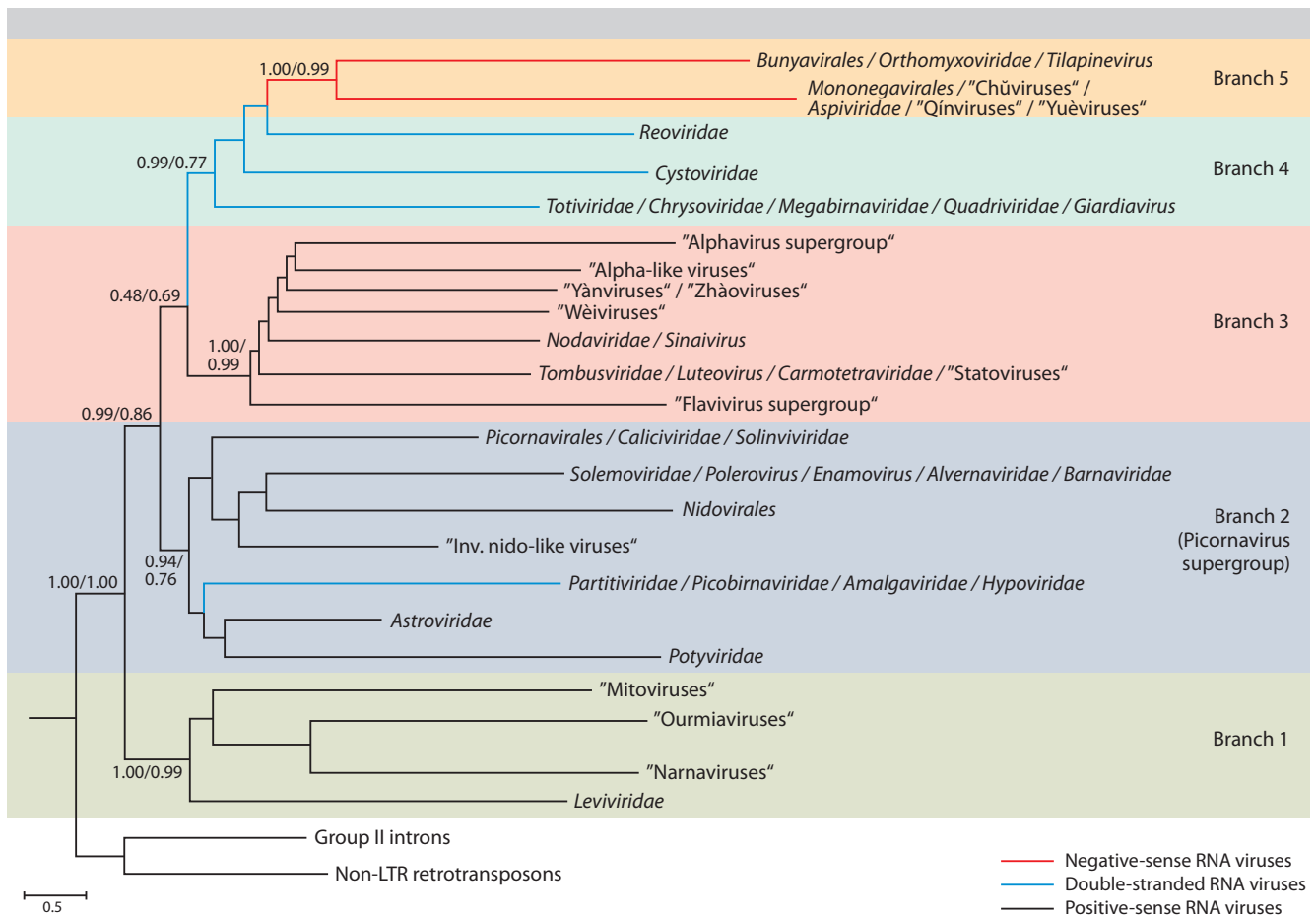


Рис. 5. Филогенетическое дерево вирусов с РНК-геномом, построенное на основе последовательностей генов РНК-зависимой РНК-полимеразы и обратной транскриптазы (Wolf et al., 2018).

Изображены пять основных ветвей, среди которых ветви 1, 2 и 4 имеют непосредственное отношение к происхождению атипичных ПБВ-подобных штаммов.

ментированным дцРНК-геномом основано на гипотезе реассортационного механизма эволюции этих вирусов (Wolf et al., 2018).

О родстве ПБВ с семействами вирусов с дцРНК-геномом

В основе филогенетической связи между семействами РНК-вирусов с сегментированным геномом лежит информация о первичной структуре гена RdRp. Этот ген универсален и, несмотря на значительно большее распространение среди вирусов эукариот, присутствует почти у всех РНК-содержащих вирусов (включая безкапсидные репликоны РНК), за исключением некоторых сателлитных вирусов (Dolja, Koonin, 2018). Универсальность гена RdRp указывает на возможность его общего происхождения у РНК-вирусов. В 2018 г. была выдвинута гипотеза (Wolf et al., 2018), предполагающая наличие филогенетических связей между семействами РНК-содержащих вирусов, и построено филогенетическое дерево (рис. 5), топология которого демонстрирует возможную связь между этими семействами.

Филогенетическое дерево, построенное на основании множества филогенетических данных, дает представле-

ние о возможном происхождении ПБВ. Это дерево подтверждает сценарий эволюции, при котором последними общими предками линий вирусов с дцРНК-геномом были простые вирусы, сегментированный геном которых содержал два гена (RdRp и белка капсида). По предположению авторов гипотезы, все вирусы с дцРНК-геномом в ветвях 2 и 4 филогенетического дерева имеют сходные капсидные белки, которые могут сочетаться с геном RdRp от разных вирусов с +РНК-геномом.

Вирусы с дцРНК-геномом – *Partitiviridae*, *Picobirnaviridae*, *Cystoviridae*, *Reoviridae* и *Totiviridae* – составляют отдельные линии в двух ветвях филогенетического дерева. Вирусы семейства *Picobirnaviridae* находятся на одной линии с семействами *Hypoviridae*, *Amalgaviridae* и *Partitiviridae*. Самые филогенетически близкие семейства, образующие один кластер, – это *Picobirnaviridae* и *Partitiviridae*. Близкое расположение этих семейств демонстрирует высокую степень родства между ними. Их объединяют сходная организация вирионов и гомологичные белки капсида (Duquerroy et al., 2009; Wolf et al., 2018). Различие между этими вирусами заключается в том, что поверхностные белки капсида ПБВ, в отличие от таковых партитивиров, обладают перфорационной активностью,

обуславливающей способность проникновения вируса в клетку. Кроме того, в связи со способностью ПБВ к горизонтальному распространению два сегмента его генома при сборке объединяются в один капсид, а у партитивировсов ген RdRp и ген белка капсида используют отдельные капсиды (Vainio et al., 2018).

Ген капсидного белка ПБВ отдаленно родственен генам белков капсида других вирусов с дцРНК-геномом (*Totiviridae*, *Reoviridae* и *Cystoviridae*), составляющих три параллельные эволюционные линии в ветви 4 филогенетического дерева (Wolf et al., 2018). О значительной гомологии генов, кодирующих белок капсида вирусов семейств *Reoviridae*, *Totiviridae*, *Cystoviridae*, *Picobirnaviridae* и *Partitiviridae*, говорилось и ранее (Львов и др., 2013; El Omari et al., 2013; Luque et al., 2014).

Три эволюционные линии ветви 4 филогенетического дерева образованы семействами вирусов, инфицирующими как прокариот (*Cystoviridae*), так и эукариот (*Reoviridae*, *Totiviridae*). Расположение этих вирусных семейств на одной ветви, по мнению авторов филогенетического дерева, не исключает возможности происхождения эукариотических +РНК-вирусов от их прокариотических аналогов. Они допускают происхождение митовирусов (реплицирующихся в митохондриях клеток плесени) от общего с левивирусами предка – прокариотического РНК-вируса, паразитирующего в энтеробактериях. Доказательством этому может служить эволюционное родство между цистовирусами (вирусы бактерий) и реовирусами (Poranen, Bamford, 2012; El Omari et al., 2013).

Как предполагают сторонники творческой роли реассортации, происхождение ПБВ-подобного штамма Р16-366 могло стать результатом реассортации между еще не обнаруженным родственником ПБВ из ветви 2, перешедшим к размножению в митохондриях клеток грибов, и одним из вирусов с дцРНК-геномом ветви 4 (см. рис. 5). Причем замечено, что генетические ограничения на способность создавать реассортанты при коинфекции с вирусами семейств, образующих ветвь 4 филогенетического дерева, могут быть менее строгими для семейства вирусов прокариот *Cystoviridae*. Появление капсидированного ПБВ-подобного штамма Р16-366 произошло вследствие объединения сегмента с геном RdRp +РНК-вируса ветви 2 (возможно, голого РНК-репликона), использующего митохондриальный код, с сегментом гена капсида дцРНК-вируса ветви 4.

Еще одним направлением в эволюции вирусов с бисегментированным дцРНК-геномом является приобретение партитивности – распределения сегментов генома в одну (монопартитные) или отдельные (би-мультипартитные) частицы. Данная тенденция интересна тем, что способствует пониманию природы хозяев ПБВ-подобных штаммов (прокариотической или эукариотической). Например, бипартитность замечена только у вирусов грибов (*Partitiviridae*) с дцРНК-геномом и у вирусов растений с одноцепочечным ДНК-геномом (*Begomoviruses*) (Nibert et al., 2013). У вирусов бактерий вообще и с сегментированным дцРНК-геномом в частности (*Cystoviridae*) распределения сегментов генома в отдельные частицы не наблюдается. Партитивность связана со способом передачи вируса (самостоятельный или несамостоятельный).

Так, партитивные вирусы, паразитирующие в клетках грибов, не обладают способностью к самостоятельному (горизонтальному) распространению, и они бипартитны, тогда как ПБВ, распространяющиеся самостоятельно, монопартитны. Горизонтальный (самостоятельный) путь распространения позволяет им с большей вероятностью передать оба сегмента генома в новую клетку. Способность к самостоятельному (горизонтальному) распространению в новые клетки можно рассматривать в качестве одного из основных критериев, позволяющих определить истинного хозяина выявленного вируса.

Наличие молекулярного аппарата для проникновения в клетку – важный критерий, определяющий природу хозяина ПБВ

В ходе ознакомления с исследованиями, решающими вопрос о природе ПБВ и ПБВ-подобных штаммов, мы пришли к пониманию, что принадлежность этих вирусов к вирусам бактерий, высших или низших эукариот может определяться не только по характерному уровню насыщенности их генома прокариотическим мотивом, стандартным или митохондриальным генетическим кодом. Эта принадлежность в меньшей степени должна детерминироваться наличием или отсутствием специфической (по отношению к клетке-хозяину) протеолитической активности белка капсида, обуславливающей возможность самостоятельного проникновения вируса в клетку. Способность к самостоятельной горизонтальной передаче характерна для вирусов животных и фагов, в то время как у вирусов низших эукариот (партитивировсов, митовирусов) она отсутствует. Белки капсида ПБВ обладают перфорационной активностью (Duquetgo et al., 2009). Это делает ПБВ способными к самостоятельному проникновению внутрь клеток и, следовательно, может характеризовать их как бактериальные вирусы.

Таким образом, мы можем заключить, что в решении вопроса об истинном хозяине ПБВ, в котором они могут размножаться, кроме консервативных мотивов, характерных для генома ПБВ, определяющим фактором является наличие механизма специфического горизонтального проникновения в клетку – белков капсида со специфической перфорационной активностью. Если эти белки специфичны к рецепторам прокариотической клетки, например клетки *Firmicutes* (Adriaenssens et al., 2018), то мы имеем дело с фагом, если специфичны к рецепторам эукариотической клетки, – с вирусом высших эукариот, а если белки капсида отсутствуют вовсе, то такой вирус можно отнести к вирусам низших эукариот (не способных к самостоятельному распространению).

Предположение о происхождении атипичных ПБВ-подобных штаммов не противоречит гипотезе фаговой природы ПБВ

Существование атипичных ПБВ-подобных штаммов не может служить опровержением предполагаемой фаговой природы ПБВ по ряду причин. Согласно гипотезе (Wolf et al., 2018), между семействами вирусов с дцРНК-геномом в структуре филогенетического дерева существуют родственные отношения, о чем свидетельствуют наличие гомологичных генов и общий предок, относящийся к

РНК-вирусам прокариот. Причем семейства РНК-вирусов эукариот и прокариот могут состоять в родстве, доказательством чему служит эволюционная связь между цисто- и реовирусами (Poranen, Bamford, 2012; El Omari et al., 2013). Это свидетельствует в пользу предположения о возможности обмена гомологичными сегментами генома между вирусами прокариот и родственными им вирусами низших эукариот, когда те и другие оказываются в клетке плесневого гриба или беспозвоночного.

Недавно стало известно, что вирусы бактерий способны не только инфицировать бактериальные клетки, но и проходить сквозь клетки эпителия эукариот с помощью механизма фагового транцитоза. Из клеток эпителия через кровь или лимфу фаги могут попасть в разные органы и ткани животных. Однако внутрь эукариотической клетки фаги проникают только с инфицированной ими бактериальной клеткой (Nguyen et al., 2017). Повсеместное выделение ПБВ из сред, где встречаются бактерии, означает, что эти вирусы могут быть не внутриклеточными вирусами эукариот, а прокариотическими вирусами микробиома кишечника (Кашников и др., 2020; Ghosh, Malik, 2021). Подтверждением предположения, что ПБВ способны инфицировать прокариотические клетки, является присутствие в их геноме консервативной прокариотической последовательности Шайна–Дальгарно (Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Krishnamurthy, Wang, 2018).

Выявление атипичных ПБВ-подобных последовательностей с нестандартным митохондриальным генетическим кодом грибов и беспозвоночных служит доказательством, что ПБВ способны к воспроизводству себе подобных и в клетках низших эукариот, претерпевая генетические изменения при смене хозяина (Yinda et al., 2018; Kleumann et al., 2020; Ghosh, Malik, 2021).

Следовательно, можно предположить, что ПБВ способны попасть в эукариотическую клетку (будь то клетка гриба, беспозвоночного или другого хозяина), где встретятся с вирусом эукариот или прокариот со сходным геномом. Среди партнеров ПБВ по реассортации могут оказаться вирусы, подобные митовирусам, партитивировам или цистовирусам. После перегруппировки сегментов генома ПБВ с вирусами-партнерами вполне вероятно появление ПБВ-подобных реассортантов (Yinda et al., 2018; Kleumann et al., 2020). Тогда, согласно предположениям авторов гипотезы реассортационного взаимодействия, в зависимости от присутствия или отсутствия прокариотических мотивов и мотивов, характерных для ПБВ, а также в зависимости от генетического кода, используемого геном нового вируса (стандартного или митохондриального), будет определяться не только степень его родства с ПБВ, но и его прокариотическая или эукариотическая природа.

Гипотеза, объясняющая образование атипичных штаммов ПБВ посредством обмена гомологичными сегментами генома между родственными вирусными семействами не исключает возможности их появления с помощью сателлитных отношений между ПБВ и вирусами-помощниками из 2-й или 4-й ветвей филогенетического дерева. Вирусы из семейств *Partitiviridae*, *Totiviridae*, *Reoviridae* известны как вирусы-помощники, в которых для своей репродукции нуждаются некоторые сателлитные диРНК (Львов и др., 2013). Допуская, что ПБВ – сателлит, ис-

пользующий для размножения в клетках гриба фермент RdRp вируса-помощника, сходного с митовирусом (из ветви 2), можно объяснить появление безкапсидных ПБВ-подобных штаммов с митохондриальным генетическим кодом P11-300, P11-378, P14-90 и P15-218, выделенных (Yinda et al., 2018), или M17A (Kleumann et al., 2020).

Использованием в качестве помощника вируса из ветви 2 или 4 (подобного *Partitiviridae*, *Reoviridae*, *Totiviridae* или *Cystoviridae*) можно объяснить появление капсидированного ПБВ-подобного штамма P16-366. Иными словами, и в данном случае способность потомства, полученного при взаимодействии вируса-сателлита с вирусом-помощником, к воспроизводству в бактериальной клетке или в митохондриях плесени будет зависеть от природы вируса-помощника. И это не противоречит предполагаемой прокариотической природе ПБВ, а лишь означает возможность ее изменения в реассортационном процессе.

Аргументы в поддержку гипотезы о принадлежности ПБВ к вирусам прокариот

Пикобирнавирусы находят везде, где встречаются бактерии: в образцах окружающей среды, у низших эукариот (грибов и беспозвоночных), в содержимом кишечника высших эукариот (включая рептилий). Это означает, что ПБВ могут быть не внутриклеточными вирусами эукариот, а прокариотическими вирусами микробиома кишечника (Ghosh, Malik, 2021).

Подобно прокариотическим цистовирусам, в геномах ПБВ присутствуют и сохраняются в насыщенном состоянии (в обоих сегментах генома в каждой рамке считывания) функциональные сайты связывания с рибосомами бактериального типа (последовательности Шайна–Дальгарно), в то время как у вирусов эукариот геном не насыщен ими (Boros et al., 2018; Krishnamurthy, Wang, 2018).

Выявление у разных видов животных родственных штаммов ПБВ может означать, что хозяевами ПБВ является конкретный тип бактерий, возможно *Firmicutes*, встречающийся в кишечнике у разных позвоночных и беспозвоночных. Уровень сохранения прокариотических участков в геноме этих бактерий (более 80 % генов) соответствует таковому у ПБВ (Krishnamurthy, Wang, 2018).

Обнаружение ПБВ в кишечнике, в органах дыхания животных (у крупного рогатого скота, у людей, обезьян, свиней), в крови и респираторных образцах (Lee, Bent, 2014; Blanco-Picazo et al., 2020) не опровергает предположения, что клетки бактерий могут являться их хозяевами. Фаги не могут напрямую инфицировать клетки разных органов высших эукариот, но в эти органы они могут попасть путем неспецифической транслокации через эпителий кишечника с кровотоком (Nguyen et al., 2017) или с помощью бактерий, в которых они размножаются (Dabrowska et al., 2005). Так фаги проникают в кровь, лимфу, органы и даже мозг.

Обладание капсидным белком с перфорационной активностью (способностью к транслокации через клеточную мембрану), как и у вирусов, способных инфицировать клетки животных (Duquerois et al., 2009), не противоречит тому, что ПБВ могут быть прокариотическими РНК-вирусами. Известно, что и представители семейства бактериальных РНК-вирусов имеют молекулярный аппарат для

проникновения в клетки бактерий с помощью трансцитоза (Reed et al., 2013; Nguyen et al., 2017).

Приобретение инфицированными животными иммунитета к ПБВ также не означает, что ПБВ могут считаться эукариотическими вирусами, поскольку установлено, что иммунные ответы хозяина могут возникать и против бактериальных вирусов (Dabrowska et al., 2005; Górski et al., 2006). Возможно, ПБВ вызывают иммунный ответ на заражение не клеток хозяина, а бактериальных клеток, составляющих его микробиом, что не исключает возможности того, что ПБВ – это вирусы прокариот.

Подобно фагам, которые бывают вирулентные и умеренные, в зараженном организме ПБВ могут находиться в активном состоянии (экскрецироваться) и неактивном (временно не экскрецироваться). При этом инфицированные животные будут бессимптомными носителями (Ganesh et al., 2014; Malik et al., 2014; Kumar et al., 2020; Ghosh, Malik, 2021).

Выявление ПБВ-подобных штаммов с геном RdRp, использующим альтернативный митохондриальный генетический код низших эукариот (плесени, беспозвоночных) для трансляции, также не является опровержением предположения о принадлежности ПБВ к вирусам прокариот. Согласно гипотезе (Wolf et al., 2018), они представляют собой результат реассортации между ПБВ и семействами РНК-вирусов со сходным геномом. Появление атипичных ПБВ-подобных штаммов свидетельствует лишь о возможности эволюционного перехода прокариотической природы вируса в эукариотическую и обратно в результате пересортировки геномных сегментов и объясняется изменением степени насыщенности генома нового вируса прокариотическими участками, от чего может измениться и его природа. Не исключена возможность сателлитных отношений между ПБВ и РНК-вирусами низших эукариот, таких как *Partitiviridae*, *Totiviridae* и *Reoviridae*, которые известны как вирусы-помощники. Известны случаи сателлитных отношений между вирусами прокариот и низших эукариот, заражающими одного одноклеточного хозяина, позволяющие воспроизводить фагам новое потомство в эукариотической клетке (Gogarten, Townsend, 2005; Claverie, Abergel, 2009; Thannesberger et al., 2017).

Осуществлена экспрессия и функционирование *in vivo* сегмента 1 ПБВ в *Escherichia coli* (Boros et al., 2018), что подтверждает существование бактериальной культуры для размножения ПБВ.

Заключение

Приведенные аргументы убедительно показывают, что ПБВ действительно могут являться вирусами прокариот, поскольку их находят везде, где встречаются бактерии: в образцах окружающей среды, в содержимом кишечника позвоночных, в клетках грибов и беспозвоночных.

Подобно прокариотическим цистовирусам, в геноме ПБВ присутствуют и сохраняются в насыщенном состоянии функциональные сайты связывания с рибосомами бактериального типа, тогда как у вирусов эукариот геном этими мотивами не насыщен. Высокий уровень сохранения прокариотических участков в геноме ПБВ позволяет предположить, что они относятся к новому семейству РНК-вирусов, инфицирующих определенный тип бакте-

рий, с высоким содержанием SD-последовательностей в геноме. Такими бактериями-хозяевами ПБВ могут быть *Firmicutes*, встречающиеся в кишечнике у позвоночных и беспозвоночных, которые обладают аналогичным уровнем свойственных бактериям прокариотических мотивов. Высокую частоту присутствия SD-последовательностей в геноме ПБВ можно считать одним из основных критериев, позволяющих идентифицировать новые семейства вирусов на принадлежность к прокариотическому или эукариотическому хозяину.

Но, чтобы вирус можно было окончательно отнести к фагам, в его геноме должен также присутствовать структурный ген, кодирующий белок со специфическими протеолитическими свойствами, определяющими способность вируса к самостоятельному проникновению в бактериальную клетку. Белок с протеолитическими свойствами присутствует в капсиде ПБВ, что указывает на способность этого вируса к горизонтальному (самостоятельному) распространению из клетки в клетку, к трансмиссии от одного хозяина к другому. В то же время обнаружение ПБВ в кишечнике у самых разных хозяев позволяет предполагать, что их горизонтальный перенос осуществляют бактерии и, следовательно, сами эти вирусы являются фагами. Фаговой природой ПБВ, обуславливающей их способность к неспецифической транслокации через стенки эпителиальных клеток кишечника, можно объяснить их выявление в разных тканях организма.

Дополнительным аргументом в предположении фаговой природы ПБВ служит также удачный эксперимент по воспроизводству *in vivo* сегмента 1 генома ПБВ в *Escherichia coli*, подтверждающий возможность существования бактериальной культуры для размножения данного вируса. Подбор культуры для размножения вируса необходим для окончательного определения его природы. До настоящего времени не доказана принадлежность ПБВ к вирусам высших эукариот, поскольку не удалось их выделить из культур эукариотических клеток. Чтобы окончательно установить, являются ли ПБВ вирусами прокариот, необходимо направить усилия на подбор хозяина для их размножения среди прокариотических клеток, полученных из микробиома кишечника млекопитающих, и подобрать условия для культивирования этих клеток.

И наконец, наличие вероятных родственников среди семейств РНК-вирусов с аналогичными генами, с которыми ПБВ могут обмениваться сегментами генома, репродуцируя атипичные генетические варианты, не противоречит правоте гипотезы о фаговой природе ПБВ, а свидетельствует об их потенциальной способности приспосабливаться к новым условиям существования, позволяющей им инфицировать эукариотические или прокариотические клетки-хозяева.

Список литературы / References

- Кашников А.Ю., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Пикобирнавирусы: распространенность, генетическое разнообразие, методы детекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020; 24(6):661-672. DOI 10.18699/VJ20.660.
[Kashnikov A.Yu., Epifanova N.V., Novikova N.A. Picobirnaviruses: prevalence, genetic diversity, detection methods. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):661-672. DOI 10.18699/VJ20.660.]

- Львов Д.К., Альховский С.В., Щелканов М.Ю. Сателлиты. В: Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М., 2013;350-352.
[Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Shchelkanov M.Yu. Satellites. In: Guide to Virology. Viruses and viral infections of humans and animals. Moscow, 2013;350-352. (in Russian)]
- Adriaenssens E.M., Farkas K., Harrison C., Jones D.L., Allison H.E., McCarthy A.J. Viromic analysis of wastewater input to a river catchment reveals a diverse assemblage of RNA viruses. *mSystems*. 2018; 3(3):1-18. DOI 10.1128/mSystems.00025-18.
- Bell N., Khamrin P., Kumthip K., Rojjanadumrongkul K., Nantachit N., Maneekarn N. Molecular detection and characterization of picobirnavirus in environmental water in Thailand. *Clin. Lab.* 2020;66: 85-88. DOI 10.7754/CLIN.LAB.2019.191013.
- Blanco-Picazo P., Fernández-Orth D., Brown-Jaque M., Miró E., Espinal P., Rodríguez-Rubio L., Muniesa M., Navarro F. Unravelling the consequences of the bacteriophages in human samples. *Sci. Rep.* 2020;10:6737. DOI 10.1038/s41598-020-63432-7.
- Boros Á., Polgár B., Pankovics P., Fenyvesi H., Engelmann P., Phan T.G., Delwart E., Reuter G. Multiple divergent picobirnaviruses with functional prokaryotic Shine-Dalgarno ribosome binding sites present in cloacal sample of a diarrheic chicken. *Virology*. 2018;525:62-72. DOI 10.1016/j.virol.2018.09.008.
- Chauhan R., Awasthi S., Narayan R.P. Chapter 11 – Evolution and diversity of plant RNA viruses. In: Rajarshi Kumar Gaur, S.M. Paul Khurana, Pradeep Sharma, Thomas Hohn (Eds.) Plant Virus-Host Interaction: Molecular Approaches and Viral Evolution. Second Edn. Acad. Press, 2021;303-318. DOI 10.1016/B978-0-12-821629-3.00020-8.
- Claverie J.M., Abergel C. Mimivirus and its viroplasm. *Ann. Rev. Genet.* 2009;43:49-66. DOI 10.1146/annurev-genet-102108-134255.
- Conceição-Neto N., Mesquita J.R., Zeller M., Yinda C.K., Álvares F., Roque S., Petrucci-Fonseca F., Godinho R., Heylen E., Van Ranst M., Matthijnsens J. Reassortment among picobirnaviruses found in wolves. *Arch. Virol.* 2016;161:2859-2862. DOI 10.1007/s00705-016-2987-4.
- Dabrowska K., Switala-Jelen K., Opolski A., Weber-Dabrowska B., Gorski A. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J. Appl. Microbiol.* 2005;98:7-13. DOI 10.1111/j.1365-2672.2004.02422.x.
- Dawe A.L., Nuss D.L. Hypovirus molecular biology: from Koch's postulates to host self-recognition genes that restrict virus transmission. *Adv. Virus Res.* 2013;86:109-147.
- Delmas B., Attoui H., Ghosh S., Malik Y.S., Mundt E., Vakharia V.N. ICTV virus taxonomy profile: *Picobirnaviridae*. *J. Gen. Virol.* 2019; 100:133-134. DOI 10.1099/jgv.0.001186.
- Dolja V.V., Koonin E.V. Metagenomics reshapes the concepts of RNA virus evolution by revealing extensive horizontal virus transfer. *Virus Res.* 2018;244:36-52. DOI 10.1016/j.virusres.2017.10.020.
- Duquerroy S., Da Costa B., Henry C., Vigouroux A., Libersou S., Lepault J., Navaza J., Delmas B., Rey F.A. The picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry. *EMBO J.* 2009;28:1655-1665. DOI 10.1038/emboj.2009.109.
- Duraisamy R., Akiana J., Davoust B., Mediannikov O., Michelle C., Robert C., Parra H.-J., Raoult D., Biagini P., Desnues C. Detection of novel RNA viruses from free-living gorillas, Republic of the Congo: genetic diversity of picobirnaviruses. *Virus Genes*. 2018;54: 256-271. DOI 10.1007/s11262-018-1543-6.
- El Omari K., Sutton G., Ravanti J.J., Zhang H., Walter T.S., Grimes J.M., Bamford D.H., Stuart D.I., Mancini E.J. Plate tectonics of virus shell assembly and reorganization in phage $\phi 8$, a distant relative of mammalian reoviruses. *Structure*. 2013;21:1384-1395. DOI 10.1016/j.str.2013.06.017.
- Gallagher C.A., Navarro R., Cruz K., Aung M.S., Ng A., Bajak E., Beierschmitt A., Lawrence M., Dore K.M., Ketzis J., Malik Y.S., Kobayashi N., Ghosh S. Detection of picobirnaviruses in vervet monkeys (*Chlorocebus sabaeus*): molecular characterization of complete genomic segment-2. *Virus Res.* 2017;230:13-18. DOI 10.1016/j.virusres.2016.12.021.
- Ganesh B., Masachessi G., Mladenova Z. Animal picobirnavirus. *VirusDisease*. 2014;25:223-238. DOI 10.1007/s13337-014-0207-y.
- Ghosh S., Malik Y.S. The true host/s of picobirnaviruses. *Front. Vet. Sci.* 2021;7:1-9. DOI 10.3389/fvets.2020.615293.
- Ghosh S., Shiokawa K., Aung M.S., Malik Y.S., Kobayashi N. High detection rates of picobirnaviruses in free roaming rats (*Rattus* spp.): molecular characterization of complete gene segment-2. *Infect. Genet. Evol.* 2018;65:131-135. DOI 10.1016/j.meegid.2018.07.024.
- Gogarten J.P., Townsend J.P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005;3(9):679-687. DOI 10.1038/nrmicro1204.
- Górski A., Kniotek M., Perkowska-Ptasńska A., Mróz A., Przerwa A., Gorczyca W., Dabrowska K., Weber-Dabrowska B., Nowaczyk M. Bacteriophages and transplantation tolerance. *Transplant. Proc.* 2006;38:331-333. DOI 10.1016/j.transproceed.2005.12.073.
- Guajardo-Leiva S., Chnaiderman J., Gaggero A., Díez B. Metagenomic insights into the sewage RNA virosphere of a large city. *Viruses*. 2020;12:1050. DOI 10.3390/v12091050.
- Hillman B.I., Cai G. Chapter Six – The family *Narnaviridae*: simplest of RNA viruses. *Adv. Virus Res.* 2013;86:149-176. DOI 10.1016/B978-0-12-394315-6.00006-4.
- Joycelyn S.J., Ng A., Kleymann A., Malik Y.S., Kobayashi N., Ghosh S. High detection rates and genetic diversity of picobirnaviruses (PBVs) in pigs on St. Kitts Island: identification of a porcine PBV strain closely related to simian and human PBVs. *Infect. Genet. Evol.* 2020;84:104383. DOI 10.1016/j.meegid.2020.104383.
- Kleymann A., Becker A.A.M.J., Malik Y.S., Kobayashi N., Ghosh S. Detection and molecular characterization of picobirnaviruses (PBVs) in the mongoose: identification of a novel PBV using an alternative genetic code. *Viruses*. 2020;12(1):99. DOI 10.3390/v12010099.
- Knox M.A., Gedye K.R., Hayman D.T.S. The challenges of analysing highly diverse picobirnavirus sequence data. *Viruses*. 2018;10:685. DOI 10.3390/v10120685.
- Krishnamurthy S.R., Wang D. Extensive conservation of prokaryotic ribosomal binding sites in known and novel picobirnaviruses. *Virology*. 2018;516:108-114. DOI 10.1016/j.virol.2018.01.006.
- Kumar N., Mascarenhas J.D.A.P., Ghosh S., Masachessi G., da Silva Bandeira R., Nates S.V., Dhama K., Singh R.K., Malik Y.S. Picobirnavirus. In: Malik Y.S., Singh R.K., Dhama K. (Eds.) Animal-Origin Viral Zoonoses. Singapore: Springer, 2020;291-312.
- Kunz A.F., Possatti F., de Freitas J.A., Alfieri A.A., Takiuchi E. High detection rate and genetic diversity of picobirnavirus in a sheep flock in Brazil. *Virus Res.* 2018;255:10-13. DOI 10.1016/j.virusres.2018.06.016.
- Lee C.K., Bent S.J. Uncovering the hidden villain within the human respiratory microbiome. *Diagnosis*. 2014;1:203-212. DOI 10.1515/dx-2014-0039.
- Li L., Giannitti F., Low J., Keyes C., Ullmann L.S., Deng X., Aleman M., Pesavento P.A., Pusterla N., Delwart E. Exploring the virome of diseased horses. *J. Gen. Virol.* 2015;96:2721-2733. DOI 10.1099/vir.0.000199.
- Luo X.L., Lu S., Jin D., Yang J., Wu S.S., Xu J. *Marmota himalayana* in the Qinghai-Tibetan plateau as a special host for bi-segmented and unsegmented picobirnaviruses. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1):20. DOI 10.1038/s41426-018-0020-6.
- Luque D., Gómez-Blanco J., Garriga D., Brilot A.F., González J.M., Havens W.M., Carrascosa J.L., Trus B.L., Verdaguier N., Ghabrial S.A., Castón J.R. Cryo-EM near-atomic structure of a dsRNA fungal virus shows ancient structural motifs preserved in the dsRNA viral lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111:7641-7646. DOI 10.1073/pnas.1404330111.
- Malik Y.S., Kumar N., Sharma K., Dhama K., Shabbir M.Z., Ganesh B., Kobayashi N., Banyai K. Epidemiology, phylogeny, and evolution of emerging enteric picobirnaviruses of animal origin and their relationship to human strains. *Biomed. Res. Int.* 2014;2014:780752. DOI 10.1155/2014/780752.

- Mindich L. Bacteriophage Ø6: a unique virus having a lipid-containing membrane and a genome composed of three dsRNA segments. *Adv. Virus Res.* 1988;35:137-173. DOI 10.1016/S0065-3527(08)60710-1.
- Navarro R., Yibin C., Nair R., Peda A., Aung M.S., Ketzis J., Malik Y.S., Kobayashi N., Ghosh S. Molecular characterization of complete genomic segment-2 of picobirnavirus strains detected in a cat and a dog. *Infect. Genet. Evol.* 2017;54:200-204. DOI 10.1016/j.meegid.2017.07.006.
- Nguyen S., Baker K., Padman B.S., Patwa R., Dunstan R.A., Weston T.A., Schlosser K., Bailey B., Lithgow T., Lazarou M., Luque A., Rohwer F., Blumberg R.S., Barr J.J. Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers. *mBio.* 2017;8:e01874-17. DOI 10.1128/mBio.01874-17.
- Nibert M.L., Tang J., Xie J., Collier A.M., Ghabrial S.A., Baker T.S., Tao Y.J. Chapter Three – 3D structures of fungal partitiviruses. *Adv. Virus Res.* 2013;86:59-85. DOI 10.1016/B978-0-12-394315-6.00003-9.
- Omotajo D., Tate T., Cho H., Choudhary M. Distribution and diversity of ribosome binding sites in prokaryotic genomes. *BMC Genomics.* 2015;16(1):604. DOI 10.1186/s12864-015-1808-6.
- Poranen M.M., Bamford D.H. Assembly of large icosahedral double-stranded RNA viruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;726:379-402. DOI 10.1007/978-1-4614-0980-9_17.
- Ramesh A., Bailey E.S., Ahyon V., Langelier C., Phelps M., Neff N., Sit R., Tato C., DeRisi J.L., Greer A.G., Gray G.C. Metagenomic characterization of swine slurry in a North American swine farm operation. *Sci. Rep.* 2021;11:16994. DOI 10.1038/s41598-021-95804-y.
- Reed C.A., Langlais C., Wang I.-N., Young R. A₂ expression and assembly regulates lysis in Qβ infections. *Microbiology.* 2013;159:507-514. DOI 10.1099/mic.0.064790-0.
- Rosen B.I., Fang Z.-Y., Glass R.I., Monroe S.S. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. *Virology.* 2000;277(2):316-329. DOI 10.1006/viro.2000.0594.
- Sekelja M., Berget I., Naes T., Rudi K. Unveiling an abundant core microbiota in the human adult colon by a phylogroup-independent searching approach. *ISME J.* 2011;5(3):519-531. DOI 10.1038/ismej.2010.129.
- Shackelton L.A., Holmes E.C. The role of alternative genetic codes in viral evolution and emergence. *J. Theor. Biol.* 2008;254:128-134. DOI 10.1016/j.jtbi.2008.05.024.
- Shahi S., Eusebio-Cope A., Kondo H., Hillman B.I., Suzuki N. Investigation of host range of and host defense against a mitochondrially replicating mitovirus. *J. Virol.* 2019;93:e01503-18. DOI 10.1128/JVI.01503.
- Shi M., Lin X.D., Tian J.H., Chen L.J., Chen X., Li C.X., Qin X.C., Li J., Cao J.P., Eden J.S., Buchmann J., Wang W., Xu J., Holmes E.C., Zhang Y.-Z. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature.* 2016;540:539-543. DOI 10.1038/nature20167.
- Smits S.L., Schapendonk C.M., van Beek J., Vennema H., Schürch A.C., Schipper D., Bodewes R., Haagmans B.L., Osterhaus A.D., Koopmans M.P. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 2014;20(7):1218-1222. DOI 10.3201/eid2007.140190.
- Thannesberger J., Hellinger H.J., Klymiuk I., Kastner M.T., Rieder F.J.J., Schneider M., Fister S., Lion T., Kosulin K., Laengle J., Bergmann M., Rattei T., Steininger C. Viruses comprise an extensive pool of mobile genetic elements in eukaryote cell cultures and human clinical samples. *FASEB J.* 2017;31:1987-2000. DOI 10.1096/fj.201601168R.
- Vainio E.J., Chiba S., Ghabrial S.A., Maiss E., Roossinck M., Sabanadzovic S., Suzuki N., Xie J., Nibert M. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Partitiviridae*. *J. Gen. Virol.* 2018;99(1):17-18. DOI 10.1099/jgv.0.000985.
- Wolf Y.I., Kazlauskas D., Iranzo J., Lucia-Sanz A., Kuhn J.H., Krupovic M., Dolja V.V., Koonin E.V. Origins and evolution of the global RNA virome. *mBio.* 2018;9:e02329-18. DOI 10.1128/mBio.02329-18.
- Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Teng J.L.L., Tsang A.K.L., Joseph M., Wong E.Y.M., Tang Y., Sivakumar S., Bai R., Wernery U., Yuen K.-Y. Metagenomic analysis of viromes of dromedary camel fecal samples reveals large number and high diversity of circoviruses and picobirnaviruses. *Virology.* 2014;471-473:117-125. DOI 10.1016/j.virol.2014.09.020.
- Woo P.C.Y., Teng J.L.L., Bai R., Tang Y., Wong A.Y.P., Li K.S.M., Lam C.S.F., Fan R.Y.Y., Lau S.K.P., Yuen K.-Y. Novel picobirnaviruses in respiratory and alimentary tracts of cattle and monkeys with large intra- and inter-host diversity. *Viruses.* 2019;11:574. DOI 10.3390/v11060574.
- Yinda C.K., Ghogomu S.M., Conceição-Neto N., Beller L., Deboutte W., Vanhulle E., Maes P., Van Ranst M., Matthijnsens J. Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus H, bastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. *Virus Evol.* 2018;4:vey008. DOI 10.1093/ve/vey008.
- Yinda C.K., Vanhulle E., Conceição-Neto N., Beller L., Deboutte W., Shi C., Ghogomu S.M., Maes P., Ranst M.V., Matthijnsens J. Gut virome analysis of Cameroonians reveals high diversity of enteric viruses, including potential interspecies transmitted viruses. *mSphere.* 2019;4(1):e00585-18. DOI 10.1128/mSphere.00585-18.

ORCID ID

A.Yu. Kashnikov orcid.org/0000-0003-1033-7347
N.V. Epifanova orcid.org/0000-0001-7679-8029
N.A. Novikova orcid.org/0000-0002-3710-6648

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.05.2022. После доработки 21.07.2022. Принята к публикации 22.07.2022.