

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Lina  
AITMANAITĖ

Virusų suderinamumo tyrimai  
*Saccharomyces cerevisiae* LA ir M  
virusinėse sistemose

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai  
Biochemija (N 004)

---

VILNIUS 2021

Daktaro disertacija rengta 2015 – 2021 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute Biochemijos ir molekulinės biologijos katedroje.

Disertacija ginama eksternu.

**Mokslinis konsultantas:**

**prof. dr. Saulius Serva** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004)

Gynimo taryba:

**Pirmininkas – prof. dr. Rolandas Meškys** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Nariai:

**doc. dr. Eglė Lastauskienė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

**dr. Aušra Ražanskienė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

**prof. dr. Vytautė Starkuvienė-Erfle** (Heidelbergo universitetas, Vokietija, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

**dr. Živilė Strazdaitė-Žielienė** (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2021 m. liepos mėn. 2 d. 11 val. Gyvybės mokslų centro (Vilniaus universitetas) R401 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7 LT-10257 Vilnius, Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus Universiteto bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Lina  
AITMANAITĖ

# Virus compatibility in *Saccharomyces cerevisiae* LA and M virus systems

**DOCTORAL DISSERTATION**

Life sciences,  
Biochemistry (N 004)

---

VILNIUS 2021

This dissertation was written between 2015 and 2021 at the Institute of Biosciences, Vilnius University.

The dissertation is defended on an external basis.

**Academic consultant:**

**Prof. Dr. Saulius Serva** (Vilnius University, life sciences, biochemistry – N 004).

Dissertation Defence Panel:

**Chairman – Prof. Dr. Rolandas Meškys** (Vilnius University, life sciences, biochemistry – N 004).

Members:

**Assoc. Prof. Dr. Eglė Lastauskienė** (Vilnius University, life sciences, biology – N 010);

**dr. Aušra Ražanskienė** (Vilnius University, life sciences, biochemistry – N 004);

**prof. dr. Vytautė Starkuvienė-Erfle** (Heidelberg University, Germany, life sciences, biochemistry – N 004);

**dr. Živilė Strazdaitė-Žielienė** (Nature Research Centre, life sciences, biochemistry – N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 11:00 on 2 July 2021 in R401 auditorium of the Life Sciences Center (Vilnius University).

Address: Saulėtekio av. 7, LT-10257 Vilnius, Lithuania.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: [www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	8
ĮVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	13
<b>1.1 <i>Saccharomyces</i> genties mielių <i>Totiviridae</i> šeimos virusai ....</b>	<b>13</b>
1.1.1 LA ir M virusų įvairovė .....	16
1.1.2 LA ir M virusų genomai bei jų koduojami baltymai .....	18
1.1.3 LA viruso viriono struktūra .....	23
<b>1.2 <i>Totiviridae</i> šeimos virusų palaikymas mielėse .....</b>	<b>26</b>
1.2.1 LA ir M virusų replikacija .....	26
1.2.2 Ląstelės-šeimininkės baltymai dalyvaujantys LA ir M virusų palaikyme.....	27
<b>1.3 LA ir M virusų įtaka ląstelės-šeimininkės molekuliniams procesams .....</b>	<b>32</b>
1.3.1 LA ir M virusų įtaka ląstelės-šeimininkės genų raiškai.....	32
1.3.2 M virusų toksinų įtaka <i>S. cerevisiae</i> genų raiškai.....	33
<b>1.4 LA ir M virusų eliminacijos fenomenas .....</b>	<b>35</b>
1.4.1 Defektyvių interferuojančių RNR elementų sukeliama eliminacija.....	35
1.4.2. Nefunkcionalių kapsidinių baltymų sukeliama eliminacija .....	36
1.4.3 Laukinio tipo virusinių baltymų sukeliama eliminacija.....	38
1.4.4 Virusų tarpusavio konkurencijos sąlygota eliminacija .....	41
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	42
<b>2.1 Medžiagos .....</b>	<b>42</b>
2.1.1 Reagentai.....	42
2.1.2 Fermentai ir molekuliniai dydžio standartai .....	43
2.1.3 Komerčiniai rinkiniai .....	43
2.1.4 Mitybinės terpės.....	43
2.1.5 Mikroorganizmų kamieniai.....	44
2.1.6 Oligonukleotidai .....	45
2.1.7 Plazmidės .....	47

2.1.8 Tirpalai .....	53
<b>2.2 Metodai .....</b>	<b>53</b>
2.2.1 Suminės RNR gryninimas iš mielių ląstelių .....	53
2.2.2 dgRNR išsodinimas iš suminės RNR mėginių .....	54
2.2.3 Mielių kompetentinių ląstelių ruošimas .....	54
2.2.4. Mielių transformacija .....	54
2.2.5 <i>E. coli</i> kompetentinių ląstelių ruošimas .....	55
2.2.6 <i>E. coli</i> transformacija .....	55
2.2.7 Plazmidinės DNR gryninimas iš <i>E. coli</i> ląstelių .....	56
2.2.8 Mielių žudymo fenotipo analizė .....	56
2.2.9 M1 viruso eliminacija iš K7 (LA-1, M1) kamieno .....	57
2.2.10 Densitometrinė analizė .....	57
2.2.11 Statistinė analizė .....	57
2.2.12 LA virusinių baltymų variabilių sričių identifikavimas ...	58
<b>3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1. LA virusų trumpintų kapsidinių baltymų sintezės įtaka LA ir M virusų palaikymui mielėse .....</b>	<b>59</b>
3.1.1 LA-1 viruso trumpinto kapsidinio baltymo sintezės įtaka LA ir M virusų palaikymui mielėse .....	60
3.1.2 LA-2, LA-lus ir LA-28 virusų trumpintų kapsidinių baltymų sintezės įtaka natyvių LA ir M virusų palaikymui mielėse .....	63
3.1.3 Universalus natyvių LA ir M virusų eliminacijos metodas	64
<b>3.2 Rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sąveika su natyviomis LA ir M virusų sistemomis .....</b>	<b>65</b>
3.2.1. Skirtingų LA virusų Gag ir GagPol baltymų sintezės įtaka LA ir M virusų palaikymui mielėse .....	66
3.2.2. M viruso reikšmė LA virusų replikacijos interferencijoje	72
<b>3.3 LA virusų sąveikos su LA ir M virusų sistemomis specifiskumo determinantės .....</b>	<b>74</b>
3.3.1 LA-1 viruso Gag ir GagPol chimerinių baltymų raiškos vektorių kūrimas .....	75

3.3.2. Gag baltymo N-galinio (R1) variabilaus regiono reikšmė LA ir M virusų sąveikai .....	77
3.3.3 GagPol baltymo Pol domeno N-galinio (R2) variabilaus regiono reikšmė LA ir M virusų sąveikai .....	79
3.3.4 GagPol baltymo Pol domeno C-galinio (R3) variabilaus regiono reikšmė LA ir M virusų sąveikai .....	81
3.3.5 Chimerinių GagPol baltymų, su pakeista Pol seka, sintezės įtaka LA ir M virusų palaikymui mielėse .....	84
<b>3.4 Rezultatų apibendrinimas.....</b>	<b>89</b>
IŠVADOS.....	93
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	94
SANTRAUKA .....	110
PADĖKA.....	152
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS .....	153
MOKSLINIAI STRAIPSNIAI.....	155

## SANTRUMPOS

(+) vgRNR – koduojanti virusinė viengrandinė RNR

a.r. – aminorūgštis

AT-PGR – atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandinė reakcija

bp – nukleotidinių bazių pora

dgRNR – dvigrandinė RNR

DMSO – dimetilsulfoksidai

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

G418 – geneticinas, aminoglikozidų grupės antibiotikas

iRNR – informacinė RNR

kb – kilobazė (nukleotidais)

kDa – kilodaltonas

LB – Luria-Bertani bakterijų mitybinė terpė

m<sup>7</sup>GMP – 7-metilgvanozino 5`-monofosfatas

MD – metileno mėliu papildyta mielių mitybinė terpė

NDS – natrio dodecilsulfatas

nt – nukleotidas

o.v. – santykiniai optinio tankio vienetai

REazė – restrikcijos endonukleazė

RpRp – nuo RNR priklausoma RNR polimerazė

vgRNR – viengrandinė RNR

wt – laukinis tipas (angl. *wild type*)

YPD – mielių ekstrakto peptono dekstrozės mielių mitybinė terpė



## ĮVADAS

*Saccharomyces cerevisiae* mielės itin plačiai pritaikomos pramonėje bei fundamentiniuose tyrimuose. Mielės – patrauklus eukariotinis modelinis organizmas, nes yra lengvai kultivuojamos laboratorinėmis sąlygomis bei turi sąlyginai kompaktišką genomą. *S. cerevisiae* genomas yra pirmasis pilnai nuskaitytas eukariotinis genomas, o net 40 % iš anotuotų genų turi atitikmenis žmogaus genome (Alves-Rodrigues *et al.*, 2006). Atlikti mokslinius tyrimus, naudojant *S. cerevisiae* mieles, patogu dėl sukurtų pavienių genų iškritų, padidintos raiškos, būtinųjų genų ir dihibridinių sistemų bibliotekų bei įvairių duomenų bazių. Mielių tyrimai suteikė svarbių žinių apie eukariotinės ląstelės ciklo reguliaciją, informacinės RNR transkripcijos, translacijos ir degradacijos mechanizmus, prionų biologiją, baltymų sekrecijos kelius, autofagiją ir ląstelės senėjimo procesus (Alves-Rodrigues *et al.*, 2006; Wickner *et al.*, 2015; He *et al.*, 2018; Nielsen, 2019). *S. cerevisiae* taikomos ir virusų biologijos tyrimuose, nes jose galima replikuoti įvairių augalų bei gyvūnų virusų genetinę medžiagą (Nagy, 2008). Vykdam tyrimus mielėse nustatytos patogeninių virusų, tokių kaip ŽIV, Epšteino-Baro, Hepatito C pavienių baltymų funkcijos (Blanco *et al.*, 2003; Demarini *et al.*, 2003; Kapoor *et al.*, 2005). Taip pat identifikuoti ląstelės-šeimininkės faktoriai, svarbūs įvairių augalų (Nagy, 2008; Nawaz-ul-rehman *et al.*, 2013), vabzdžių (Huang *et al.*, 2020) ir žinduolių (Naito *et al.*, 2007; Stellberger *et al.*, 2010) virusų palaikymui ląstelėje. Molekuliniai mielių transpozoninių elementų tyrimai suteikė žinių apie retrovirusų funkcionavimo mechanizmus (Risler *et al.*, 2012; Rausch *et al.*, 2017).

*Saccharomyces cerevisiae* ir kitose *Saccharomyces* genties mielėse aptinkami įvairūs RNR virusai (Drinneberg *et al.*, 2011; Wickner *et al.*, 2013). Itin didelio susidomėjimo yra sulaukę *Totiviridae* šeimai priskiriami LA ir nuo jų priklausomi satelitiniai M virusai. Šių virusų sistema suteikia mielėms šeimininkėms žudymo fenotipą. M virusai koduoja toksiną, kuris yra išskiriamas į aplinką ir lemia aplink esančių jautrių mielių žūtį (Wickner *et al.*, 2013). Šiuo metu yra žinoma visa eilė skirtingų LA ir M virusų. Įprastai gamtoje tam tikro tipo M virusas palaikomas jam specifiško LA viruso (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). Ar toks specifinių virusinių sistemų išsivystymas yra kryptingas, ar atsitiktinis procesas, nėra žinoma. Tiek LA virusų tarpusavio sąveikos, tiek ir sąveikos su M virusais nėra galutinai atskleistos, o jų determinantės nežinomos. Šių sąveikų atskleidimas

yra svarbus ne tik biocidinio mielių fenotipo supratimui, bet ir bendriems virusų ontogenezės mechanizmams išaiškinti.

### **Darbo tikslas**

Ištirti *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielėse aptinkamų *Totiviridae* šeimos LA ir M virusų tarpusavio sąveikų specifiškumą ir nustatyti galimas specifiškumo determinantes.

### **Darbo uždaviniai**

1. Įvertinti LA virusų rekombinantinių trumpintų kapsidinių baltymų sintezės įtaką įvairių endogeninių LA ir M virusų palaikymui mielėse.
2. Apibūdinti LA-1, LA-lus, LA-28 virusų rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sudaromų virusinių dalelių sąveikas su endogeniniais LA ir M virusais.
3. Ištirti LA virusų baltymų variabilų sekų reikšmę rekombinantinių baltymų sąveikai su endogeniniais LA ir M virusais.

### **Darbo naujumas ir reikšmė**

LA ir M virusai yra paplitę ne tik tarp laukinio tipo *S. cerevisiae*, bet ir tarp klinikinių, industrinių ir laboratorinių mielių kamienų (Pieczynska *et al.*, 2013). Nors LA ir M virusų palaikymas nesukelia akivaizdžių fenotipinių ląstelės-šeimininkės pokyčių, yra žinoma, jog bendras ląstelės genų raiškos profilis pakinta (McBride *et al.*, 2013; Lukša *et al.*, 2017). Vykdamas įvairių molekulinį procesų tyrimus mielėse, svarbu atsižvelgti ir į natyvių virusų palaikymo mielėse įtaką ląstelei-šeimininkei. Virusų įtaką savo šeimininkui galima efektyviai įvertinti atliekant didelės našos tyrimus (pvz.: transkriptomika, proteomika ir pan.). Įprastai LA ir M virusų eliminacija iš ląstelės yra vykdoma į mielių mitybinę terpę pridėjant cikloheksimido, 5-fluoruracilo ar mieles veikiant karščiu (Fink ir Styles, 1972; Tipper ir Schmitt, 1991; Weinstein *et al.*, 1993). Visi šie metodai yra citotoksiški, tad jų taikymas ruošiant tiriamuosius mėginius –omikos eksperimentams gali lemti klaidingus tyrimų rezultatus. Dėl šio priežasties buvo svarbu sukurti mielių ląstelėms nekenksmingą LA ir M virusų eliminacijos metodą. Šiame darbe nustatyta, jog visi tirti trumpinti LA virusų kapsidiniai baltymai, nepriklausomai nuo LA virusų rūšies, eliminuoja

natyvius LA ir M virusus iš mielių ląstelių. Šis universalus LA ir M virusų eliminavimo iš ląstelės metodas buvo pritaikytas ruošiant transkriptominiuose ir proteominiuose tyrimuose naudotus mielių kamienus (Lukša *et al.*, 2017; Konovalovas, 2018). Duomenys, gauti tiriant įvairių LA virusų trumpintų kapsidinių baltymų sintezės įtaką natyviems virusams, leidžia daryti prielaidą, jog skirtingų LA virusų kapsidiniai baltymai gali sąveikauti tarpusavyje nepriklausomai nuo virusų rūšies.

Šiuo metu yra žinomi keli LA ir M virusų kombinacijų variantai (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). Kadangi gamtoje M virusai aptinkami tik su sau specifiniu LA virusu, buvo iškelta virusų koevoliucijos hipotezė. Manoma, jog LA virusai dėl koevoliucijos su savo palydovu tame pačiame šeimininke yra išvystę specifiškumą konkrečiam M virusui (Rodriguez-Cousino ir Esteban, 2017). Nepaisant to, LA virusų specifiškumą savo palydovui užtikrinantys mechanizmai nėra žinomi. Taip pat nėra žinoma, kaip LA virusai sąveikauja tarpusavyje. Šiame darbe sistemiškai įvertintos skirtingų LA virusų kapsidinių baltymų sąveikos su visoms iki šiol žinomomis *S. cerevisiae* aptinkamomis LA ir M virusų sistemomis, bei viena *S. paradoxus* LA ir M virusų sistema. Tyrimams pritaikyta virusų tarpusavio sąveikų įvertinimo metodika, kuri suteikė galimybę eksperimentus atlikti homogeniškoje aplinkoje. Nustatytos LA-1, LA-lus ir LA-28 virusų koduojamų baltymų sąveikos su įvairiais endogeniniais LA ir M virusais specifiškumas, kuris gali būti susietas su rekombinantinių baltymų gebėjimu atpažinti konkrečius M virusus ir taip užtikrinti jų genomo replikaciją. Parodyta, jog satelitinių M virusų palaikymas ląstelėje yra svarbus veiksnys rekombinantinių virusinių baltymų ir natyvių LA virusų sąveikoje. Remiantis šiais duomenimis galime teigti, kad LA ir M virusai funkcionuoja kaip itin glaudžiai susijusi sistema. Taip pat tyrimo rezultatų analizė parodė, jog skirtingi LA virusai geba palaikyti įvairius M palydovus, dėl to galima iškelti prielaidą, jog konkrečių LA ir M virusų sistemų egzistavimas yra atsitiktinis evoliucinis įvykis.

Kaip jau minėta, galimos LA virusų sąveikų specifiškumo priežastys nėra žinomos. Skirtingų LA virusų baltymų sekos yra labai panašios (sekų identiškumas siekia 87–97 %), tačiau sekų palyginiuose taip pat aptinkamos itin variabilios sritys (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). Šiame darbe iškelta prielaida, jog variabilios baltyminės sritys galėtų būti svarbios specifinėje LA virusų tarpusavio ar LA ir M virusų sąveikoje. Pirmą kartą sukurti chimerinius LA-1 viruso baltymus koduojantys raiškos vektoriai,

kuriuose variabilios virusinių baltymų sekos buvo pakeistos atitinkamomis kitų LA virusų sekomis. Įvertinta tokių chimerinių baltymų sintezės įtaka natyvių virusų palaikymui mielėse, taip įgaunant žinių apie LA koduojamų baltymų variabilių sričių svarbą baltymų funkcijų palaikymui bei specifinės sąveikos su satelitiniais virusais susidarymui. Gauti duomenys reikšmingai papildo žinias apie LA koduojamų baltymų savitų regionų funkcinį vaidmenį specifinėje virusų tarpusavio sąveikoje.

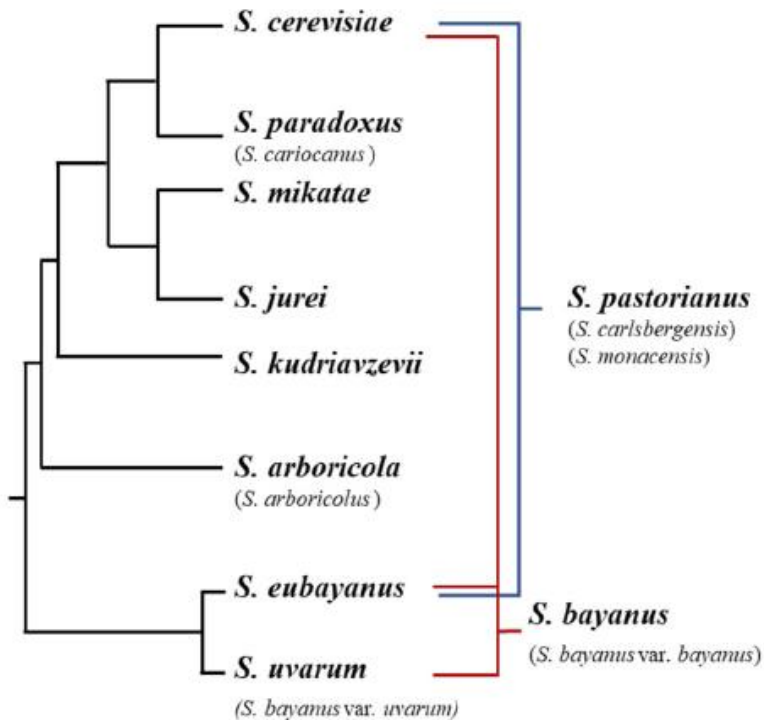
### **Ginamieji teiginiai**

1. LA virusų trumpintų kapsidinių baltymų sintezės sukeliama natyvių LA virusų eliminacija iš ląstelės yra nespecifiškas procesas.
2. Skirtingų LA virusų Gag ir GagPol baltymų sudaromos virusinės dalelės pasižymi dalinai specifine sąveika su LA ir M virusais.
3. Skirtingų LA virusų baltymų sudaromos virusinės dalelės geba atpažinti endogeninius M virusus ir juos padauginti, galimai dėl to yra eliminuojami natyvūs LA virusai.
4. LA virusų Gag ir GagPol baltymų variabilios sritys pasižymi skirtingu reikšmingumu LA virusų tarpusavio ar LA ir M virusų sąveikai bei virionų funkcionalumo palaikymui.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 *Saccharomyces* genties mielių *Totiviridae* šeimos virusai

*Saccharomyces* mielių genčiai, kurių bendras protėvis egzistavo prieš 10–20 milijonų metų, šiuo metu priskiriamos 8 rūšys (**1.1 pav.**) (Alsammar ir Delneri, 2020). Anksčiausiai šioje grupėje atsiskyrė *S. uvarum* ir *S. eubayanus* rūšys, tuo tarpu *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* rūšys atsiskyrė sąlyginai neseniai. Be natūraliai gamtoje aptinkamų, egzistuoja ir hibridinės industrijoje naudojamos rūšys: *S. pastorianus* ir *S. bayanus*. *Saccharomyces* genties mielės funkciškai yra labai įvairios. *S. cerevisiae* naudojamos laboratoriniuose tyrimuose, bei alaus, vyno, kepinių gamyboje, *S. uvarum* naudojamos sidro ir vyno gamyboje. Hibridinės rūšys taip pat pritaikomos įvairiuose fermentaciniuose procesuose (Borneman ir Pretorius, 2015). Tuo tarpu *S. paradoxus* rūšies mielės žmogaus ūkinėje veikloje įprastai nėra pritaikomos ir yra išskirtinai aptinkamos gamtinėse buveinėse, dažniausiai šiauriniame pusrutulyje ir yra siejamos su ažuolais (Carter *et al.*, 2009). Priklausomai nuo geografinės vietovės *S. paradoxus* gali būti aptinkamos



**1.1 pav.** *Saccharomyces* genties rūšių filogenetinis medis (Alsammar and Delneri, 2020).

kartu su *S. cerevisiae* mielėmis (Sniegowski *et al.*, 2002; Sampaio ir Goncalves, 2008). Nepaisant skirtingo šios genties mielių rūšių paplitimo ir funkcionalumo, jos visos yra patrauklūs modeliniai organizmai evoliucinės ir funkcinės genomikos tyrimams, nes turi sąlyginai nedidelį genomą, nesudėtingai auginamos laboratorinėmis sąlygomis bei greitai dalijasi (Borneman ir Pretorius, 2015).

Daugiau nei prieš pusę amžiaus aptikta, jog kai kurios *S. cerevisiae* mielės turi žudymo fenotipą, t.y. geba eliminuoti aplink esančias jautrias mielių ląsteles (Bevan ir Makower, 1963). Jautrių mielių žūtis sukeliama dėl mielės žudikės į aplinką išskiriamo toksino, toksiną produkuojančios mielės jam yra atsparios. Pagal minėtą aspektą buvo išskirti keli mielių fenotipai: žudymo, žudymo/jautrumo (išskiria toksiną, bet yra jautri kito tipo toksinams), jautrumo ir neutralumo (neiškiria toksino, bet yra atspari aplinkoje esančiam toksinui) (Rogers ir Bevan, 1978). Taip pat nustatyta, jog žudymo fenotipui pasireikšti būtinos specifinės aplinkos sąlygos (tinkama temperatūra ir pH) (Bevan ir Makower, 1963). Tiriant mielių žudikių fenomeną pirmiausia jis buvo susietas su dgRNR LA ir M virusais (Bevan *et al.*, 1973). Tad 70-tieji metai gali būti laikomi mielių virusologijos pradžia. Šiuo metu yra žinoma, jog žudymo fenotipą gali sukelti ne tik dgRNR virusai, bet ir linijinėse DNR plazmidėse ar mielių genome koduojami toksinai (Gunge *et al.*, 1981; Goto *et al.*, 1990; Starmer *et al.*, 1992; Satwika *et al.*, 2012; Boynton, 2019). Toksinus koduojantys virusai aptinkami ne tik *S. cerevisiae*, bet ir kitose *Saccharomyces* genties mielėse (*S. uvarum*, *S. paradoxus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. bayanus*) bei kitoms gentims priskiriamų mielių rūšyse (pvz.: *Ustilago mayadis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Torulaspora delbrueckii*) (Park *et al.*, 1994; Schmitt ir Neuhausen, 1994; Ivannikova *et al.*, 2007; Drinnenberg *et al.*, 2011; Pieczynska *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2015; Ramirez *et al.*, 2015; Rowley *et al.*, 2016).

DgRNR virusų sistema mielėms suteikianti žudymo fenotipą, sudaryta iš LA ir satelitinio M virusų (Wickner *et al.*, 2013). Šie virusai yra priskiriami plačiai augaluose, pirmuonyse bei grybuose paplitusiai *Totiviridae* virusų šeimai. Kaip ir dauguma kitų grybų karalystėje paplitusių virusų, LA ir M virusai neturi užląstelinės fazės ir plinta ląstelėms dalijantis, ar mielių lytinio dauginimosi metu (Rowley, 2017). Šie virusai neturi išorinio apvalkalo, kuris įprastai yra būdingas panašioms, užląstelinę fazę turintiems, virusams (Wickner *et al.*, 2013). LA ir M virusai ląstelėje

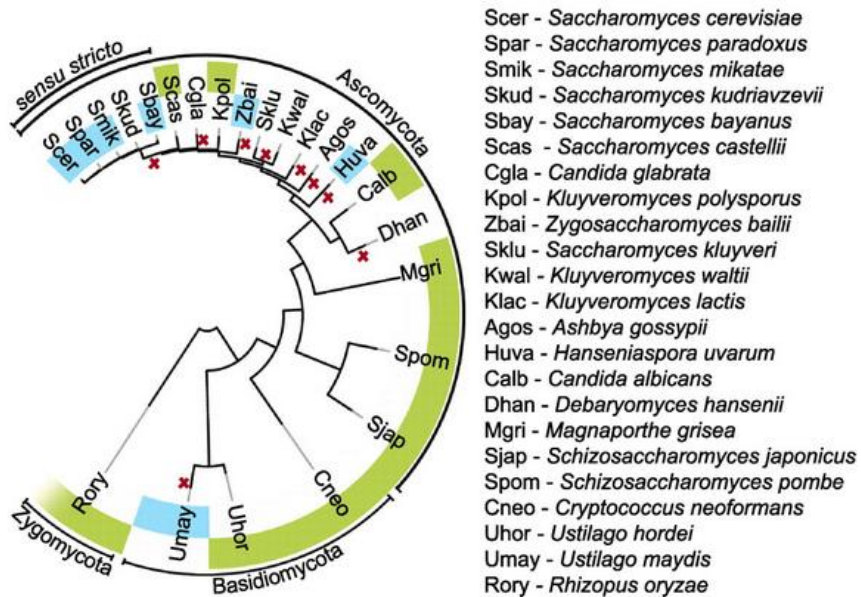
šeimininkėje yra palaikomi stabiliai ir nesukelia jokio akivaizdaus fenotipinio poveikio savo šeimininkui (Ghabrial, 1998), kas yra būdinga ir kitiems grybų karalystėje paplitusiems virusams (Ghabrial *et al.*, 2015).

LA viruso dgRNR genomus koduoja kapsidinį baltymą Gag, bei dėl ribosominio skaitymo rėmelio poslinkio susidarantį sulietinį nuo RNR priklausomos RNR polimerazės (RpRp) funkciją atliekantį baltymą GagPol (Hopper *et al.*, 1977; Fujimura ir Wickner, 1988; Icho ir Wickner, 1989). LA virusiniai baltymai yra būtini LA ir M virusų replikacijai ląstelėje vykti (Bostian *et al.*, 1980; El-sherbeini *et al.*, 1984; Schmitt ir Tipper, 1992). M satelitinio viruso dgRNR genomus koduoja preprotoksiną. Preprotoksinas yra proteoliškai skaldomas iki toksino, kuris yra sekretuojamas į aplinką, kur sukelia aplink esančių jautrių mielių žūti. M virusų koduojami preprotoksinais suteikia ląstelei šeimininkei imunitetą susidaranti toksinai (Schmitt ir Breinig, 2006). Tiriant preprotoksino brendimą ir sekrecijos kelią buvo įgauta daug naudingų žinių apie eukariotinių baltymų potransliacinį brendimą sekreciniame kelyje (Ghabrial *et al.*, 2015).

Mielėse, be LA virusų taip pat aptinkami *Totiviridae* virusų šeimai priskiriami L-BC virusai. Šių virusų genomo sandara bei replikacija panaši į LA virusų: dgRNR genomus koduoja kapsidinį baltymą Gag ir sulietinį RpRp funkciją atliekantį baltymą GagPol (Park *et al.*, 1996). Nėra aptikta, jog L-BC užtikrintų satelitinių virusų genomo replikaciją ar būtų reikšmingi žudymo fenotipo pasireiškimui. LA ir L-BC virusai gali būti aptinkami toje pačioje mielės ląstelėje, tačiau L-BC kiekis ląstelėje yra kur kas mažesnis, įprastai sudarantis apie 10–20 % ląstelėje aptinkamo LA viruso kiekio (Field *et al.*, 1982; Sommer ir Wickner, 1982). Kaip ir kiti grybų virusai, L-BC neturi ekstraląstelinės fazės ir plinta mielių ląstelėms dalijantis (Wickner *et al.*, 2013).

Įdomu, jog tiriant mielių RNR interferencijos mechanizmus nustatyta, kad *Saccharomyces* mielėse RNR interferencijos sistema yra išnykusi (Drinnenberg *et al.*, 2011). Įprastai RNR interferencijos mechanizmai naudojami apsaugai nuo virusinių infekcijų, genų raiškos reguliacijai, transpozoninių elementų slopinimui, heterochromatino formavimui ir DNR eliminacijai (Ketting, 2011). Į *S. cerevisiae* mieles įterpus artimos *S. castellii* (dabar priskiriama *Naumovozyma* genčiai) rūšies RNR interferencijos baltymus, ši sistema atstatoma, todėl prarandami LA-1 ir M1 virusai (Drinnenberg *et al.*, 2009; Drinnenberg *et al.*, 2011). Tuo tarpu

L-BC virusų palaikymas ląstelėje dėl interferencijos procesų nėra sutrikdomas. Interferencijos atstatymas taip pat nepakeičia įprasto *S. cerevisiae* mielių augimo ar genų raiškos profilio. Išsamesnės analizės metu nustatyta, jog grybų rūšys, kuriuose aptinkami dgRNR LA virusai neturi RNR interferenciją užtikrinančių baltymų (**1.2 pav.**). Manoma, jog minėtos sistemos praradimas leido *Saccharomyces* genties mielėms palaikyti LA ir M virusus taip įgyjant evoliucinį pranašumą prieš kitas, RNR interferenciją išlaikiusias, rūšis (Drinnenberg *et al.*, 2011).



**1.2 pav.** RNR interferencijos nesuderinamumas su dgRNR virusais. Filogenetinis įvairių grybų rūšių medis, kuriame žalia spalva žymimos rūšys išlaikiusios RNR interferenciją, mėlyna – rūšys, kuriuose aptinkami dgRNR virusai (*S. kudriavzevii* aptinkamas dgRNR virusas nepažymėtas (Rowley *et al.*, 2016)), raudonu kryželiu – RNR interferenciją praradusios rūšys ar šių rūšių bendras protėvis (Drinnenberg *et al.*, 2011).

### 1.1.1 LA ir M virusų įvairovė

Pirmieji *S. cerevisiae* mielėse identifikuoti dgRNR virusai, kurių geno sekos buvo nuskaitytos, yra LA-1 ir M1 (Icho ir Wickner, 1989). Per pastarąjį dešimtmetį nustatyti nauji *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* rūšyse paplitę LA virusų variantai: LA-2, LA-lus, LA-28, LA-66, LA-21, LA-45, LA-62, LA-74 (Konovalovas *et al.*, 2016; Rodriguez-Cousino *et al.*, 2013; Rodriguez-Cousino ir Esteban *et al.*, 2017; Vepštaitė-Monstavičė *et al.*,



2018). LA virusų genominės sekos tarpusavyje yra itin panašios, skirtumai svyruoja tarp 10–26 % (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018).

Šiuo metu yra žinomi keli M satelitiniai virusai. *S. cerevisiae* kamienuose aptinkami: M1, M2, Mlus, M28 virusai; *S. paradoxus*: M1, M28, M66, M21, M45, M74, M62 (Schmitt ir Breinig, 2006; Chang *et al.*, 2015; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017; Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). Įdomu, jog M1 ir M28 satelitiniai virusai aptinkami tiek *S. cerevisiae*, tiek *S. paradoxus* rūšyse (Pieczynska *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2015). Kaip jau buvo minėta, šios rūšys gamtoje gali būti aptinkamos kartu, tad galėtų tarpusavyje kryžmintis ir perduoti virusus (Sniegowski *et al.*, 2002; Sampaio ir Goncalves, 2008). Tiesa, nustatyta, jog *S. paradoxus* mielės labai retai kryžminasi su kitos rūšies mielėmis, o susidariusios sporos dažnai yra negyvybingos (Borneman ir Pretorius, 2015). Tų pačių satelitinių virusų paplitimas skirtingose mielių rūšyse yra ginčytinas, kadangi skirtingos tyrėjų grupės pateikia nesutampantių rezultatus (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017). M virusų genomų koduojami baltymai tarpusavyje skiriasi, tačiau M1, M2 ir Mlus virusų toksinų baltyminės sekos yra homologiškos keliems *S. cerevisiae* ar kitų giminingų mielių baltymams. Aptinkama homologija galėtų reikšti, jog M virusai yra kilę iš ląstelės-šeimininkės iRNR molekulių, kurios įgavo virusines sekas būtinai RNR pakavimui į virionus ir replikacijai vykti (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013). Satelitiniai virusai išskiriami į atskiras grupes pagal koduojamų toksinų molekulinę charakteristiką, žudymo fenotipą ir imuniškumą specifika bei genetines determinantes. Visi M satelitiniai virusai yra panašūs savo genomine sandara, bei jų koduojamų toksinų sintezės, brendimo ir sekrecijos molekuliniais mechanizmais (El-sahn ir Shehata, 2014).

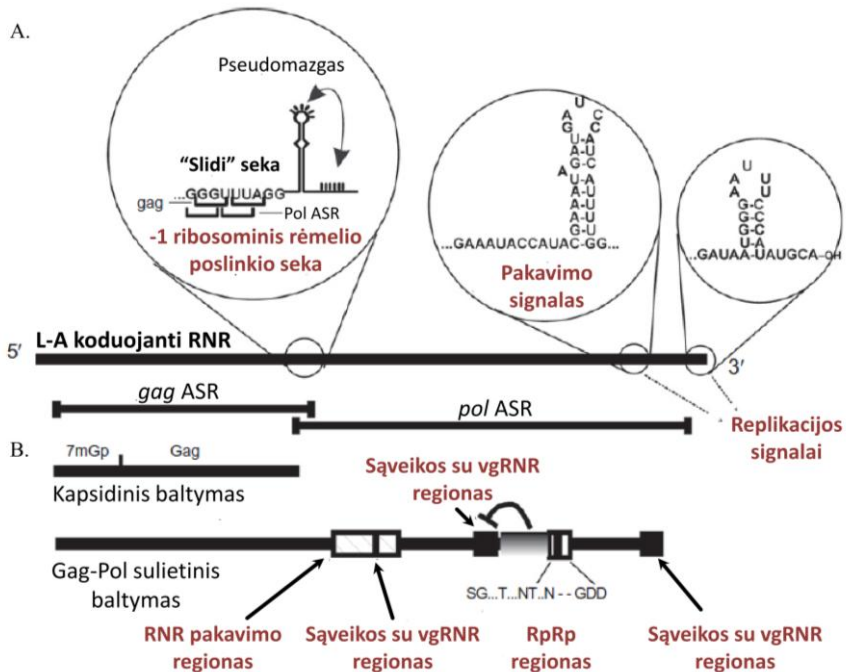
Gamtoje LA virusas dažniausiai yra aptinkamas tik su konkrečiu, jam būdingu satelitiniu virusu (**1.1 lentelė**). Iškelta hipotezė, jog stebimas LA virusų specifiškumas savo palydovams išsivystė dėl LA ir M virusų koevoliucijos bendrame šeimininke (Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017). Šiai hipotezei prieštarauja tyrimai, kurių metu nustatyta, jog LA-1 palaiko M28, LA-2 palaiko M1, o LA-lus virusas palaiko M1 ir M2 satelitus (Hannig *et al.*, 1985; Schmitt ir Tipper, 1990; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013; Lukša *et al.*, 2017).

**1.1 lentelė.** *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielėse aptinkami LA ir M virusų variantai.

LA	M	Rūšis
LA-1	M1	<i>S. cerevisiae</i> ( <i>S. paradoxus</i> )
LA-2	M2	<i>S. cerevisiae</i>
LA-lus	M2, Mlus	<i>S. cerevisiae</i>
LA-28	M28	<i>S. cerevisiae</i> ( <i>S. paradoxus</i> )
LA-66	M66	<i>S. paradoxus</i>
LA-21	M21	<i>S. paradoxus</i>
LA-45	M45	<i>S. paradoxus</i>
LA-62	M62	<i>S. paradoxus</i>
LA-74	M74	<i>S. paradoxus</i>

### 1.1.2 LA ir M virusų genomai bei jų koduojami baltymai

LA genomus yra sudarytas iš viensegmentės 4,6 kb dydžio dgRNR. Jame aptinkami du 114 nt persidengiantys atviro skaitymo rėmeliai koduojantys kapsidinį baltymą Gag (76 kDa) bei sulietinį baltymą GagPol (180 kDa) (Fujimura ir Wickner, 1987; Icho ir Wickner, 1989). Išskiriamos kelios funkcinės LA geno sritys (**1.3 pav.**). Sulietinio GagPol baltymo translacija vyksta dėl -1 ribosominio rėmelio poslinkio, toks sulietinių baltymų translacijos mechanizmas taip pat aptinkamas retrovirusuose ir kituose dgRNR ar koduojančios (+) vgRNR virusuose. Rėmelio poslinkiui įvykti ties atvirų skaitymo rėmelių persidengimo vieta būtina „slidi“ seka bei pseudomazgo antrinė struktūra. Vykstant translacijai ribosoma trumpam sustoja prieš pseudomazgo struktūrą, dėl to vyksta ribosomos poslinkis atgal per 1 nukleotidą ir susintetinamas sulietinis baltymas. Iš visų virusinės RNR translacijos įvykių rėmelio poslinkis įvyksta tik 2 % atvejų (Dinman *et al.*, 1991). Toks Gag ir GagPol baltymų santykis ląstelėje yra būtinas efektyviam virusų palaikymui (Dinman ir Wickner, 1992). Visų šiuo metu žinomų LA virusų rėmelio poslinkio sekos yra konservatyvios. Kitos konservatyvios funkcinės geno sritys – pakavimo į virusines daleles ir replikacijos signalai (Rodriguez-Cousino ir Esteban, 2017; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017; Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). Pakavimo į virusines daleles signalas yra išsidėstęs 400 nt atstumu nuo koduojančios RNR 3' galo ir yra sudarytas iš stiebo-kilpos antrinės struktūros turinčios funkciškai svarbią adenino iškyšą stiebo 5' puseje (Esteban *et al.*, 1988; Fujimura *et al.*, 1990). Su pakavimo signalu persidengia vidinis replikacijos signalas, kuriam taip pat būdinga stiebo-kilpos antrinė struktūra (Esteban *et al.*, 1989).

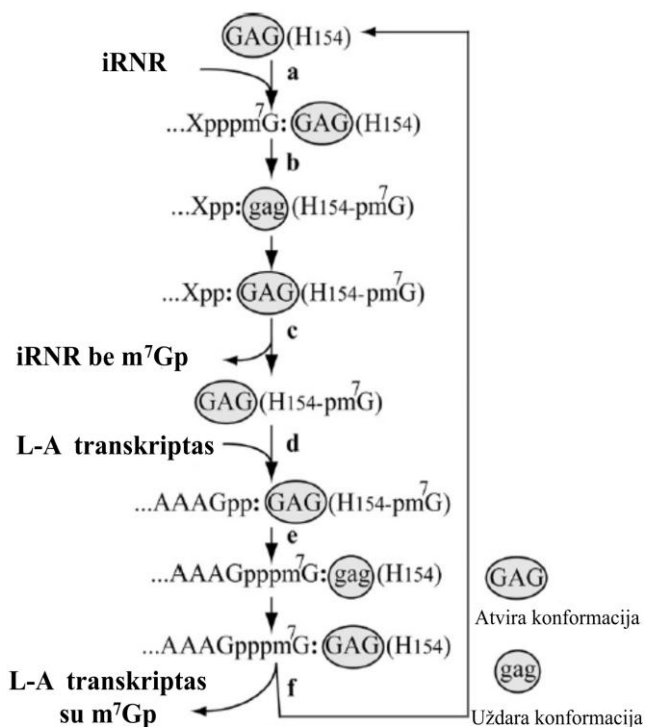


**1.3 pav.** LA-1 viruso geno ir jo koduojamų baltymų sandara ir funkciniai regionai (Wickner *et al.*, 2013).

LA koduojami baltymai yra būtini LA ir M virusų replikacijai ląstelėje. Kapsidinis baltymas Gag ne tik formuoja virusines kapsides, bet ir turi kepurės nugvelbimo (angl. *cap snatching*) aktyvumą (Blanc *et al.*, 1992; Blanc *et al.*, 1994). Kepurės nugvelbimo metu Gag baltymas nuskelia  $m^7Gp$  liekaną nuo ląstelių iRNR ir perkelią ją ant virusinio transkripto 5` gale esančio difosforilinto guanidino (Fujimura ir Esteban, 2010, 2011; Fujimura *et al.*, 2012; Fujimura ir Esteban, 2019). Tokia virusinių transkriptų modifikacija yra būtina efektyviai virusinių baltymų sintezei. Neseniai buvo nustatyta, jog kepurės nugvelbimas gali būti grįžtamas procesas. Nepaisant to,  $m^7Gp$  liekana perkeliama išimtinai ant difosforilinto guanidino, o didžiojoje daugumoje ląstelių iRNR už kepurės struktūros išsidėsto adeninas (Fujimura ir Esteban, 2019). Kepurės nugvelbimo procesą galima suskirstyti į kelis žingsnius: pirmiausia  $m^7Gp$  struktūra nuskeliama nuo ląstelių iRNR; tarp konservatyvios Gag His-154 aminorūgšties šoninės grupės ir  $m^7Gp$  susidaro kovalentiniai ryšiai;  $m^7Gp$  perkeliamas ant virusinio transkripto (Blanc *et al.*, 1992; Blanc *et al.*, 1994) (**1.4 pav.**).

Rekombinantiniai Gag baltymai turintys mutaciją ties His-154 a.r. geba palaikyti M1 viruso replikaciją, tačiau jo koduojamo toksino sintezė sutrinka (Blanc *et al.*, 1994). Už kepurės nugvelbimą atsakingas Gag baltymo regionas aktyvus tiek Gag, tiek ir GagPol baltymuose (Fujimura ir Esteban, 2019).

GagPol baltymo Pol domeno nuo RNR priklausomą RNR polimerazinį (RpRp) aktyvumą užtikrina konservatyvus polimerazinis domenas, kuris taip pat aptinkamas ir kitų koduojančios (+) vgRNR ar dgRNR virusų RpRp polimerazėse (Icho ir Wickner *et al.*, 1989). Pol baltymo polimerazinio domeno mutagenezės tyrimai parodė, jog labiausiai konservatyvūs regionai yra būtini M1 satelito palaikymui. Pakeitus



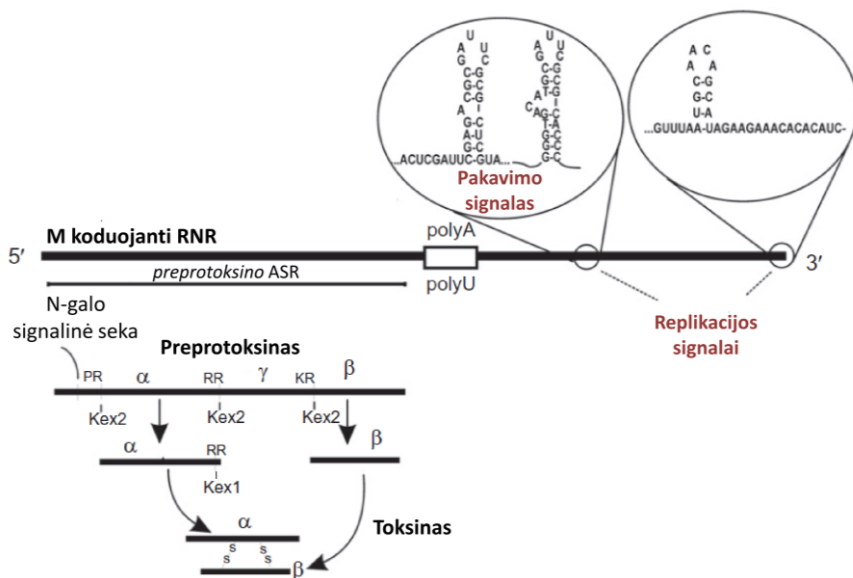
**1.4 pav.** Hipotetinė LA viruso kepurės nugvelbimo reakcijos schema. Atviros konformacijos būsenoje LA viriono Gag baltymas prisijungia ląstelinę iRNR (a), Gag perėjimas į uždarą konformaciją lemia m<sup>7</sup>Gp perkėlimą ant Gag His-154 a.r. (b), atviroje konformacijoje Gag paleidžia ląstelinę iRNR (c), prisijungus LA transkriptui (d) Gag pereina į uždarą konformaciją ir perneša m<sup>7</sup>Gp ant virusinės RNR (e), Gag pereina į atvirą konformaciją ir paleidžia LA transkriptą su kepurės struktūra (f). Atvira Gag konformacija žymima didžiosiomis raidėmis (GAG), uždara – mažosiomis (gag) (Fujimura ir Esteban, 2012).

konservatyvias aminorūgščių liekanas alanino aminorūgščių liekanomis polimerazinis baltymo aktyvumas sutrinka, tačiau konservatyvias sekas pakeitus reoviruso ar Sindbis viruso atitinkamomis sekomis polimerazinis aktyvumas išlieka (Ribas ir Wickner, 1992). Be polimerazinio domeno išskiriami trys funkciniai su vgRNR sąveikaujantys domenai: N-galinis, centrinis ir C-galinis (**1.3 pav.**).

Tarp 67–213 Pol baltymo aminorūgščių išsidėstęs vgRNR pakavimo į virusines daleles regionas, kuriame aptinkamas N-galinis sąveikos su RNR domenas (172–190 a.r.). Aplink N-galinį sąveikos su vgRNR domeną išsidėsčiusios baltyminės sekos galėtų būti svarbios specifiskai sąveikai su vgRNR. Manoma, jog būtent šis domenas sąveikauja su vgRNR pakavimo signalu (Fujimura *et al.*, 1992; Ribas *et al.*, 1994a). Centrinis sąveikos su vgRNR domenas (374–432 a.r.) išsiskiria, tuo, jog jo funkcionalumas aptinkamas tik esant dalinei Pol baltymo C-galo (506–546 a.r.) iškritai. Šis domenas išsidėstęs šalia konservatyvaus polimerazinio domeno, tad jo funkcijos siejamos su polimeraziniu baltymo aktyvumu. Centrinis domenas svarbus M1 viruso palaikymui ląstelėje, tačiau įtakos virusinių dalelių susirinkimui ar virusinės koduojančios (+) vgRNR pakavimui į šias daleles neturi (Ribas *et al.*, 1994b). Pol baltymo C-gale (770–819 a.r.) išsidėstęs trečiasis sąveikos su vgRNR domenas. Šis domenas būtinas M1 viruso palaikymui ląstelėje, tačiau nėra reikalingas vgRNR pakavimui į virionus. C-galinis sąveikos su RNR domenas gali būti svarbus virusinės RNR replikacijos ir/ar transkripcijos procesuose (Ribas *et al.*, 1994a).

Skirtingų M virusų genomo dydis varijuoja tarp 1,5–2,4 kb. Nepaisant to visiems žinomiems M virusams būdinga panaši genomo struktūra (Bevan *et al.*, 1973; Hannig ir Leibowitz, 1985; Schmitt ir Tipper, 1990; Schmitt ir Breinig, 2002; Rodríguez-Cousino *et al.*, 2011; Rodríguez-Cousino *et al.*, 2017). Koduojančios grandinės 5` gale yra stiebo-kilpos antrinė struktūra, kuri galimai susijusi su virusinės RNR transliacija (Magliani *et al.*, 1997). Toliau išsidėstęs atviro skaitymo rėmelis koduojantis preprotoksiną. Už preprotoksiną koduojančios sekos, aptinkama vidinė, adeniniais praturtinta, seka. 3` gale yra ilga nekoduojanti sritis, kurioje išsidėsčiusios stiebo-kilpos antrinės struktūros reikalingos satelitinio viruso genomo replikacijai ir pakavimui į susidarantį virionus (**1.5 pav.**) (Schmitt ir Tipper, 1995; Schmitt ir Breinig, 2006; Rodríguez-Cousino *et al.*, 2011; Rodríguez-Cousino *et al.*, 2017).

M virusai koduoja savitus, skirtingais veikimo mechanizmais pasižyminčius toksinus. M1 ir M2 virusų koduojami toksinai (K1 ir K2) lemia mielių ląstelių membranos pažeidimą, tuo tarpu M28 viruso koduojamas toksinas (K28) slopina DNR replikaciją taip sustabdydamas ląstelės ciklą (Busseytt ir Kung, 1990; Schmitt *et al.*, 1996; Lukša *et al.*, 2015; Orentaitė *et al.*, 2016). Nepaisant to, visų žinomų toksinų brendimo procesai yra panašūs. Šiuo metu daugiausia žinoma apie K1 ir K28 toksinų brendimo ir veikimo molekulinis mechanizmus. Preprotoksinas sudarytas iš keleto regionų. N-galinė signalinė seka (preregionas) lemia baltymo patekimą į endoplazminį tinklą. Už N-signalinės sekos, išsidėstę preregionas bei  $\gamma$  seka atskirti  $\alpha$  ir  $\beta$  baltymo subvienetai (**1.5 pav.**). Toksino funkciją atlieka  $\alpha$  subvienetas,  $\beta$  subvienetas svarbus sąveikai su taikinine ląstele, o  $\gamma$  subvienetas galimai atlieka vidinio šaperono funkciją (Bostian *et al.*, 1984; Riffer *et al.*, 2002). Endoplazminiame tinkle, signalinė N-galinė seka nukerpama, tuomet vyksta numanomas  $\gamma$  subvieneto glikozilimas, tarp toksino  $\alpha$  ir  $\beta$  subvienetų susiformuoja disulfidinis ryšys (Bostian *et al.*, 1984; Riffer *et al.*, 2002; Gier *et al.*, 2019a). Tolimesnis toksino brendimas vyksta Goldžio komplekse. Kex1p ir Kex2p peptidazės proteolitiškai modifikuoja baltymą, susidaro aktyvus heterodimerinis toksinas. Subrendęs toksinis baltymas yra sekretuojamas į aplinką (Bostian *et al.*, 1984; Riffer *et al.*, 2002).



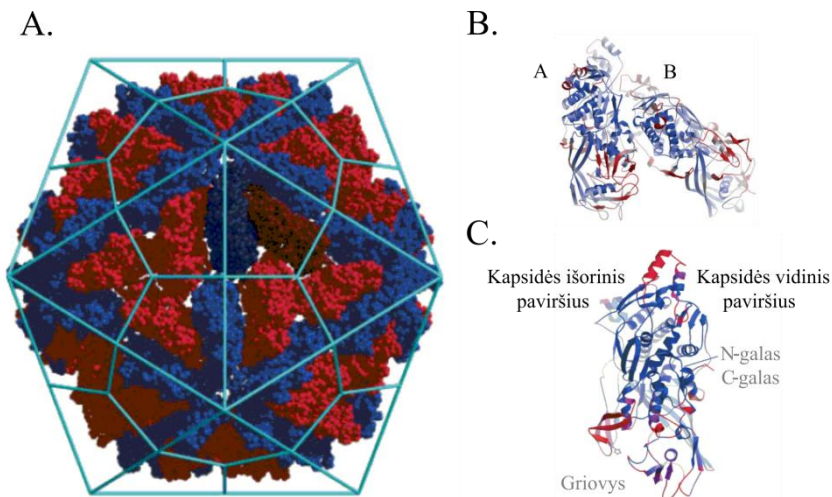
**1.5 pav.** M1 viruso geno ir jo koduojamo preprotoksino sandara ir funkciniai regionai (Wickner *et al.*, 2013)

Molekuliniai mechanizmai suteikiantys imunitetą toksinui nėra pilnai žinomi. Atsparumas K28 toksinui siejamas su toksino prekursoriaus ir internalizuoto toksino sąveika ląstelės citoplazmoje, dėl to vyksta susidariusio kompleksu proteosominis degradavimas (Breinig *et al.*, 2006). Imunitetas K1 toksinui galimai susidaro dėl preprotoksino  $\alpha$  subvieneto sąveikos su internalizuotu toksinu (Gier *et al.*, 2017; Gier *et al.*, 2019a). Proregionas ir  $\gamma$  domenai svarbūs K1 toksiną produkuojančių ląstelių apsaugai nuo ląstelės viduje sintetinio toksino (Gier *et al.*, 2020a).

### 1.1.3 LA viruso viriono struktūra

LA viriono struktūra buvo nustatyta tridimensinės krioelektroninės mikroskopijos (16 Å raiška) ir rengenostuktūrinės analizės metodais (3,4 Å raiška) (Caston *et al.*, 1997; Naitow *et al.*, 2002). LA virionai yra ikosaedrinės 400 Å skersmens T1 simetrijos struktūros, sudarytos iš 60 asimetrinių Gag baltymo dimerų, kapsidės storis – 46 Å. (Terceros ir Wickner, 1992; Caston *et al.*, 1997; Naitow *et al.*, 2002) (**1.6 pav. A**). Tokia struktūra būdinga dgRNR reovirusų ir cistovirusų vidiniam baltyminiam apvalkalui ir gali būti susijusi su unikalios šių virusų replikacija ir transkripcija (Luque *et al.*, 2018). Viriono struktūroje aptinkami 1–2 sulietiniai GagPol baltymai, kurioje Pol baltymas išsidėsto viriono viduje ir atlieka virusinės RNR transkripciją bei replikaciją (Wickner, 1996; Ribas ir Wickner, 1998). Struktūrizuota Gag baltymo dalis tarp 1–651 aminorūgščių yra sudaryta iš dviejų  $\alpha$  spiralių ir kelių  $\beta$  klosčių, likusios C-galo 29 aminorūgštys yra nestruktūrizuotos ir išsidėsto kapsidės viduje. Kiekvienas Gag monomeras gali turėti vieną iš dviejų paviršiaus regionų struktūra besiskiriančių, konformacijų, kurios atitinkamai vadinamos A ir B subvienetais (**1.6 pav. B**). Penki A subvienetai išsidėsto aplink 5-to laipsnio simetrijos ašį, sudarydami 18 Å skersmens ertmės, pro kurias į vidų gali patekti nukleotidai ir į ląstelės citozolį išeiti virusinės RNR transkriptai (Naitow *et al.*, 2002). Be ertmių ties 5-to laipsnio ašimi, virionuose aptinkamos įvairaus dydžio ertmės ties 3-čio laipsnio ašimi ir tarp dimerų jungčių (Tang *et al.*, 2005). B subvienetai išsidėsto tarp A subvienetų, taip kartu sudarydami dekamerą (Naitow *et al.*, 2002).

Kepurės nugvelbimui vykti būtina Gag baltymo His-154 aminorūgšties liekana yra kapsidės paviršiuje esančiame griovyje (Naitow *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2005) (**1.6 pav. C**). His-154 aminorūgšties liekana išsidėsčiusi ant viršutinėje griovio dalyje esančios kilpos (144–163 a.r.) viršūnės. Tang su grupe aprašė galimą Gag baltymo vykdomą kepurės

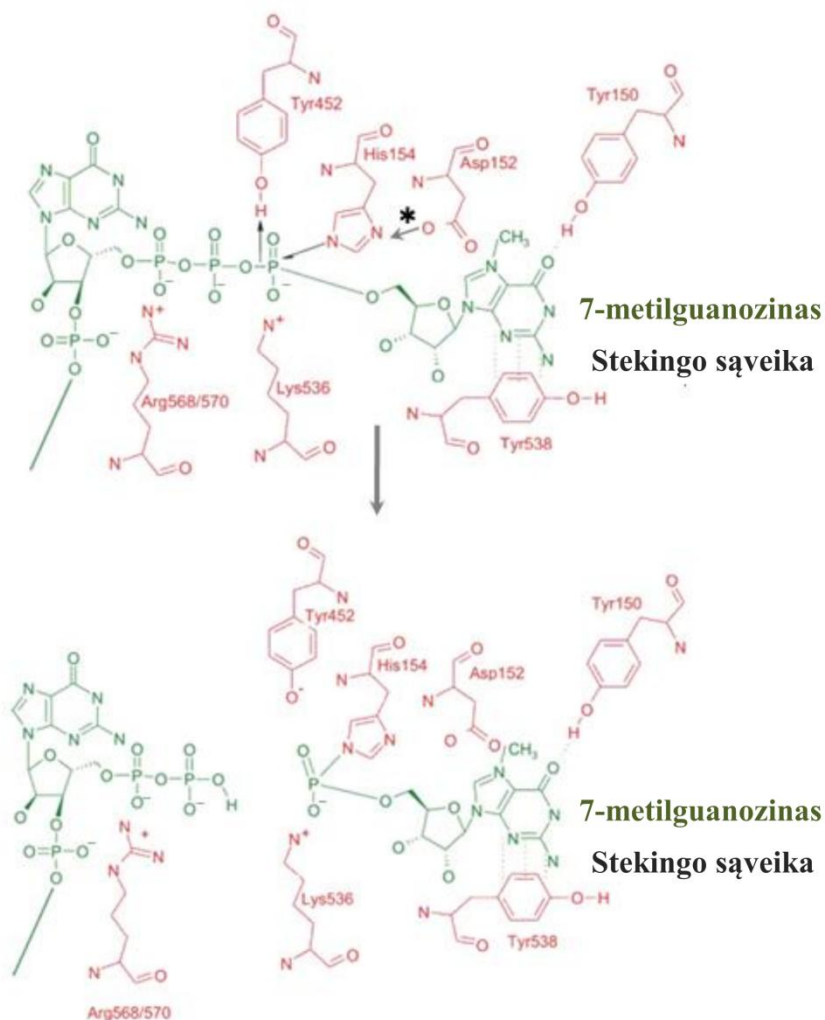


**1.6 pav.** LA viruso kapsidės struktūra. **A.** Bendra LA viruso kapsidės struktūra, mėlyna spalva pažymėti Gag baltymo A subvienetai, raudona – B subvienetai. Linijos žymi ikosaedro simetrijos ašis. **B.** Gag baltymo asimetrinis dimeras sudarytas iš A ir B subvienetų. Spalvinis žymėjimas pereinantis iš mėlyno į raudoną spalvą nurodo kylantį B-faktoriaus įvertį (didesnis B-faktoriaus įvertis reprezentuoja paslankesnę struktūrą). Raudona spalva žymi mobilias baltymo sritis. **C.** Gag monomero struktūra. Spalvinis žymėjimas pereinantis iš mėlynos į raudoną nurodo dviejų subvienetų struktūrinius pokyčius, kur raudona žymi didžiausią pokytį (Tang *et al.*, 2005).

nugvelbimo reakcijos modelį. Prisijungus  $m^7GDP$  griovio struktūra pereina į uždarą konformaciją. Griovyje šalia prisijungusio  $m^7GDP$  išsidėsčiusios Tyr-150, Asp-152, Tyr-452 ir Tyr-538 aminorūgščių liekanos, kurios yra būtinos sėkmingai kepurės nugvelbimo reakcijai ir galimai dalyvauja kepurės atpažinimo procese. Remiantis potencialiu kepurės nugvelbimo modeliu, Tyr-538 per stekingo sąveiką sąveikauja su kepurės struktūros guanozinu, o Tyr-150 jungiasi su guanozinu per hidroksigrupę susidarant vandeniliniams ryšiams. Tyr-452 veikia kaip protonų donoras, perduodamas protoną prie deguonies prisijungusiam fosfatui aktyviajame centre. Tokiu būdu palengvinama His-154 aminorūgšties azoto vykdoma nukleofilinė ataka ir tarp  $m^7GMP$  bei His-154 susidaro kovalentinis ryšys (**1.7 pav.**). Manoma, jog su kapsidėje esančiu groviu sąveikauja ląstelinės iRNR. Griovio struktūroje aplink aktyvųjį kepurės nugvelbimo centrą išsidėsčiusios teigiamą krūvį turinčios lizino ir arginino aminorūgščių liekanos, kurios galimai sąveikauja su iRNR fosfatų grupėmis (Tang *et al.*, 2005).

Kepurės nugvelbimą vykdančioje guanililtransferazėje aptinkama į Gag baltymo formuojamą griovį panaši struktūra, galinti įgauti atvirą ar uždarą konformaciją (Chu *et al.*, 2011). Aplink guanililtransferazės





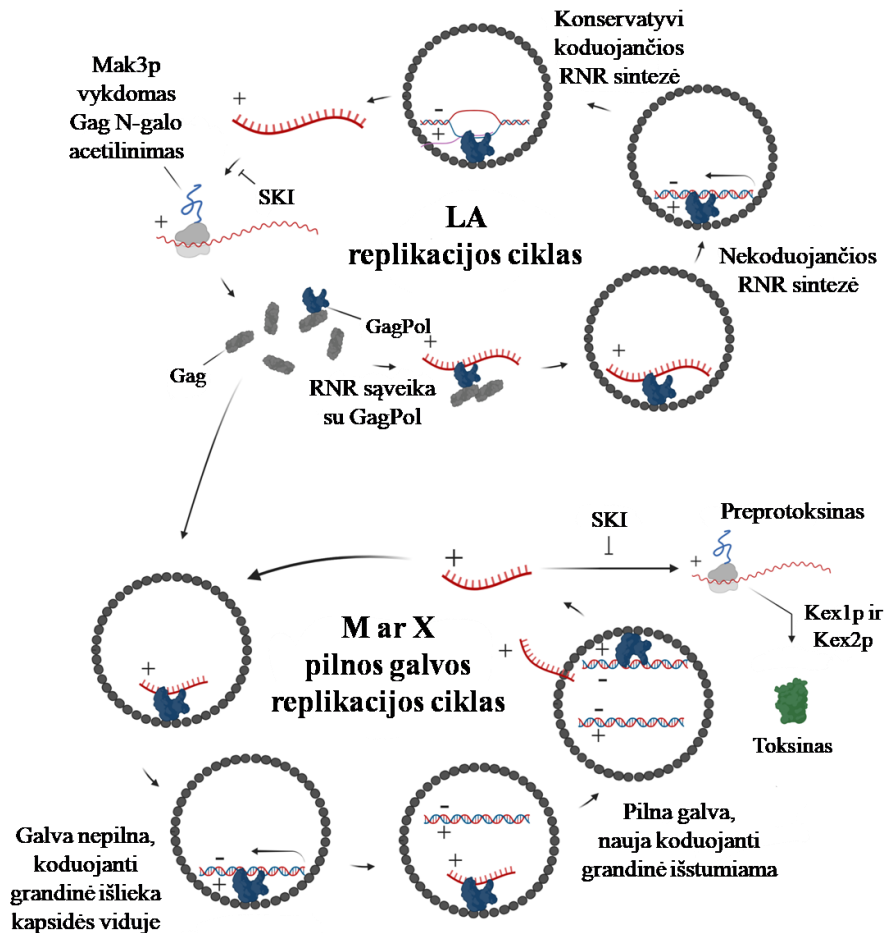
**1.7 pav.** Kepurės nugvelbimo reakcijos modelis. Žalia spalva – iRNR, raudona – aminorūgščių liekanos. Tyr-538 ir Tyr-150 sąveikauja su  $m^7$ GDP, Tyr-452 hidroksilo grupės sąveika su fosfato grupe, paruošia fosfatą His-154 atliekamai nukleofilinei atakai, o lizino ir arginino aminorūgščių liekanos sąveikauja su iRNR; \* - galimas krūvio perkėlimo kompleksas (Tang *et al.*, 2005).

griovį išsidėstę struktūriniai elementai, primena Gag baltymo struktūrinius elementus (Naitow *et al.*, 2002). Guanililtransferazė sąveikauja su GTP ir perneša Gp ant difosforilintų 5` PolIII RNR polimerazės transkriptų. LA virusų vykdomas kepurės perkėlimo mechanizmas panašus į guanililtransferazės vykdomą reakciją. Šių baltymų atliekamų reakcijų panašumas galėtų būti lemtas konvergentinės evoliucijos (Wickner *et al.*, 2013).

## 1.2 Totiviridae šeimos virusų palaikymas mielėse

### 1.2.1 LA ir M virusų replikacija

LA virusų genome koduojama nuo RNR priklausanti RNR polimerazė atlieka abiejų LA ir M virusų genomo replikaciją bei transkripciją (Wickner, 1993) (1.8 pav.). LA ir M virusų replikacijos mechanizmai yra identiški, tačiau jų genomų replikacija ir transkripcija vyksta atskiruose virionuose (Bostian *et al.*, 1980).



1.8 pav. LA ir M virusų replikacijos ciklas (pagal Wickner *et al.*, 2013).

LA virusų transkripcijos procesas yra konservatyvus, t.y. motininės dgRNR grandinės lieka susijungusios (Fujimura *et al.*, 1986). Transkripcijos metu nuo LA dgRNR genomo susidarę nauji koduojantys transkriptai

ištumiami į ląstelės citozolį, kur jie yra panaudojami transliacijoje ir/arba pakuojami į naujai susidarančius virionus (Wickner, 1993). Koduojančioje grandinėje esančio pakavimo signalo sąveika su GagPol baltymo pakavimo regionu lemia (+) vgRNR molekulės pakavimą į naujai susidarančias kapsides. Manoma, jog būtent GagPol sąveika su koduojančia (+) vgRNR inicijuoja naujų virusinių dalelių susidarymą. Į virionus supakuoti transkriptai panaudojami nekoduojančios grandinės sintezei ir virusinio dgRNR genomo atstatymui (Fujimura ir Wickner, 1987; Wickner, 1988). Replikacijos metu polimerazė pirmiausia sąveikauja su vidiniu replikacijos signalu, taip priartėdama prie 3' gale esančio replikacijos signalo, nuo kurio prasideda nekoduojančios RNR sintezė (Esteba *et al.*, 1989; Fujimuras and Wickner, 1992).

M virusų replikacijai būdingas „pilnos galvos“ modelis. Šis replikacijos modelis buvo pasiūlytas tiriant virusines daleles pakuojančias delecinių LA variantą vadinamą X arba M1 viruso genomą. Pagal „pilnos galvos“ modelį po koduojančios RNR grandinės supakavimo, vyksta jos replikacija, kol virusinė dalelė užsipildo dgRNR. Tuomet nauji RNR transkriptai per kapsidėje esančias ertmes išstumiami į ląstelės citoplazmą. M1 viruso atveju, kuomet virione randama viena dgRNR molekulė, naujai susintetinta koduojanti virusinė RNR yra išlaikoma kapsidėje. Jeigu viriono struktūroje randamos dvi dgRNR molekulės, naujai susintetintos koduojančios grandinės iš viriono yra išstumiamos (Esteban ir Wickner, 1986; Esteban *et al.*, 1988). Žinoma, jog naujai susidarančios kapsidės pakuoja tik vieną koduojančią RNR molekulę (Fujimura *et al.*, 1990) (**1.8 pav.**).

### **1.2.2 Ląstelės-šeimininkės baltymai dalyvaujantys LA ir M virusų palaikyme**

Virusų genomai lyginant su ląstelės-šeimininkės genomu yra itin maži ir įprastai koduoja ribotą kiekį baltymų. Dėl šios priežasties virusų replikacijai ląstelėje vykti dažnai reikalingi ląstelės-šeimininkės baltymai. Vienas iš pavyzdžių yra bakteriofagas Qb, kurio replikacinis kompleksas susideda ne tik iš virusinės RpRp, bet ir šeimininko translacijos elongacijos faktorių Ts ir T (Blumenthal ir Carmichael, 1979). LA ir M virusų palaikymas mielėse, virusinių baltymų sintezė ir genomo replikacija taip pat priklauso nuo ląstelės-šeimininkės koduojamų baltymų (Wickner, 1996).

Viena iš LA ir M virusų palaikymui mielėse būtinų šeimininko genų grupių yra *MAK* genai (angl. *MAK - maintenance of the killer phenotype*). LA ir M virusinės kapsidės susiformavimui būtinas Gag baltymo N-galo acetilinimas, kurį atlieka N-acetiltransferazinis kompleksas sudarytas iš *MAK3*, *MAK10* ir *MAK31* genų koduojamų baltymų (Sommer ir Wickner, 1982; Terceros ir Wickner, 1992; Rigaut *et al.*, 1999). GagPol baltymo Gag dalies acetilinimas virusinių dalelių susidarymui nėra būtinas (Ribas *et al.*, 1998). Mak3p yra katalitinis komplekso subvienetas (Terceros ir Wickner, 1992), jis atpažįsta paskutines keturias N-galines Gag baltymo aminorūgščių liekanas ir acetilina pirmąją metionino liekaną (Carlos *et al.*, 1993). Mak3p mutaciją turinčios mielės praranda dgRNR virusus. Taip pat yra žinoma, jog Mak3p acetilina bent tris mitochondrinius baltymus, o tai yra siejama su šią mutaciją turinčių mielių negebėjimu augti ant nefermentuojamų anglies šaltinių (Tercero *et al.*, 1992). Mak10p taip pat svarbus mielių augimui ant nefermentuojamų anglies šaltinių bei lemia virusinių dalelių su dgRNR stabilizavimą (Lee ir Wickner, 1992). Mak3p, Mak10p ir Mak31p homologai randami įvairiuose organizmuose, taip pat ir žmoguje (Starheim *et al.*, 2009).

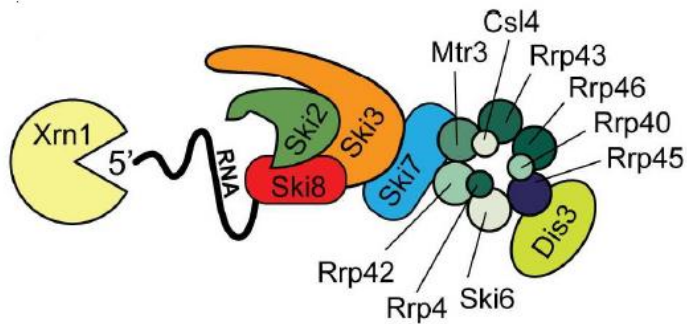
Bent 30 *MAK* genų koduojamų baltymų yra svarbūs satelitinį M virusų palaikymui mielėse. Jų mutacijos sukelia satelitinį virusų eliminaciją bei LA genomo kopijų sumažėjimą (Sommer ir Wickner, 1982; Schmitt ir Tipper, 1992). Nepaisant to, kai M1 virusas palaikomas nuo raiškos vektoriaus sintetinių rekombinantinių LA baltymų, dalies *MAK* baltymų funkcionalumas satelitinio viruso palaikymui nebereikalingas (Wickner *et al.*, 1991). Toks pats efektas stebimas SKI baltymų (aptariami žemiau) mutacijų atveju (Toh-e and Wickner, 1980). Dauguma *MAK* genų koduoja 60S ribosominių subvienetų susirinkimui svarbius ribosominius baltymus. Mutacijos *MAK* genuose lemia laisvų ribosominių 60S subvienetų sumažėjimą arba silpnesnę ribosominių subvienetų tarpusavio asociaciją (Wickner, 1995; Edskes *et al.*, 1998). Literatūroje aptariama potenciali satelitinį virusų eliminacijos dėl *MAK* genų mutacijų priežastis. Ląstelių iRNR poliA uodegos gali būti svarbios ribosominių subvienetų sąveikoje (Searfoss ir Dever, 2001; Kahvejian *et al.*, 2005). Nustatyta, jog Mak21-1p mutaciją turinčiose mielėse LA transkriptų transliacija yra apie 2 kartus sumažėjusi (Edskes *et al.*, 1998). Kadangi virusiniai transkriptai poliA uodegų neturi, pakitus laisvų 60S ribosominių subvienetų kiekiui ląstelėje, galimai efektyviau vykdoma ląstelių iRNR transliacija ir virusas eliminuojamas. Būtent M, bet ne LA, virusų eliminacija aiškinama tuo, jog

galbūt LA virusiniai baltymai dalyvauja satelitinių virusų palaikyme tik tada, kai ląstelėje yra pakankamas Gag ir GagPol baltymų kiekis. *MAK* genų mutacijos galėtų lemti pakitusį viruso kapsidinių baltymų kiekį ar šių baltymų santykį, todėl sateliniai virusai nebepalaikomi ir eliminuojami iš ląstelės (Schmitt ir Breinig, 2002; Wickner *et al.*, 2013).

2004 metais nustatyta, jog LA-1 virusų Gag baltymas sąveikauja su DexD/H-box transliacijos faktoriumi Ded1p ir ši sąveika nepriklauso nuo virusinės RNR. *In vitro* Ded1p lemia greitesnę nekoduojančios virusinės RNR sintezę ir aktyvesnę LA viruso replikaciją (Chong *et al.*, 2004). Žinoma, jog Ded1p baltymas būtinas dirėsės mozaikos viruso RNA2 koduojančios (+) vgrNR transliacijai, o žmogaus Ded1p baltymo ortologas sąveikauja su hepatito C virusiniais baltymais (Owsianka ir Patel, 1999; Noueiry *et al.*, 2000). Gali būti, jog Ded1p yra ląstelės-šeimininkės baltymas svarbus įvairių RNR virusų palaikymui (Chong *et al.*, 2004).

Ląstelėse įprastos struktūros neatitinkančios iRNR molekulės yra degraduojamos. LA ir M virusinės RNR pasižymi išskirtine struktūra, nes neturi poliA uodegos bei kepurės struktūros, tad gali būti veikiamos ląstelinės iRNR degradacijos procesų (Hannig *et al.*, 1984; Fujimura ir Esteban, 2010). Nustatyta, jog iRNR degradaciją vykdančių septynių *SKI* (angl. *SKI* - *superkillers*) genų grupės koduojami baltymai sumažina LA ir M virusų genomo kopijų kiekį ląstelėje (Toh *et al.*, 1978; Wickner, 1986). Mielėse *SKI* genų mutacijos lemia padidėjusį LA ir M virusų genomų kiekį ir aktyvesnę toksino gamybą (padidėjusio žudymo fenotipas – angl. *superkiller*) (Toh *et al.*, 1978; Wickner, 1984; Masison *et al.*, 1995). Vienas iš *SKI* grupei priskiriamų genų yra kepurės struktūros neturinčioms RNR specifiška 5'→3' egzoribonukleazė *SKII/XRN1* (Hsu ir Stevens, 1993; Sheth ir Parker, 2003) (**1.9 pav.**). Xrn1p sukelia RNR virusų transkriptų degradaciją (Esteban *et al.*, 2008). Neseniai nustatyta specifinė nuo rūšies priklausoma sąveika tarp Xrn1p ir LA totivirusų randamų skirtingose *Saccharomyces* rūšyse. Pavyzdžiui, *S. cerevisiae* koduojamas Xrn1p aktyviausiai reguliuoja tose pačiose mielėse paplitusius LA virusus, tuo tarpu *S. kudriavzevii* aktyviausiai reguliuoja *S. kudriavzevii* aptinkamus LA tipo virusus. Imunoprecipitacijos tyrimai parodė, jog LA Gag baltymas fiziškai sąveikauja su Xrn1p. Kaip minėta, virusiniai LA ir M transkriptai 5' gale turi difosfatą, kuris nėra optimalus substratas Xrn1p baltymui. Šie du faktoriai gali reikšti, jog Xrn1p atlieka papildomas su RNR degradacija nesusijusias funkcijas. Sąveika tarp Gag ir Xrn1p baltymų gali lemti

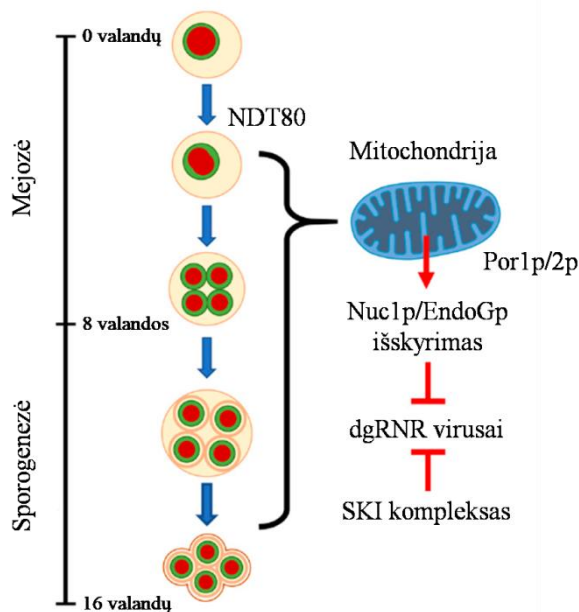
efektyvesnį virusinės RNR degradacijos procesą dėl lengvesnio nukleazės priėjimo prie virusinių transkriptų. Kita galima minėtosios sąveikos funkcija galėtų būti Gag baltymų vykdomas Xrn1p slopinimas (Rowley *et al.*, 2016). Ląstelinių poliA uodegos neturinčių iRNR degradaciją 3'→5' kryptimi vykdo citoplazminis egzosomos kompleksas (Anderson ir Parker, 1998; Halbach *et al.*, 2013). Virusinių RNR 3'→5' degradacijai vykti svarbūs Ski2p, Ski3p, Ski6p, Ski7p ir Ski8p baltymai (Winder and Wickner, 1993; Masison *et al.*, 1995; Benard *et al.*, 1998, 1999). Ski2p, Ski3p ir Ski8p sudaro citoplazminį SKI kompleksą, Ski2p turi helikazinį aktyvumą (Brown *et al.*, 2000). SKI kompleksas per Ski7p baltymą jungiasi su egzosoma ir lemia virusinių RNR patekimą į egzosomos aktyvųjį centrą (Araki *et al.*, 2001; Halbach *et al.*, 2013). Ski4p ir Ski6p baltymai įeina į egzosomos komplekso sudėtį (Mitchell ir Tollervey, 2000) (**1.9 pav.**).



**1.9 pav.** Xrn1p ir SKI/egzosomos atliekamos RNR degradacijos schema (Rowley *et al.*, 2016).

*S. cerevisiae* mielėse LA-1 ir M1 virusų kiekio reguliaciją taip pat atlieka mitochondrinė Nuc1p nukleazė (Gao *et al.*, 2019). Nuc1p yra žinduolių su apoptoze siejamos mitochondrinės nukleazės EndoGp homologas (Eastwood *et al.*, 2012). Mielėse sporuliacijos metu motininėje ląstelėje vyksta vidinis mejozinis dalijimasis (Neiman, 2011). Likusi motininė ląstelė žūsta nuo mejozės priklausomos programuotos ląstelės žūties būdu, vyksta vakuolės suirimas ir ląstelės autolizė (Eastwood *et al.*, 2012; Eastwood ir Meneghini, 2015). Susidariusios sporos dėl apsauginio apvalkalo šį procesą išgyvena (Eastwood ir Meneghini, 2015). Būtent nuo mejozės priklausomos programuotos ląstelės žūties metu iš mitochondrijų į ląstelės citozolį išskiriamas Nuc1p baltymas. Nuc1p baltymo patekimui į citozolį reikalingi mitochondriniai nuo įtampos priklausančių anijoninių

kanalų Por1/2p baltymai. Nuc1p reguliuoja virusų kiekį kartu su Ski3p, sutrikdžius šių baltymų veiklą stebimas K1 toksino kaupimasis ir susidarančių sporų žūtis (**1.10 pav.**). Tiriant Nuc1p baltymo funkcijas



**1.10 pav.** Nuo mejozės priklausomo antivirusinio Nuc1p poveikio modelis. Kairėje pusėje atidėtas laikas nuo sporuliacijos indukcijos pradžios ir stebima sporuliacijos fazė (Gao *et al.*, 2019).

*S. cerevisiae* kamiene, kuriame M1 virusas pašalintas, nustatyta, jog Nuc1p kartu su Ski3p, nepriklausomai nuo M1, reguliuoja LA-1 viruso kiekį ląstelėje (Gao *et al.*, 2019). Nuc1p ir Ski3p mutacijas turinčiose mielėse stebimas LA-1 genomo ir kapsidinio baltymo kiekio padidėjimas (Liu ir Dieckmann, 1989; Gao *et al.*, 2019). Taip pat nustatyta jog  $\Delta ski3 \Delta nuc1$  mielės auga lėčiau nei įprasta. Šis fenotipas sustiprėja mieles auginant aukštesnėje temperatūroje arba ant nefermentuojamų anglies šaltinių. Esant tokioms nepalankioms sąlygoms, normaliam augimui būtini efektyvūs mitochondrinės respiracijos mechanizmai, tad manoma, jog LA kaupimasis ląstelėje sutrikdo mitochondrijų funkcijas. Šio tyrimo autoriai iškėlė įdomią hipotezę, teigiančią, jog programuota ląstelės žūtis vienląsčiuose organizmuose galėjo išsivystyti kaip apsauga nuo virusinių infekcijų (Gao *et al.*, 2019).

## 1.3 LA ir M virusų įtaka ląstelės-šeimininkės molekuliniams procesams

### 1.3.1 LA ir M virusų įtaka ląstelės-šeimininkės genų raiškai

*S. cerevisiae* mielių LA-1 ir M1 virusai be suteikiamo žudymo fenotipo, kitų stebimų fenotipinių pokyčių savo šeimininkui nesukelia (Ghabrial, 1998). Nepaisant to, transkriptominių tyrimų metu, naudojant mikrogardeles ar RNR sekoskaitą, buvo nustatyti genai, kurių raiška kinta priklausomai nuo LA ar M virusų palaikymo ląstelėje (McBride *et al.*, 2013; Lukša *et al.*, 2017).

LA-1 ir M1 virusų palaikymo įtaka ląstelės-šeimininkės genų raiškos pokyčiams buvo įvertinta mikrogardelių metodu. Ląstelėse, kuriose aptinkami LA-1 ir M1 virusai, lyginant su ląstelėmis iš kurių šie virusai eliminuoti, daugiausiai identifikuoti sustiprėjusios raiškos genai. Pakito net 1408 genų raiška, tačiau daugumos raiška kito nežymiai (iki dviejų kartų). LA-1 ir M1 virusų palaikymas ląstelėje lemia aktyvesnę su mitochondrių baltymų sinteze ir molekulinio katabolizmu susijusių genų raišką. Tuo tarpu virusų praradimas aktyvina su organinių rūgščių metabolizmu susijusių genų raišką. Iš *SKI* genų grupės, virusinė infekcija, sukelia tik *SKI6* geno raiškos sustiprėjimą. *MAK* genų grupės atžvilgiu virusinė infekcija lemia padidėjusią *MAK3*, *MAK16* ir sumažėjusią *MAK7*, *MAK8* genų raišką (McBride *et al.*, 2013). LA-1 ir M1 virusų palaikymas lemia išaugusią dalies *SEC* genų (*SEC12*, *13*, *15*, *17*, *28*, *32*, *34*, *59*, *62*, *65*, *66*) raišką ir sumažėjusią *SEC11*, *SEC61* genų raišką (McBride *et al.*, 2013). *SEC* genų grupės koduojami baltymai yra svarbūs M1 virusų toksinų bei kitų ląstelių baltymų sekrecijai (Bussey *et al.*, 1983).

RNR sekoskaitos būdu tirtas bendras genų raiškos profilis *S. cerevisiae* mielėse turinčiose LA-lus ir M2 virusus. Satelitinio M2 viruso praradimas lemia 486, o abiejų LA-lus ir M-2 virusų praradimas lemia 715 genų raiškos pokyčius. Pakitusios raiškos genai yra susiję su ribosomų biogeneze, mitochondrijų funkcijomis, atsaku į stresą, lipidų ir aminorūgščių biosinteze. Ląstelėse, kuriose palaikomi dgRNR virusai lyginat su ląstelėmis iš kurių virusai eliminuoti, molekuliniai procesai susiję su aminorūgščių ir lipidų biosinteze, transportu ir energijos produkcija yra aktyvesni, tuo tarpu procesai susiję su ribosomų biogeneze ir atsaku į stresą pasyvesni (Lukša *et al.*, 2017). Skirtingos virusinės sistemos (LA-1 ir M1 arba LA-lus ir M2) sukelia tų pačių 180 genų raiškos pokyčius mielėse. Abiejose tirtose sistemose padidintos raiškos genai dalyvauja mitochondrijų funkcionavime,



citozoliniame ir transmembraniniame transporte. Tuo tarpu genai susiję su organinių rūgščių metabolizmu reguliuojami skirtingai (McBride *et al.*, 2013; Lukša *et al.*, 2017). Nesutampantys rezultatai galėjo būti gauti dėl skirtingų tirtų virusinių sistemų skirtinguose mielių kamienuose ar nevienodos metodikos taikymo (Lukša *et al.*, 2017).

Abiejų tyrimų autoriai mini, jog stebimas nežymus ląstelės-šeimininkės genų raiškos pokytis, dėl virusų palaikymo, gali būti susijęs su mielių ir jų virusų adaptacija funkcionuoti kooperatyviai. Taip pat, svarbu paminėti, kad dauguma genų reikalingų virusų palaikymui, atlieka gyvybiškai svarbias ląstelines funkcijas. LA ir M virusų išgyvenamumas tiesiogiai priklauso nuo ląstelės-šeimininkės, tad evoliucijos eigoje galėjo būti atrinkti šeimininkui nekenksmingi virusai (McBride *et al.*, 2013; Lukša *et al.*, 2017).

### 1.3.2 M virusų toksinų įtaka *S. cerevisiae* genų raiškai

K1 toksinas lemia katijonams specifinių kanalų susidarymą jautrių mielių ląstelių membranoje, tokiu būdu pažeisdamas membranos struktūrą. Dėl susidariusių jonų kanalų sutrinka protonų sukuriamas transmembraninis gradientas ir sukeliama ląstelių žūtis (Martinac *et al.*, 1990; Breinig *et al.*, 2002). Nepaisant to, ląstelių žūtis po poveikio toksinu sukeliama ne iš karto. Norint detaliau išsiaiškinti M virusų toksinų įtaką jautriems mielių kamienams, atlikti K1 toksinu paveiktų ląstelių transkriptominiai tyrimai. Poveikis toksinu lemia pakitusią 1189 genų raišką. K1 toksinas slopina transkripcijos ir translacijos procesus. Stebima sumažėjusi ribosomų biogenezėje ir RNR procesavime dalyvaujančių genų raiška. Šių procesų slopinimas gali veikti kaip atsakas į stresą sumažinant ATP suvartojimą arba sutelkiant ląstelės resursus į apsauginių baltymų sintezę. Dėl poveikio toksinu sustiprėja genų dalyvaujančių atsake į oksidacinį, hiperosmotinį, ląstelės sienelės pažeidimų stresą raiška. Taip pat nustatyta, jog toksinas paveikia su energijos metabolizmu susijusius procesus: padidėja gliukozės transporto, trikarboksirūgščių ciklo (TCA) fermentų, citochromų, purinų *de novo* sintezės ir tetrahidrofolato metabolizmo genų raiška. Nustatyta, jog sumažėja genų raiška susijusi su inozino monofosfato vertimu į GTP, dėl to ląstelėse aktyviau sintetamos ATP molekulės (Gier *et al.*, 2019b). Osmolitų, tokių kaip trehalozė, glikogenas ir glicerolis, kaupimasis ląstelėje yra siejamas su gynybiniu atsaku į stresą. Trehalozė ir glikogenas yra naudingi detoksifikacijos procesuose ir ląstelių baltymų stabilizavime (Yancey, 2005). Trehalozė funkcionuoja ne tik kaip energijos rezervas, bet ir

dalyvauja aktyvių deguonies formų (angl. *ROS* – *reactive oxygen species*) detoksifikacijoje, galimai slopina lipidų peroksidaciją ir stabilizuoja membranas streso sąlygomis (Benaroudj *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2003; Morato *et al.*, 2008). K1 toksinu paveiktose ląstelėse padidėja su trehalozės ir glikogeno metabolizmu susijusių genų raiška, o tai galėtų apsaugoti mielių ląsteles nuo toksino sukeltą poveikio. Šio tyrimo autoriai taip pat nustatė pakitusią įvairiuose ląstelės procesuose dalyvaujančių transkripcijos faktorių (*MSN4*, *SWI4*, *ACE2*, *SKN7*, *SWI5*, *BAS1*, *CIN5*, *HAP4* ir *TEC1*) raišką (Gier *et al.*, 2019b).

K1 produkuojančių ląstelių atsakas į toksiną tirtas izogeniniuose, tačiau toksino produkcijos efektyvumu besiskiriančiuose *S. cerevisiae* kamienuose. KIM01 kamienas pasižymi aktyvia K1 produkcija ir atsparumu šiam toksinui, tuo tarpu KIM01s kamienas produkuoja nedidelius K1 toksino kiekius, kurie žudymo efektą sukelia tik jautrioms neturinčioms sienelės ląstelėms (sferoplastams). Taip pat, mažus toksino kiekius produkuojantis kamienas yra jautrus pridėtiniam K1 toksinui. Šių kamienų palyginamieji transkriptominiai tyrimai parodė, jog didesnį toksino kiekį gaminančiose mielėse vyksta efektyvesnė su energijos metabolizmu, ląstelės adhezija, inozino monofosfato (IMP) metabolizmu ir DNR integracija susijusių genų raiška. KIM01 kamieno genų raiška galimai prisitaikiusi prie aktyvios toksino sekrecijos ir internalizacijos (Gier *et al.*, 2020b). Lyginat šių kamienų transkriptomus po poveikio pridėtinu toksinu, kitaip nei jautrių kamienų atveju, nustatyti tik nedaugelio genų raiškos pokyčiai. Dauguma pakitusios raiškos genų sutapo su anksčiau minėto jautrių ląstelių tyrimo metu identifikuotais genais. Tiek jautriose, tiek atspariose mielėse po poveikio toksinu nustatyta pakitusi streso atsako ir angliavandenių metabolizmo genų raiška. Įdomu, jog abiejų tyrimų metu nustatyta padidėjusi *CIN5*, *HAP4*, *MSN4* ir *TEC1* transkripcijos faktorių raiška, o tai galėtų reikšti, jog egzistuoja bendri atsako į stresą mechanizmai (Gier *et al.*, 2019b; Gier *et al.*, 2020b). Poveikis didesnėmis toksino dozėmis lemia papildomų genų raiškos pokyčius. KIM01 kamiene padidėja su purinų *de novo* sinteze ir tetrahidrofolato (THF) metabolizmu susijusių genų raiška, nežymiai aktyvesnė šių genų raiška lyginat su KIM01s kamieniu stebima ir be poveikio toksinu (Gier *et al.*, 2020b). Jautrios toksinui ląstelės iš karto po poveikio toksinu išlaiko stabilius ATP kiekius, taip pat ATP galimai palengvina ląstelinių pažeidimų taisymą ir dėl hidrotopinio veikimo palaiko baltymų tirpumą (Patel *et al.*, 2017; Gier *et al.*, 2019b). Remdamiesi šiais duomenimis, autoriai purinų *de novo* sintezės ir THF metabolizmo genų

raiškos pokyčius sieja su ATP sinteze (Gier *et al.*, 2020b). Kaip ir jautrių ląstelių atsako į toksiną atveju, KIM01 ląstelėse po poveikio toksinu padidėjo trehalozės ir glikogeno sintezės genų raiška (Gier *et al.*, 2019b; Gier *et al.*, 2020b). Atlikus lipidominius KIM01 ir KIM01s kamienų tyrimus, nustatyta, jog jautraus KIM01s kamieno membranoje aptinkama daugiau ergosterolio (Gier *et al.*, 2020b). Deleciniai *S. cerevisiae* kamieniai, kurių sterolių sintezės kelias yra defektyvus, yra atsparesni K1 toksinui (Page *et al.*, 2003). Sumažėjęs ergosterolio kiekis ląstelės membranoje taip pat gali būti susijęs su pasyvesne endocitoze ir sutrikusia sekrecine funkcija, o tai galėtų lemti dalinį atsparumą toksinui (Page *et al.*, 2003; Degreif *et al.*, 2019). KIM01 kamieno aktyvi atsako į stresą genų raiška bei specifinė membranos struktūra gali būti adaptaciniai mechanizmai leidžiantys vykdyti padidintą toksino sintezę (Gier *et al.*, 2020b).

#### **1.4 LA ir M virusų eliminacijos fenomenas**

Literatūroje aprašomas natyvių LA ir M virusų eliminacijos fenomenas. Išskiriamos keturios žinomos eliminacijos priežastys: defektyvių interferuojančių RNR (DI elementai) raiška, rekombinantinių nefunkcionalių kapsidinių baltymų sintezė, rekombinantinių laukinio tipo LA viruso Gag ir GagPol baltymų sintezė ir virusų tarpusavio konkurencija (Ridley ir Wickner, 1983; Esteban ir Wickner, 1988; Valle ir Wickner, 1993; Yao ir Bruenn, 1995; Ribas ir Wickner, 1998; Taylor ir Bruenn, 2009; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013; Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017).

##### **1.4.1 Defektyvių interferuojančių RNR elementų sukeliama eliminacija**

RNR virusai gali būti parazituojami defektyvių interferuojančių RNR (DI). Tai iš parazituojamo (motininio) viruso genomo kilusios RNR molekulės. DI elementai dažniausiai nekoduoja jokių baltymų, o jų replikacija priklauso nuo baltymų koduojamų pagalbinio viruso. Šios RNR vadinamos interferuojančiomis, kadangi gali slopinti pagalbinio viruso replikaciją ar sukelti patogeninius simptomus. DI elementai gali konkuruoti su pagalbiniu virusu dėl jo ar ląstelės-šeimininkės koduojamų baltymų, skatinti RNR interferencijos procesus ar koduoti defektyvius polipeptidus sąveikaujančius su pagalbinio viruso baltymais (Pathak ir Nagy, 2009).

Satelitiniams M1 virusams būdingi DI elementai vadinami S (angl. S – *suppressive*). Tai įvairūs deleciniai M1 viruso variantai, kurių dydis

varijuoja nuo 0,6 iki 1,6 kb dydžio (Somers, 1973; Vodkin *et al.*, 1974; Sweeney *et al.*, 1976; Bruenn ir Kane, 1978; Kane *et al.*, 1979). S dgRNR nekoduoja funkcionalaus preprotoksino ar kitų baltymų. Šie DI elementai interferuoja su laukinio tipo M1 virusais ir sukelia jų eliminaciją iš ląstelės (Ridley ir Wickner, 1983). Skirtingiems S elementams būdinga bendra trumpa 5` galo seka ir gan ilga 500 bp dydžio 3` galo seka. Nuskaičius S14 elementą, nustatyta, jog pirmosios 253 bp kilusios iš M1 viruso genomo 5` galo, o likusios 543 bp kilusios iš M1 viruso genomo 3` galo (Lee *et al.*, 1986). Pagalbinio viruso replikacijos interferenciją lemia 132 nt ilgio seka, nuo S14 RNR 3` galo nutolusi apie 400 nt. Šioje sekoje išsidėsčiusios LA-1 ir M1 genomuose aptinkamos dvi plaukų segtuko struktūros (stiebas-kilpa) reikalingos virusinės RNR replikacijai bei pakavimui į virionus. M1 viruso eliminacija dėl DI elemento raiškos galimai vyksta dėl DI ir M1 virusinės RNR konkurencijos vykstančios RNR pakavimo į virusines daleles metu (Huan *et al.*, 1991). Spontaniškos fermentacijos metu *S. cerevisiae* mielių kamienuose buvo aptiktos iš M2 virusų kilusios 1,3 kb dydžio RNR molekulės. Šie elementai buvo pavadinti NS (angl. NS – non suppressive), kadangi kitaip nei S RNR, satelitinio viruso neeliminuoja. Nepaisant to, NS elementai pakuojami į virusines daleles (Cansado *et al.*, 1999).

LA-1 virusams specifinis DI elementas vadinamas X. Jis sudarytas iš LA-1 genomo 5` galo 25 bp ir 3` galo 505 bp, kuriame išsidėstęs LA-1 pakavimo signalas (Esteban *et al.*, 1988; Esteban ir Wickner, 1988). X elementų raiška sumažina LA-1 viruso genomo kopijų kiekį ląstelėje, tačiau viruso eliminacijos nesukelia. X RNR geba išstumti M1 virusą iš ląstelės. S, X ir M1 palaikymui būtini ties patys MAK genai, tad šios RNR gali konkuruoti tiek dėl pagalbinio viruso, tiek dėl ląstelės-šeimininkės koduojamų baltymų. DI elementai turintys už replikaciją atsakingas sekas, tačiau praradę transkripcijos signalus, galėtų būti lengviau replikuojami pagalbinio viruso baltymų ir tokiu būdu sukelti natyvaus viruso genomo kiekio redukciją ar eliminaciją (Esteban ir Wickner, 1988).

#### **1.4.2. Nefunkcionalių kapsidinių baltymų sukeliama eliminacija**

Konstitutyvi LA-1 trumpintų kapsidinių baltymų sintezė sukelia natyvaus LA-1 viruso eliminaciją (Yao ir Bruenn, 1995). Kaip jau buvo minėta 1.1.3 skyriuje, LA-1 virusų kapsidė sudaryta iš asimetrinių Gag baltymo dimerų. Dviejų Gag subvienetų sąveikoje daugiausiai dalyvauja pirmosios 435 aminorūgštys (Naitow *et al.*, 2002). Vykdam padidintą bent 475 aminorūgščių ilgio LA kapsidinio baltymo raišką vyksta natyvių

pagalbinio ir satelitinio virusų eliminacija. Ilgesnių nei 603 aminorūgščių arba trumpesnių nei 475 aminorūgščių Gag baltymo delecinių variantų sintezė natyvaus LA-1 viruso palaikymo ląstelėje nesutrikdo. Eliminacijos proceso priklausymas nuo trumpintų Gag baltymų sintezės, o ne jų transkriptų, patvirtintas naudojant Gag baltymo raiškos vektorius su įterptais išankstiniais STOP kodonais. Įterptus išankstinius STOP kodonus turinčių transkriptų sintezė nežymiai sumažino LA dgRNR kopijų kiekį. Tokių transkriptų kiekis lyginant su papildomų STOP kodonų neturinčių baltymų transkriptų kiekiu yra mažesnis. Mutantinio F474O Gag varianto, kuriame likusi C-galo dalis yra deletuota, sintezė eliminuoja natyvų virusą, tuo tarpu mutantinio Gag F474O varianto be delecijos sintezė, eliminacijos nesukelia. Šis netikėtas rezultatas aiškinamas galima Gag baltymo iRNR 3' galo sąveika su STOP kodonu transliacijos metu (Yao ir Bruenn, 1995). Aptarti duomenys iš dalies nesutampa su kitų tyrimų metu gautais rezultatais. Wickner su grupe tyrė delecinių Gag baltymų įtaką M1 palaikymui, kai šis virusas replikuojamas rekombinantinių laukinio tipo Gag ir GagPol baltymų. Trumpintų Gag baltymų, turinčių nuo 15 iki 45 aminorūgščių C-galo delecijas, sintezė lemia M1 viruso praradimą. Gag baltymas turintis 52 a.r. C-galo deleciją neturi įtakos M1 viruso palaikymui. Nesutampantys rezultatai galėjo būti gauti dėl skirtingos metodikos taikymo ir/ar besiskiriančio rekombinantinių baltymų sintezės efektyvumo (Ribas ir Wickner, 1998).

Laukinio tipo Gag baltymai sintetinami nuo raiškos vektorių formuoja tuščias kapsides, tuo tarpu deleciniai kapsidinio baltymo variantai kapsidžių nesudaro (Yao ir Bruenn, 1995). Deleciniai Gag baltymai turintys iki 33 a.r. C-galo deleciją gali formuoti chimerines virusines daleles kartu su sulietiniu GagPol baltymu (Ribas and Wickner, 1998). Deleciniai Gag baltymai, turintys iki 77 a.r. C-galo deleciją geba sudaryti chimerines virusines daleles su laukinio tipo Gag baltymais (Yao ir Bruenn, 1995). Gag baltymai turintys 39 a.r. C-galo deleciją sudaro virusines daleles su laukinio tipo Gag baltymu, tačiau nepakuoja virusinės RNR. Tokios chimerinės dalelės galimai neinkorporuoja sulietinių GagPol baltymų, dėl to virusinės RNR į kapsides nepakuojamos (Konovalovas, 2018). Trumpinti Gag baltymai sąveikauja su laukinio tipo Gag baltymais ir galimai sutrikdo normalių virusinių dalelių susidarymą ar jų funkcionalumą. Šis procesas vadinamas neigiama komplementacija. LA-1 virusams artimo L-BC totiviruso trumpintų kapsidinių (iki 443 a.r.) baltymų sintezė lemia L-BC viruso eliminaciją iš ląstelės, tačiau neveikia LA-1 viruso. Atitinkamai LA-1

trumpintų kapsidinių baltymų sintezė neturi įtakos L-BC palaikymui ląstelėje (Yao ir Bruenn, 1995).

Natyvaus pagalbinių LA-1 viruso eliminacija iš ląstelės taip pat gali vykti dėl mielių genome koduojamų virusinės kilmės baltymų sintezės. Eukariotų genomuose aptinkami ne retrovirusinės kilmės RNR virusų genai ar jų dalys (angl. *NIRV – non-retroviral integrated genome RNA virus*). Viena iš galimų tokių genų funkcijų yra apsauga nuo virusinių infekcijų. Apsaugos mechanizmai gali veikti per RNR interferencijos procesus ar nefunkcionalių virusinių baltymų raišką (Warner *et al.*, 2018). *Debaromyces hansenii* mielių genome aptinkami totivirusų kilmės genai, koduojantys pilno ilgio totiviruso genomą bei du tarpusavyje panašius kapsidinius baltymus Cp1p ir Cp2p. Šie genai yra panašūs į LA-1 viruso koduojamus genus. 42 % LA-1 Gag ir Cp1p baltymų sekų yra identiškos (Taylor ir Bruenn, 2009). Nepaisant to, *D. hansenii* mielėse totivirusai iki šiol nėra aptikti. Į *S. cerevisiae* mieles turinčias LA-1 virusą, įterpus raiškos vektorių koduojanti Cp1p baltymą, stebima natyvaus LA-1 viruso eliminacija. Nustatyta, jog Cp1p baltymai geba sąveikauti su laukinio tipo Gag baltymais, taip sutrikdydami normalių virusinių dalelių susirinkimą (Warner *et al.*, 2018). Panašią funkciją atlieką endogeninių retrovirusų ir retrotranspozonų koduojami kapsidiniai baltymai (Mura *et al.*, 2004; Tucker ir Gar, 2016). *D. hansenii* koduojamas Cp1p baltymas galimai apsaugo mieles nuo LA-1 viruso infekcijos horizontalios pernašos būdu (Warner *et al.*, 2018).

### **1.4.3 Laukinio tipo virusinių baltymų sukeliama eliminacija**

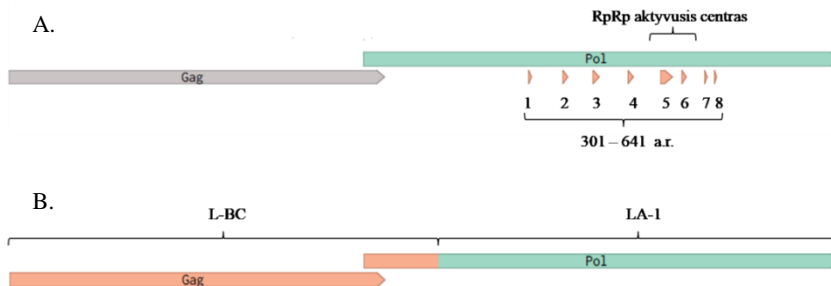
Nuo raiškos vektorių sintetiniai rekombinantiniai LA-1 viruso Gag ir GagPol baltymai geba palaikyti satelitinį M1 virusą, tačiau sukelia natyvių LA-1 virusų eliminaciją (Fujimura *et al.*, 1992; Wickner *et al.*, 1991; Valle ir Wickner, 1993). Tik rekombinantinio kapsidinio baltymo sintezė, kitaip nei L-BC ar kai kurių augalų RNR virusų atveju, lemia natyvaus LA-1 viruso geno kiekio padidėjimą (Wickner *et al.*, 1991; Fitchen ir Beachy, 1993; Valle ir Wickner, 1993; Yao *et al.*, 1995).

Siekiant iširti ar natyvaus LA-1 viruso eliminacija yra sukeliama padidintos rekombinantinių LA-1 baltymų sintezės, ar virusinių RNR transkriptų, panaudoti raiškos vektoriai Gag arba Pol baltymų atviro skaitymo rėmelio pradžioje turintys STOP kodonus. Tokių transkriptų ar koduojančios RNR grandinės 3'-gale esančio pakavimo signalo sekos raiška

neturi įtakos natyvaus LA-1 viruso palaikymui ląstelėje. Taigi Gag ir GagPol baltymų iRNR raiška LA-1 viruso eliminacijos nesukelia. Delecinių Gag ir GagPol baltymų variantų sintezė taip pat nėra pakankama eliminacijos procesui vykti. Virusinių baltymų su inaktyvuotu 3' galo pakavimo signalu (įvedamos mutacijos sutrikdančios antrinės RNR struktūros susidarymą) sintezė sukelia eliminaciją, tačiau ne taip efektyviai, kaip laukinio tipo baltymų sintezės atveju. Tik sulietinių GagPol baltymų sintezė (sutrikdomas rėmelio poslinkio regionas) lemia satelitinio M1 viruso praradimą, tačiau natyvus LA-1 virusas nepaveikiamas (Valle ir Wickner, 1993). Chimerinių rekombinantinių GagPol baltymų sintezė, kurių Gag koduojanti seka kilusi iš LA-1, o Pol koduojanti seka kilusi iš LA-lus virusų, lemia natyvaus LA-2 viruso eliminaciją. Tokie chimeriniai baltymai palaiko M2 satelitinį virusą (Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017). Laukinio tipo LA-1 rekombinantinių baltymų sintezė lemia natyvaus LA-28 viruso eliminaciją (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017). Remiantis aptartais rezultatais, galima teigti, jog LA virusų eliminacijos procesą išskirtinai lemia funkcionalių laukinio tipo rekombinantinių LA baltymų sintezė.

Tiriant konservatyvių GagPol baltymo Pol domeno sekų įtaką natyvaus LA viruso eliminacijai bei M viruso palaikymui sukurti chimeriniai raiškos vektoriai, kuriuose pavieniai konservatyvūs polimerazinio domeno regionai pakeisti atitinkamais dgRNR viruso, infekuojančio *Giardia lamblia*, regionais (**1.11 pav. A.**). Chimerinių baltymų tyrimai parodė, jog endogeninio LA-1 viruso replikacijos interferencija nėra tik nuo rekombinantinių baltymų polimerazinio aktyvumo priklausomas procesas. M1 viruso palaikymui ląstelėje svarbios RpRp domene ir aplink jį išsidėsčiusios sekos (3–6 regionai; 418–586 a.r.), chimeriniai baltymai turintys pokyčius šioje srityje nepalaikė M1 viruso replikacijos. Tuo tarpu LA-1 viruso eliminacijos procesui svarbūs papildomi, su polimerazine funkcija nesusiję regionai esantys Pol N-gale (1–2 regionai). LA-1 viruso palaikymą ląstelėje sutrikdė tik tie chimeriniai baltymai, kuriuose buvo pakeistos Pol domeno C-gale nuo 620 a.r. išsidėsčiusios sekos (7–8 regionai). Svarbu paminėti, jog visi chimeriniai baltymai geba pakuoti virusinę RNR, tad natyvių virusų eliminacijos procesas priklauso nuo papildomų ir vis dar nežinomų mechanizmų (Routhier ir Bruenn, 1998). Su šiais duomenimis koreliuoja rezultatai gauti tiriant LA-1 ir L-BC virusų chimerinius baltymus. Chimeriniai baltymai, kuriuose Gag ir Pol domeno N-galinė seka (iki 135 a.r.) yra iš L-BC, o likusi Pol dalis iš LA-1 viruso, geba palaikyti M-1 virusą, tačiau LA-1 eliminacijos nesukelia (**1.11 pav. B.**).

Tiesa, chimeriniai baltymai M1 virusą palaiko nestabiliai (ilgainiui M1 virusas prarandamas) ir ne taip efektyviai kaip laukinio tipo virusiniai baltymai. Pol domeno N-gale (A123D ir S211P) mutacijas turintys baltymai taip pat palaiko M1 virusą ir pakuoja M1 dgRNR genomą į virusines daleles, tačiau neeliminuoja natyvaus LA viruso (Yao et al., 1995).



**1.11 pav.** GagPol rekombinantinių baltymų sintezės sukeltos natyvių virusų eliminacijos tyrimuose naudoti konstruktai. **A.** LA-1 GagPol polimerazinio domeno sričių (žymimos oranžinėmis rodyklėmis ir numeriu), pakeistų atitinkamomis *Giardia lamblia* infekuojančio viruso polimerazinio baltymo sritimis, schema (pagal Routhier ir Bruenn, 1998); **B.** LA-1 ir L-BC virusų baltymų chimerinis konstruktas (pagal Yao *et. al.*, 1995).

Viena iš galimų natyvaus LA-1 viruso eliminaciją lemiančių priežasčių galėtų būti rekombinantinių baltymų konkurencija su natyviais virusiniais baltymais dėl ląstelės-šeimininkės baltymų reikalingų viruso replikacijai ir/ar transkripcijai vykti (Valle ir Wickner, 1993). Kaip jau minėta anksčiau, Mak10p baltymai yra būtini LA viruso palaikymui ląstelėje (Lee ir Wickner, 1992). Mielės transformavus Mak10p baltymo padidintos raiškos vektoriumi, eliminacijos procesas dėl rekombinantinių LA baltymų sintezės nebuvo sutrikdytas. Tad galima teigti, jog Mak10p nėra ribojantis faktorius sukeliantis natyvaus viruso eliminaciją. Tiriant *ski2* mutantus, kuriuose yra itin išaugęs natyvaus viruso kiekis, eliminacijos procesas yra stabdomas. Rekombinantinių LA baltymų sintezės sukelta eliminacija stebėta tik 4 % iš tirtų transformantų. Toks efektas, galėtų būti sukeltas, jeigu SKI sistema identifikuoja padidėjusį GagPol baltymų kiekį ir vykdo virusinės iRNR degradaciją, taip pat SKI sistema galėtų sumažinti viruso palaikymui būtino ląstelės-šeimininkės faktoriaus ar faktorių raišką (Valle ir Wickner, 1993).



#### 1.4.4 Virusų tarpusavio konkurencijos sąlygota eliminacija

*S. cerevisiae* mielių ląstelėse tuo pačiu metu aptinkamas tik vieno tipo M satelitinis virusas. Sukryžminus haploidines mieles, kurių viena turi M1 virusą, o kita M2 virusą, susidariusios diploidinės mielės išlaiko tik M1 virusą. Taigi, M1 virusas lemia M2 viruso išstūmimą (Wickner, 1980). Analogiškas procesas stebimas suliejant mieles turinčias M1 arba M2 virusus, naujai susidariusiose ląstelėse palaikomas tik vieno tipo virusas (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013).

LA virusai taip pat konkuruoja tarpusavyje. Sukryžminus ar citodukcijos būdu suliejus ląsteles turinčias LA-2 ir M2 virusus su ląstelėmis turinčiomis LA-1 arba LA-lus virusus, nustatyta, jog natyvus LA-2 virusas yra išstumiamas. LA-2 viruso eliminacija dėl LA-1 arba LA-lus virusų įvedimo į ląsteles vyksta nepriklausomai nuo M2 palaikymo ląstelėje. Mielių kamienai, kuriuose aptinkami sąlyginai nedideli LA-1 viruso kiekiai, nepalaiko M2 viruso replikacijos. Tuo tarpu mielių kamienai, kuriuose palaikomi dideli LA-1 viruso kiekiai arba LA-lus virusas, geba palaikyti M2 satelitą. Nepaisant to, LA-1 ir LA-lus virusai M2 satelitus palaiko nestabiliai ir ilgainiui M2 sukeliama žudymo fenotipas prarandamas (Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017). Šių tyrimų autorių teigimu, LA virusai geba palaikyti sau nespecifinius M virusus tik tuo atveju, jeigu stebima padidėjusi LA virusų baltymų sintezė dėl *SKI* mutacijų arba įterpto rekombinantinių baltymų raiškos vektoriaus (Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017). Konkurencija nustatyta ir tarp LA-1 ir LA-lus virusų. Į kamieną turintį LA-1 virusą įvedus LA-lus virusus, LA-1 virusai dažniausiai išstumiami. Suliejant haploidines mieles, kai kurios iš jų sugeba išlaikyti LA-1 virusą, tačiau niekada nepalaiko abiejų virusų toje pačioje ląstelėje (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Medžiagos

#### 2.1.1 Reagentai

2.1 lentelė. Tyrimams naudoti reagentai.

Gamintojas	Reagentai
Applichem	kalcio chloridas, fenolis, tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris)
Biolife	D-gliukozė
Fisher Scientific	geneticinas (G418)
Liofilchem	agaras, mielių ekstraktas, peptonas
Lonza	agarozė
Merck	acto rūgštis, chloroformas, druskos rūgštis, izopropanolis, natrio acetatas, natrio chloridas, natrio hidroksidas, polietilenglikolis 4000 (PEG 4000)
Reachem Slovakia	citrinų rūgštis, natrio hidrofosfatas
Roth	2-merkaptioetanolis, ampicilinas, etidžio bromidas, etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA), ličio chloridas, ličio acetatas, natrio dodecilsulfatas (NDS), magnio chloridas, metileno mėlynasis
Sigma	dimetilsulfoksidą (DMSO)
Thermo Scientific	agarozė, NTP, dNTP
Vilniaus degtinė	etanolis

## 2.1.2 Fermentai ir molekuliniai dydžio standartai

DNR polimerazės „Phusion“ ir „DreamTaq“, atvirkštinė transkriptazė „Maxima“, polinukleotidkinazė „T4 PNK“, šarminė fosfatazė „FastAP“, dezoksiribonukleazė „DNaseI“, T4 DNR ligazė, restrikcijos endonukleazės, DNR dydžio standartai „O‘GeneRuler DNA Ladder Mix“ ir „GeneRuler™ 1kb DNA ladder mix“. Fermentai ir molekuliniai dydžio standartai įsigyti iš “Thermo Scientific” ir naudoti pagal gamintojo rekomendacijas.

## 2.1.3 Komerciniai rinkiniai

DNR gryninimo rinkiniai „GeneJET Gel Extraction Kit“ ir „GeneJET Miniprep Kit“ įsigyti iš “Thermo Scientific” ir naudoti pagal gamintojo rekomendacijas.

## 2.1.4 Mitybinės terpės

2.2 lentelė. Tyrimams naudotos mitybinės terpės ir jų sudėtis.

Terpė	Sudėtis
LB	1 % peptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 0,5 % NaCl. Standžiai terpei pridedama 2 % agarų.
YPD	2 % peptono, 1 % mielių ekstrakto, 2 % gliukozės. Standžiai terpei pridedama 2 % agarų.
MD	0,5 % mielių ekstrakto, 0,5 % peptono, 0,95 % citrinų rūgšties, 1,4 % natrio hidrofosfato, 2 % gliukozės, 2 % agarų ir 0,015 % metileno mėlynojo (pH 4,7–5,2 priklausomai nuo tiriamojo mielių kamieno).

## 2.1.5 Mikroorganizmų kamienai

2.3 lentelė. Tyrimuose naudoti mikroorganizmų kamienai.

Pavadinimas	Rūšis	Genotipas	Nuoroda
<b>DH10B</b>	<i>E. coli</i>	F- <i>endA1 deoR+ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara, leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) StrR λ-</i>	Invitrogen
<b>BY4741</b>	<i>S. cerevisiae</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, ScV-LA-1</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
<b>BY4741ΔLA</b>	<i>S. cerevisiae</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, LA-0</i>	Konovalovas, 2018
<b>α'1</b>	<i>S. cerevisiae</i>	MATα, <i>leu2-2</i>	Čitavičius ir Inge-Večtomov, 1972
<b>K7</b>	<i>S. cerevisiae</i>	MATa, <i>arg9, kil-K1</i>	Somers ir Bevan, 1969
<b>K7 M1-null</b>	<i>S. cerevisiae</i>	MATa, <i>arg9, kil-K1-0</i>	Šis darbas
<b>Rom K-100</b>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>ScV-LA-2, M-2</i>	Jokantaitė <i>et al.</i> , 1982
<b>M437</b>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>ScV-LA-lus, M-2</i>	Naumova ir Naumov, 1973
<b>M437ΔLA</b>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>ScV-LA-lus-0, M-2-0</i>	Šis darbas
<b>SRB-15-4</b>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>ScV-LA-lus, M-lus</i>	Vepštaitė-Monstavičė <i>et al.</i> , 2018
<b>K28</b>	<i>S. paradoxus</i>	<i>SpV-LA-28, M-28</i>	Pfeiffer ir Radler, 1984

## 2.1.6 Oligonukleotidai

2.4 lentelė. Tyrimuose naudoti oligonukleotidai.

Pavadinimas	Seka (5' → 3')	Aprašymas
<b>YCFH-AK3</b>	GCGGATCCTTAAAAATGTTGAGATTCGTTA CCAAAAACTCTCAAG	Pradmenys skirti Gag baltymą (iki 641 a.r.) koduojančios sekos padauginimui.
<b>YCFH-AK4</b>	CTCACGCGGCCGCAGATCTGAAACCCTGCT GCGTACGGCGTACTACTAC	
<b>LA-1.R1.F</b>	AAGTCAATTTTCGTGCTTATG	Pradmenys skirti pYAK-G-LA-1 plazmidinė sekos padauginimui, išskyrus LA-1 seką tarp 383–629 bp.
<b>LA-1.R1.R</b>	CGTGATTGTCATACCAAC	
<b>LA-lus.R1.F</b>	TGACATTACTCATGAATATG	Pradmuo skirtas LA-lus viruso Gag baltymo C-galo variabilios sekos padauginimui.
<b>LA-28.R1.R</b>	CAGTAACGGTCAGTGGTC	Pradmuo skirtas LA-28 viruso Gag baltymo C-galo variabilios sekos padauginimui.
<b>LA-1.R2.F</b>	GATGTTCTCACTCACAAG	Pradmenys skirti pYAK-G-LA-1 plazmidinės sekos padauginimui, išskyrus LA-1 seką tarp 1929–3267 bp. LA-1.R2.F pradmuo pritaikytas AT-PGR reakcijai įvertinti ar natyvus LA-1 virusas yra eliminuotas iš BY4741 ir K7 kamienų.
<b>LA-1.R2.R</b>	TGCTGAGTACGACGC	
<b>LA-lus.R2.F</b>	GGGTTTAGGAGTGGTAGG	Pradmuo skirtas LA-lus viruso Pol domeną koduojančios sekos padauginimui.

<b>LA-28.R2.F</b>	GGGTTTAGGAGTGGTAGG	Pradmenys skirti LA-28 viruso Pol domeno N-galo variabilios sekos padauginimui.
<b>LA-28.R2.R</b>	CTCGCACCTGAACATAG	
<b>LA-1.R3.F</b>	AGGTCATACTGTAATTGCC	Pradmenys skirti pYAK-G-LA-1 plazmidinės sekos padauginimui, išskyrus LA-1 seką nuo 3273 bp. LA-1.R3.R pradmuo pritaikytas AT-PGR reakcijai įvertinti ar natyvus LA-1 virusas yra eliminuotas iš BY4741 ir K7 kamienų.
<b>LA-1.R3.R</b>	GCGTCCATTATTCTTACTG	
<b>LA-lus.R3.F</b>	GATGCATAGAATCAATG	Pradmuo skirtas LA-lus viruso Pol domeną koduojančios sekos (nuo 3273 bp) padauginimui. Pradmuo pritaikytas AT-PGR reakcijai įvertinti ar natyvus LA-lus virusas yra eliminuotas iš M437 kamieno.
<b>LA-lus.R3.R</b>	GTAGTGCTCTTAAAGG	Pradmuo pritaikytas AT-PGR reakcijai įvertinti ar natyvus LA-lus virusas yra eliminuotas iš M437 kamieno.
<b>LA-28.R3.F</b>	TATGCACAACATTAATGC	Pradmuo skirtas LA-28 viruso Pol domeną koduojančios sekos (nuo 3273 bp) padauginimui.
<b>TEF</b>	CATTAGAAAGAAAGCATAGC	TEF1 (P <sup>TEF1</sup> ) promotoriaus sekai komplementarus pradmuo.
<b>CYC1</b>	GCGTGAATGTAAGCGTGA	CYC1 terminatoriaus sekai komplementarus pradmuo.
<b>M1-dir</b>	GAAAAATAAAGAAATGACGAAGCC	Pradmenys skirti M1 viruso preprotoksiną koduojančios sekos padauginimui.
<b>M1-rev</b>	CCCTAGTGGCCTGTGTCAC	

## 2.1.7 Plazmidės

2.5 lentelė. Tyrimams naudoti plazmidiniai vektoriai.

Pavadinimas	Aprašymas	Nuoroda
<b>pYM-14</b>	Chromosominės integracijos plazmidė.	Euroscarf
<b>pUC19-romL</b>	LA viruso dgRNR iš <i>S. cerevisiae</i> Rom K-100 kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių.	Konovalovas, 2018
<b>pUC-19-m437L</b>	LA viruso dgRNR iš <i>S. cerevisiae</i> M437 kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių.	Konovalovas, 2018
<b>pUC19-28L</b>	LA viruso dgRNR iš <i>S. pradoxus</i> K28 kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių.	Konovalovas, 2018
<b>pYAK3</b>	Vektorius sukonstruotas pYES2 (Invitrogen) plazmidėje pakeitus $P^{GAL1}$ – promotorių $P^{TEF1}$ – promotoriumi iš pYM-N20 plazmidės ir pakeitus klonavimo regioną naujai sukonstruotu klonavimo regionu, turinčiu FLAG ir HIS6 afininius inkarus koduojančias sekas. Pagrindinės funkcinės sekos: ColE1 ori, 2mkm, AmpR, $P^{TEF1}$ , $T^{CYC1}$ .	Konovalovas, 2018
<b>pYAK3-LAcids</b>	LA-1 viruso baltymus koduojantis raiškos vektorius.	Konovalovas, 2018
<b>pYAK3-GagΔ</b>	LA-1 viruso trumpinto Gag baltymo raiškos vektorius (1–641 a.r.) su prilietais FLAG ir HIS6 afininiais inkarais.	Konovalovas, 2018

<b>pYAK3-LA-lus-GagΔ</b>	LA-lus viruso trumpinto Gag baltymo raiškos vektorius (1–641 a.r.) su prilietais FLAG ir HIS6 afininiais inkarais.	Konovalovas, 2018
--------------------------	--	-------------------

**2.6 lentelė.** Darbe sukonstruotų rekombinantinių plazmidinių vektorių konstravimo schemas.

<b>Plazmidinis vektorius</b>	<b>Pradinis plazmidinis vektorius</b>	<b>Fermentai ir pradmenys naudoti vektoriaus paruošimui</b>	<b>DNR fragmento šaltinis</b>	<b>Fermentai ir pradmenys naudoti DNR fragmento paruošimui</b>	<b>Paskirtis</b>
<b>pYAK-G</b>	pYAK3	SmiI REazė	pYM-14	SmaI ir Ecl136II REazės	Mielių baltymų raiškos vektorius koduojantis atsparumo genetinui (G148) geną.
<b>pYAK-G-LA-1ΔGag</b>	pYAK3-GagΔ	SmiI REazė	pYM-14	SmaI ir Ecl136II REazės	LA-1 viruso trumpinto Gag baltymo raiškos vektorius (1–641 a.r.) su prilietais FLAG ir HIS6 afininiais inkarais.
<b>pYAK-G-LA-2ΔGag</b>	pYAK-G	BamHI ir NotI REazės	pUC19-romL	Pradmenys: YCFH-AK3, YCFH-AK4. BamHI ir NotI REazės	LA-2 viruso trumpinto Gag baltymo raiškos vektorius (1–644 a.r.) su prilietais FLAG ir HIS6 afininiais inkarais.



<b>pYAK-G-LA-lusΔGag</b>	pYAK3-LA-lus-GagΔ	SmiI REazė	pYM-14	SmaI ir Ecl136II REazės	LA-lus viruso trumpinto Gag baltymo raiškos vektorius (1–641 a.r.) su prilietais FLAG ir HIS6 afininiais inkarais.
<b>pYAK-G-LA-28ΔGag</b>	pYAK-G	BamHI ir NotI REazės	pUC19-28L	Pradmenys: YCFH-AK3, YCFH-AK4. BamHI ir NotI REazės	LA-28 viruso trumpinto Gag baltymo raiškos vektorius (1–644 a.r.) su prilietais FLAG ir HIS6 afininiais inkarais.
<b>pYAK-G-LA-1</b>	pYAK-G	BamHI REazė	pYAK3-LAcids	BamHI REazė	LA-1 viruso baltymų raiškos vektorius.
<b>pYAK-G-LA-lus</b>	pYAK-G	BamHI REazė	pUC19-m437L	BamHI REazė	LA-lus viruso baltymų raiškos vektorius.
<b>pYAK-G-LA-28</b>	pYAK-G	BamHI REazė	pUC19-28L	BamHI REazė	LA-28 viruso baltymų raiškos vektorius.
<b>pYAK-G-LA-1.R1.LAlus pagalbinis</b>	pYAK-G-LA-1	Pradmenys: LA-1.R1.F, LA-1.R1.R. XhoI REazė	pYAK-G-LA-lus	Pradmenys: LA-lus.R1.F, CYC1. XhoI REazė	Pagalbinis klonavimo vektorius.

<b>pYAK-G- LA-1.R1.LA-lus</b>	pYAK-G- LA-1.R1. LA-lus pagalbinis	Pradmenys: LA-1.R1.R, LA-lus.R3.F. XhoI REazė	pYAK-G- LA-1	Pradmenys: LA-1.R1.F, CYC1. XhoI REazė	LA-1 viruso baltymų, kuriuose Gag baltymo C-galo variabili sritis (383–629 bp) pakeista į atitinkamą LA-lus viruso seką, raiškos vektorius.
<b>pYAK-G- LA-1.R1.LA-28 pagalbinis</b>	pYAK-G- LA-1	Pradmenys: LA-1.R1.R, LA-1.R1.R BcuI REazė	pYAK-G- LA-28	Pradmenys: LA-28.R1.R, TEF. BcuI REazė	Pagalbinis klonavimo vektorius.
<b>pYAK-G- LA-1.R1.LA-28</b>	pYAK-G- LA-1.R1. LA-28 pagalbinis	Pradmenys: LA-1.R1.LA-28, LA-28.R1.R BcuI REazė	pYAK-G- LA-1	Pradmenys: LA-1.R1.R, TEF. BcuI REazė	LA-1 viruso baltymų, kuriuose Gag baltymo C-galo variabili sritis (383–629 bp) pakeista į atitinkamą LA-28 viruso seką, raiškos vektorius.
<b>pYAK-G- LA-1.R2.LA-lus pagalbinis</b>	pYAK-G- LA-1	Pradmenys: LA-1.R2.F, LA-1.R2.R XhoI REazė	pYAK-G- LA-lus	Pradmenys: LA-lus.R2.F, CYC1. XhoI REazė	Pagalbinis klonavimo vektorius.

<b>pYAK-G- LA-1.R2.LA-lus</b>	pYAK-G- LA-1.R2. LA-lus pagalbinis	Pradmenys: LA-1.R2.R, LA-lus.R3.F. XhoI REazė	pYAK-G- LA-1	Pradmenys: LA-1.R2.F, CYC1. XhoI REazė	LA-1 viruso baltymų, kuriuose Pol domeno N-galo variabili (1929–3267 bp) sritis pakeista į atitinkamą LA-lus viruso seką, raiškos vektorius.
<b>pYAK-G- LA-1.R2.LA-28 pagalbinis</b>	pYAK-G- LA-1	Pradmenys: LA-1.R1.R, LA-1.R2.R BcuI REazė	pYAK-G- LA-28	Pradmenys: LA-28.R2.R, TEF. BcuI REazė	Pagalbinis klonavimo vektorius.
<b>pYAK-G- LA-1.R2.LA-28</b>	pYAK-G- LA-1.R2. LA-28 pagalbinis	Pradmenys: LA-28.R2.F, LA-28.R1.R BcuI REazė	pYAK-G- LA-1	Pradmenys: LA-1.R2.R, TEF. BcuI REazė	LA-1 viruso baltymų, kuriuose Pol domeno N-galo variabili sritis pakeista į atitinkamą LA-28 viruso seką (1929–3267 bp), raiškos vektorius.
<b>pYAK-G- LA-1.R3.LA-lus</b>	pYAK-G- LA-1	Pradmenys: LA-1.R3.F, LA-1.R3.R XhoI REazė	pYAK-G- LA-lus	Pradmenys: LA-lus.R3.F, CYC1. XhoI REazė	LA-1 viruso baltymų, kuriuose Pol domeno C-galo variabili sritis pakeista į atitinkamą LA-lus viruso seką (nuo 3273 bp), raiškos vektorius.

<b>pYAK-G- LA-1.R3.LA-28</b>	pYAK-G- LA-1	Pradmenys: LA-1.R3.F, LA-1.R3.R XhoI REazė	pYAK-G- LA-28	Pradmenys: LA-28.R3.F, CYC1. XhoI REazė	LA-1 viruso baltymų, kuriuose Pol domeno C-galo variabili sritis pakeista į atitinkamą LA-28 viruso seką (nuo 3273 bp), raiškos vektorius.
<b>pYAK-G- LA-1.G.LA-lus.P</b>	pYAK-G- LA-1	Pradmenys: LA-1.R2.F, LA-1.R2.R. XhoI REazė	pYAK-G- LA-lus	Pradmenys: LA-lus.R2.F ir CYC1.	Raiškos vektorius koduojantis dalinį LA-1 kapsidinį baltymą Gag (iki 642 a.r.) ir pilno ilgio LA-lus RpRp baltymą Pol.
<b>pYAK-G- LA-1.G.LA-28.P</b>	pYAK-G- LA-1	Pradmenys: LA-1.R2, CYC1. XhoI REazė	pYAK-G- LA-28	Pradmenys: LA-28.R2.F, CYC1. REazė XhoI	Raiškos vektorius koduojantis dalinį LA-1 kapsidinį baltymą Gag (iki 642 a.r.) ir pilno ilgio LA-28 RpRp baltymą Pol.

## 2.1.8 Tirpalai

2.7 lentelė. Tyrimams naudoti tirpalai.

Tirpalo pavadinimas	Sudėtis
TB buferinis tirpalas	50 mM Tris-HCl (pH 9,3), 1 % $\beta$ -merkaptoetanolio.
TES buferinis tirpalas	10 mM Tris-HCl (pH 7,3), 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,2 % NDS.
1xLiAc/1xTE	100 mM ličio acetato (pH 7,5), 10 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8).
1xLiAc/1xTE/40%PEG4000	100 mM ličio acetato (pH 7,5), 10 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8), 40 % PEG 4000.
„Na tirpalas“	5 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> .
„Ca tirplas“	5 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM CaCl <sub>2</sub> , 5 mM MgCl <sub>2</sub> .
1x TE buferis	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8).
NaOH/NDS tirpalas	100 mM NaOH, 1 % NDS.

## 2.2 Metodai

### 2.2.1 Suminės RNR gryninimas iš mielių ląstelių

Nuo agarizuotos terpės nedidelis kiekis mielių perkeliamas į 4 mL skystos YPD terpės ir auginamas purtant 16–20 val. 30 °C temperatūroje. Jeigu RNR gryninama iš mielių transformantų į skystą YPD terpę pridedamas atitinkamas kiekis genocidinio (G418). 1 mL užaugusios mielių kultūros perkeliamas į 1,5 mL mėgintuvėlį, ląstelės surenkamos centrifuguojant 1 min. 6000xg kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas ir ląstelės resuspenduojamos 1 mL 50 mM EDTA tirpalo. Centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas pašalinamas, ląstelės resuspenduojamos 1 mL TB buferinio tirpalo ir inkubuojamos 15 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės surenkamos centrifuguojant 1 min. 6000xg kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, ląstelės resuspenduojamos 800  $\mu$ L TES buferinio tirpalo, pridedama 600  $\mu$ L rūgštinio fenolio tirpalo (pH 5,2). Ląstelės inkubuojamos purtant 45 min. kambario temperatūroje. Vandeninė ir organinė fazės

atskiriamos centrifuguojant 30 min. 20000 xg 4 °C temperatūroje. 600 µL vandeninės fazės perkeliama į naują mėgintuvėlį, pridedama 60 µL 3 M NaAc (pH 5,2) ir 660 µL 100 % izopropanolio, mėginiai sumaišomi. Suminė RNR išsodinama centrifuguojant 10 min. 20000xg kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, nuosėdos plaunamos 150 µL 70 % etanolio tirpalu, centrifuguojama 5 min. 20000xg kambario temperatūroje. Nuosėdos džiovinamos ir tirpinamos 20 µL vandens.

### **2.2.2 dgRNR išsodinimas iš suminės RNR mėginių**

DgRNR išsodinimui naudojama 10–15 µL suminės RNR mėginio. Mėginiai papildomi vandeniu iki 30 µL, pridedama 70 µL 4 M LiCl tirpalo iki galutinės 2,8 M koncentracijos. Mėginiai sumaišomi ir inkubuojami 4 °C temperatūroje 16–20 val. Po inkubacijos vgRNR išsodinama mėginius centrifuguojant 45 min. 20000xg 4 °C temperatūroje. 90 µL supernatanto, kuriame yra ištirpusios dvigrandininės nukleorūgštys, perkeliama į naują mėgintuvėlį, pridedama 9 µL 3M NaCl ir 99 µL 100 % izopropanolio. Dvigrandininės nukleorūgštys išsodinamos centrifuguojami 10 min. 20000xg kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, nuosėdos plaunamos 150 µL 70 % etanolio tirpalu. Centrifuguojama 5 min. kambario temperatūroje, susidariusios nuosėdos džiovinamos ir tirpinamos atitinkamai 10–15 µL vandens.

### **2.2.3 Mielių kompetentinių ląstelių ruošimas**

Pasirinktas mielių kamienas nuo agarizuotos terpės perkeliamas į 4 mL skystos YPD terpės ir auginamas purtant 16–20 val. 30 °C temperatūroje. 500 µL užaugusios kultūros perkeliama į 50 mL skystos YPD terpės ir auginama 3–5 val. purtant 30 °C temperatūroje, kol kultūra pasiekia 0,6–0,7 o.v. optinį tankį ( $\lambda = 600$ ). Po auginimo mielių ląstelės surenkamos centrifuguojant 5 min. 1000xg kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, ląstelės plaunamos 2 mL vandens ir surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis. Pašalinus supernatantą ląstelės užpilamos 300 µL 1xLiAc/1xTE buferinio tirpalo, mėginiai švelniai sumaišomi.

### **2.2.4 Mielių transformacija**

Kiekvienai transformacijai naudojama 100 µL paruoštų kompetentinių ląstelių. Į kompetentines ląsteles pridedama 0,5–1 µg

plazmidinės DNR ir 600  $\mu\text{L}$  1xLiAc/1xTE/40%PEG4000 buferinio tirpalo. Mėginiai švelniai sumaišomi ir inkubuojami purtant 30 min. 30 °C temperatūroje. Po inkubacijos pridedama 70  $\mu\text{L}$  DMSO tirpalo, švelniai sumaišoma. Mėginiai veikiami karščio šoku inkubuojant 15 min. 42 °C temperatūroje, iškart po inkubacijos mėginiai perkeliama 2 min. į 4 °C temperatūrą. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 s 14000xg kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas ir ląstelės resuspenduojamos 1 mL skystos YPD. Ląstelės gaivinamos purtant 1 val 30 min. 30 °C temperatūroje. Po gaivinimo ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 s 14000xg kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, ląstelės resuspenduojamos 50  $\mu\text{L}$  1x TE buferio ir išsėjamos ant agarizuotų YPD lėkštelių su pridėtu genetikinu. K7 kamieno atrankai genetikino pridedama iki galutinės 400  $\mu\text{g/mL}$  koncentracijos, BY4741 – 300  $\mu\text{g/mL}$ , Rom K-100/M437/SRB-15-4 – 200  $\mu\text{g/mL}$ , K28 – 100  $\mu\text{g/mL}$ . Transformantai auginami dvi paras 30 °C temperatūroje.

### **2.2.5 *E. coli* kompetentinių ląstelių ruošimas**

Pasirinktas bakterijų kamienas nuo agarizuotos terpės perkeliama į 4 mL skystos LB terpės ir auginamas purtant 16–20 val. 37 °C temperatūroje. 50  $\mu\text{L}$  užaugusios kultūros perkeliama į 10 mL skystos LB terpės ir auginama purtant 1–2 val. 37 °C temperatūroje, kol kultūra pasiekia 0,5–0,7 o.v. optinį tankį ( $\lambda = 600$ ). Užaugusi ląstelių kultūra perkeliama į ledą, visos tolimesnės procedūros atliekamos mėginius laikant lede. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 1000xg 10 min. 4 °C temperatūroje. Supernatantas nupilamas, ląstelės resuspenduojamos ½ tūrio atšaldyto „Na“ tirpalo. Ląstelės sumaišomos ir surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas pašalinamas ir pridedama ½ tūrio atšaldyto „Ca“ tirpalo, ląstelės švelniai sumaišomos ir inkubuojamos 30–60 min. 4 °C temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas pašalinamas, ląstelės resuspenduojamos 1/20 tūrio atšaldyto „Ca“ tirpalo ir iki transformacijos laikomos 4 °C temperatūroje.

### **2.2.6 *E. coli* transformacija**

Kiekvienai transformacijai naudojama 50–100  $\mu\text{L}$  kompetentinių ląstelių. Kompetentinės ląstelės sumaišomos su 1–100 ng DNR ir inkubuojamos lede 15–30 min. Po inkubacijos mėginiai veikiami karščio šoku inkubuojant 2 min. 42 °C temperatūroje. Iš karto po karščio šoko

mėginiai perkeliama į 4 °C temperatūrą ir laikomi 2 min. Mėginiai sumaišomi su skysta LB terpe santykiu 1:10 ir 15–30 min. inkubuojami purtant 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos 1/10 mėginio tūrio išsėjama ant LB lėkštelių su pridėtu ampicilinu iki galutinės 100 µg/mL koncentracijos. Jeigu transformuojamas ligavimo mišinys, ląstelės surenkamos centrifuguojant 6000xg kambario temperatūroje, 9/10 supernatanto pašalinama, ląstelės resuspenduojamos likusioje LB terpėje ir išsėjamos ant LB lėkštelių su pridėtu ampicilinu (100 µg/mL). Išsėtos ląstelės auginamos 16–20 val. 37 °C temperatūroje.

### **2.2.7 Plazmidinės DNR gryninimas iš *E. coli* ląstelių**

Nedideli plazmidinės DNR kiekiai iš *E. coli* ląstelių buvo gryninami organinės ekstrakcijos būdu. Nedidelis kiekis (apie 0,5 cm<sup>2</sup> plotas) bakterijų nuo agarizuotos lėkštelės resuspenduojamas 100 µL 2X TE buferio. Į mėginius pridedama 200 µL NaOH/NDS tirpalo, mėginiai sumaišomi mėgintuvėlius invertuojant 4–6 kartus. Pridedama 150 µL 3 M NaAc (pH 7) ir 450 µL CHCl<sub>3</sub>, mėginiai sumaišomi mėgintuvėlius invertuojant 4–6 kartus. Organinė frakcija su ląstelių nuolaužomis atskiriama nuo vandeninės fazės mėginius centrifuguojant 10 min. 20000xg kambario temperatūroje. 350 µL viršutinės vandeninės fazės perkeliama į naują mėgintuvėlį ir DNR išsodinimui pridedama 350 µL 100 % izopropanolio. Centrifuguojama 10 min. 20000xg kambario temperatūroje, supernatantas pašalinamas. Nuosėdos plaunamos 150 µL 70 % etanolio. Centrifuguojama 5 min. 20000xg, supernatantas pašalinamas, nuosėdos džiovinamos ir tirpinamos 10–20 µL vandens.

### **2.2.8 Mielių žudymo fenotipo analizė**

Mielių žudymo fenotipo analizei naudojami jautrūs mielių kamienai. Iš literatūrinių šaltinių yra žinoma, jog *S. cerevisiae* α'1 kamienas yra jautrus įvairiems dgRNR virusų koduojamiems toksinams (Orentaitė *et al.*, 2016). Šio darbo metu žudymo fenotipo analizei atlikti, 10 µL naktinės *S. cerevisiae* α'1 kamieno kultūros buvo sumaišoma su 15 mL agarizuotos MD terpės ir paskleidžiama Petri lėkštelėje. Terpei sustingus užpilamas papildomas 3–5 mm storio MD terpės sluoksnis. Užauginama naktinė testinio kamieno kultūra, 3 µL naktinės kultūros sėjama ant paruoštos agarizuotos MD terpės. Priklausomai nuo testuojamo kamieno naudojama skirtingo rūgštingumo MD terpė. K7, Rom K-100, M437, SRB-15-4 kamienams – MD pH 4,7, K28 kamienai – MD pH 5,2. Lėkštelės



inkubuojamos 2–3 paras kambario temperatūroje. Jautrus mielių kamienas sudaro giluminę kultūrą standžioje terpėje, o aplink mieles turinčias žudymo fenotipu susidaro skirtingo dydžio skaidrios lizės zonos.

### **2.2.9 M1 viruso eliminacija iš K7 (LA-1, M1) kamieno**

M1 viruso eliminacija iš K7 kamieno vykdyta auginant mieles aukštesnėje nei įprasta temperatūroje. K7 kamieno ląstelės sėjamos iki pavienių kolonijų ant agarizuotos YPD terpės ir auginamos 37 °C temperatūroje dvi dienas. Užaugusios kolonijos persėjamos ant šviežios agarizuotos YPD terpės ir auginamos dar dvi dienas 37 °C temperatūroje. Vykdoma išgyvenusių kolonijų žudymo fenotipo analizė jas persėjant ant agarizuotos MD terpės turinčios giluminę jautraus *S. cerevisiae*  $\alpha'$ 1 kamieno kultūrą agare ir auginant 3 paras kambario temperatūroje. Iš kolonijų, kurios neturėjo žudymo fenotipo išgrynintos suminės ir dvigrandininės RNR frakcijos. M1 viruso eliminacija patvirtina atliekant RNR mėginių analizę elektroforezės agaroziniame gelyje metodu ir AT-PGR (reakcijai naudoti pradmenys M1-dir, M1-rev).

### **2.2.10 Densitometrinė analizė**

Santykiniai LA ir M virusų dgRNR kiekiai buvo įvertinti densitometrinės analizės būdu. Santykiniai nukleorūgščių kiekiai gali būti nustatomi iš agarozinių gelių vaizdų dėl tiesinės nukleorūgščių sudaromos juostelės ryškumo priklausomybės nuo joje esančių nukleorūgščių kiekio. Suminės RNR arba dgRNR mėginių elektroforezės agarozinių gelių vaizdai buvo analizuojami ImageJ (versija 1.52a) programine įranga. LA ir M dgRNR kiekis mėginyje normalizuojamas pagal to paties mėginio 18S ribosominės RNR kiekį (LA dgRNR arba M dgRNR kiekis dalinamas iš 18S RNR kiekio). Tiriamojo mėginio dgRNR kiekis lyginamas su kontrolinio mėginio dgRNR kiekiu (tiriamojo mėginio dgRNR kiekis dalinamas iš kontrolinio mėginio atitinkamos dgRNR kiekio). Kiekvieno mielių transformanto santykinis dgRNR kiekis apskaičiuojamas iš trijų biologinių replikų, kurių kiekvienai naudojamos trys techninės replikos (iš viso 9 mėginiai).

### **2.2.11 Statistinė analizė**

Densitometrinės analizės metu gauti santykiniai virusinės RNR kiekiai buvo įvertinti statistiškai naudojant R programinę įrangą (versija

R-3.6.2). Santykinių įverčių pasiskirstymo normalumas vienoje tiriamojoje grupėje įvertinas atliekant Shapiro-Wilk'o testą. Tiriamosios grupės ir kontrolinio mėginio įverčių skirtumo statistinis patikimumas įvertintas Stjudento  $t$  testu.  $P$  įverčiai žemesni už 0,05 laikomi statistiškai patikimais (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). Stačiakampės diagramos nubraižytos naudojant R programinės įrangos paketą ggplot2.

### **2.2.12 LA virusinių baltymų variabilių sričių identifikavimas**

Keturių skirtingų LA virusų (LA-1, identifikavimo nr. [J04692](#); LA-2, identifikavimo nr. [KC677754](#); LA-lus, identifikavimo nr. [JN819511](#); LA-28, identifikavimo nr. [KU845301](#)) baltyminių sekų palyginys sukurtas Unipro UGene programine įranga (versija 34.0), taikyti automatiniai nustatymai. Sekos turinčios mažiausią procentinį identiškumą buvo pasirinktos konstruojant chimerinių baltymų raiškos vektorius.

### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. LA virusų trumpintų kapsidinių baltymų sintezės įtaka LA ir M virusų palaikymui mielėse

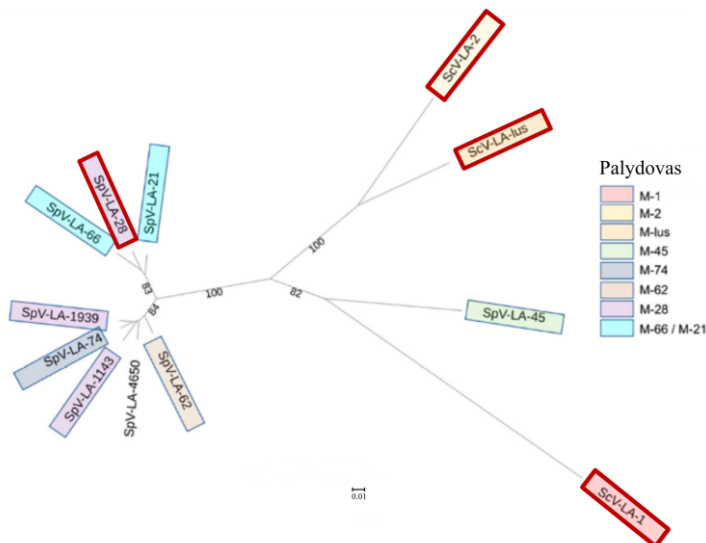
*Saccharomyces* genties mielėse aptinkami *Totiviridae* šeimai priskiriami LA ir M virusai (Drinnenberg *et al.*, 2011; Rowley *et al.*, 2016). Šie ekstraląstelinės fazės neturintys virusai mielėse įprastai palaikomi stabiliai ir plinta ląstelių dalijimosi ar susiliejiimo metu (Rowley, 2017). Nepaisant to, literatūroje minimi įvairūs LA ir M replikaciją trikdantys veiksniai (Ridley ir Wickner, 1983; Esteban ir Wickner, 1988; Valle ir Wickner, 1993; Yao ir Bruenn, 1995; Ribas ir Wickner, 1998; Taylor ir Bruenn, 2009; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013; Rodríguez-Cousino ir Esteban, 2017). Vienas iš jų yra konstitutyvi LA-1 viruso trumpinto kapsidinio Gag baltymo sintezė (Yao ir Bruenn, 1995; Ribas ir Wickner, 1998). Pilno ilgio Gag kapsidinis baltymas yra sudarytas iš 680 a.r., iš kurių pirmosios 651 a.r. sudaro struktūrizuotą baltymo dalį, o C-galinės 29 aminorūgštys yra nestruktūrizuotos (Naitow *et al.*, 2002). Yao ir kolegų atliktų tyrimų metu nustatyta, jog padidinta 473 a.r. ilgio Gag baltymo sintezė sukelia natyvių LA-1 ir M1 virusų eliminaciją, tačiau ilgesnių nei 603 a.r. ar trumpesnių nei 473 a.r., Gag baltymų sintezė neturi įtakos natyvaus LA-1 viruso palaikymui ląstelėje (Yao ir Bruenn, 1995). Tuo tarpu kitos mokslinės grupės tyrimai parodė, jog 635–665 a.r. ilgio kapsidinio baltymo sintezė lemia M virusų eliminaciją iš mielių ląstelių. Trumpesnių, 52 a.r. C-galo deleciją turinčių Gag baltymų sintezė, M1 viruso palaikymo mielėse nesutrikdo (Ribas ir Wickner, 1998). Nesutampantys rezultatai galėjo būti gauti dėl skirtingos taikytos metodikos ir besiskiriančių tyrimų objektų. Taip pat buvo nustatyta, jog pavieniai trumpinti Gag baltymai kapsidžių nesudaro, tačiau geba sudaryti chimerines virusines daleles su laukinio tipo virusiniais Gag ir GagPol baltymais. Tiesa, Gag baltymai, turintys didesnę nei 73 a.r. C-galo deleciją chimerinių virusinių dalelių su laukinio tipo baltymais nesudaro (Yao ir Bruenn, 1995; Ribas ir Wickner, 1998).

Mūsų grupės atliktų tyrimų metu buvo nustatyta, jog LA-1 viruso Gag baltymo, kurio 39 a.r. C-galo pakeistos 21 a.r. ilgio afininių gryninimo inkarų seka, sintezė lemia natyvaus LA-1 viruso eliminaciją iš laboratorinio *S. cerevisiae* BY4741 (LA-1) kamieno. Trumpinti LA-1 viruso kapsidiniai baltymai kartu su laukinio tipo LA-1 viruso kapsidiniais baltymais formuoja

tuščias, genomo nepakuojančias, virusines daleles. Tokios virusinės dalelės, galėtų susidaryti, jeigu sulietiniai GagPol baltymai būtų neįtraukiami į susidarančią virusinę dalelę (Konovalovas, 2018). Iki šiol nebuvo žinoma, ar toks natyvių LA ir M virusų eliminacijos procesas yra priklausomas nuo specifinės LA ir M virusų sistemos. Šio darbo metu, siekiant iširti trumpintų kapsidinių baltymų sąveikos su natyviais LA ir M virusais specifiškumą, buvo įvertinta skirtingų LA virusų trumpintų kapsidinių baltymų sintezės įtaka įvairių *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* kamienuose aptinkamų LA ir M virusų palaikymui mielėse.

### 3.1.1 LA-1 viruso trumpinto kapsidinio baltymo sintezės įtaka LA ir M virusų palaikymui mielėse

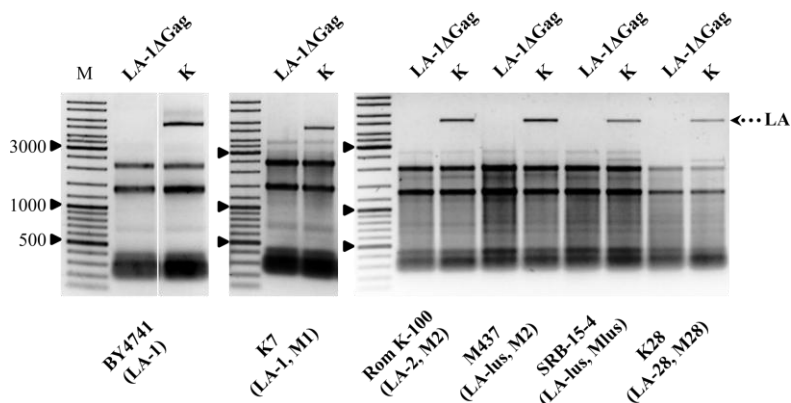
Gamtoje aptinkami skirtingose *Saccharomyces* mielių rūšyse paplitę LA ir M virusų variantai. Mūsų grupės darbai sutelkti į *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielėse aptinkamų LA ir M virusų sistemų tyrimus. Remiantis filogenetine *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* kamienuose aptinkamų LA virusų analize nustatyta, jog *S. paradoxus* aptinkami virusai grupuojasi kartu taip sudarydami dvi filogenetines grupes. Išimtinis atvejis yra SpV-LA-45 virusas, kuris su kitais *S. paradoxus* rūšies LA virusais nesigrupuoja. *S. cerevisiae* aptinkami LA virusai, lyginant su *S. paradoxus* rūšiai būdingais virusais, yra labiau nutolę vienas nuo kito ir taip pat sudaro dvi filogenetines grupes (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018) (**3.1 pav.**). Šiame darbe aprašomi



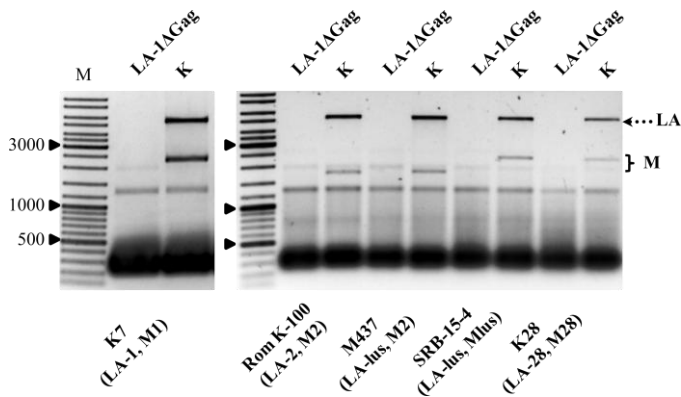
**3.1 pav.** *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielėse aptinkamų LA virusų filogenetinis medis (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). Šiame darbe tirti virusai pažymėti raudona spalva.

visų iki šiol žinomų *S. cerevisiae* mielėms būdingų LA virusų (LA-1, LA-2, LA-lus) ir vieno *S. paradoxus* mielėms būdingo LA-28 viruso tyrimai. Tirti virusai, pagal jų koduojamų baltymų panašumą, priskiriami trims filogenetinėms grupėms.

Siekiant įvertinti trumpinto LA-1 Gag baltymo sintezės įtaką skirtingiems natyviems LA virusams, sukurtas Gag baltymo turinčio 39 a.r. C-galo deleciją raiškos vektorius. Trumpintą kapsidinį baltymą koduojančios RNR raiška nuo vektoriaus yra reguliuojama stipriu konstitutyviu TEF1 ( $P^{TEF1}$ ) promotoriumi. PYAK-G-LA1ΔGag ir pYAK-G („tuščia“ kontrolinė plazmidė) raiškos vektoriais transformuoti penki, skirtingas virusines sistemas palaikantys, *S. cerevisiae* kamienai (BY4741 (LA-1), K7 (LA-1, M1), Rom K-100 (LA-2, M2), M437 (LA-lus, M2), SRB-15-4 (LA-lus, Mlus)) ir vienas *S. paradoxus* kamienas (K28 (LA-28, M28)). BY4741 (LA-1) ir K7 (LA-1, M1) kamienai yra plačiai įvairiuose tyrimuose ar industrijoje pritaikomi laboratoriniai kamienai, tuo tarpu visi kiti tyrimo metu naudoti kamienai yra iš gamtinių buveinių išskirti laukiniai kamienai. Trumpinto kapsidinio baltymo sintezės įtaka natyvių LA ir M virusų palaikymui mielėse stebėta analizuojant transformantų suminės (3.2 pav.) ir dvigrandinės RNR (3.3 pav.) frakcijas elektroforezės agaroziniame gelyje metodu. Suminės RNR mėginių elektroforeziniuose geliuose, kuomet kamienai transformuojami kontroliniu tuščiu vektoriumi, matoma aiški LA virusų dgRNR genomo sudaroma juostelė. Vykdam trypinto Gag baltymo sintezę, natyvus LA virusas eliminuojamas ir viruso genomines dgRNR frakcija nestebima. Analogiški rezultatai gauti ir M viruso atveju.

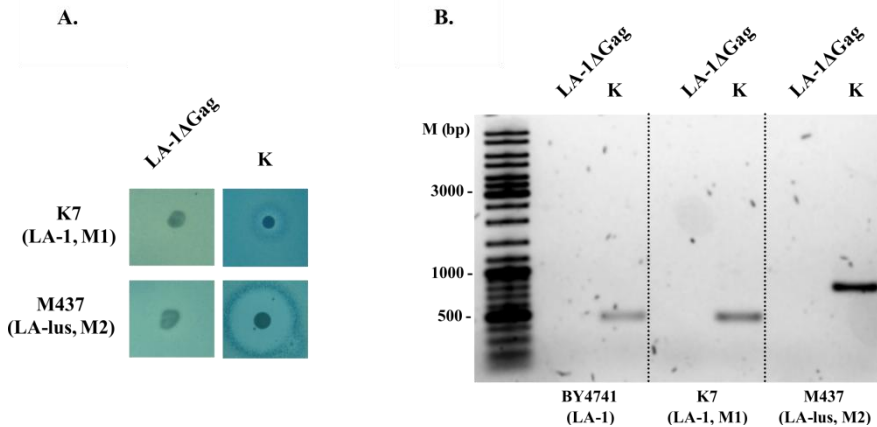


**3.2 pav.** Suminės RNR mėginiai, gryninti iš pYAK-G-LA1ΔGag (paveiksle žymima – LA-1ΔGag) ir pYAK-G (paveiksle žymima – K) plazmidėmis transformuotų mielių kamienų. Paveikslų apačioje nurodyti kamienai, M – DNR dydžio standartas („GeneRuler DNA Ladder Mix“, Thermo Scientific) bazių poromis.



**3.3 pav.** DgRNR išsodinta iš pYAK-G-LA1ΔGag (paveiksle žymima – LA-1ΔGag) ir pYAK-G (paveiksle žymima – K) plazmidėmis transformuotų mielių kamienų. Paveikslų apačioje nurodyti kamieniai. LA ir M žymi atitinkamas virusinės dgRNR frakcijas, M – DNR dydžio standartas („GeneRuler DNA Ladder Mix“, Thermo Scientific) bazių poromis.

Satelitinių M virusų eliminacijos patvirtinimui tirtas pYAK-G-LA-1ΔGag plazmide transformuotų kamienų žudymo fenotipas (**3.4 pav., A.**). Ant agarizuotos MD terpės turinčios giluminę jautraus *S. cerevisiae* α<sup>1</sup> mielių kamieno kultūrą sėti tiriamieji kamieniai. Mielės, palaikančios LA ir M virusus, turi biocidinį aktyvumą, todėl formuoja skaidrias lizės zonas. Visi tyrime naudoti kamieniai transformuoti



**3.4 pav. A.** Mielių kamienų, transformuotų pYAK-G-LA-1ΔGag (paveiksle žymima – LA-1ΔGag), pYAK-G (paveiksle žymima – K) raiškos vektoriais, žudymo fenotipo tyrimas. Kontroliniuose mėginiuose matomos skaidrios dėl biocidinio aktyvumo susiformavusios lizės zonos. **B.** LA-1 (461 bp) ir LA-lus (776 bp) virusų genomų regionų amplifikacijos AT-PGR metodu rezultatai, reakcijoje naudota RNR išskirta iš mielių kamienų transformuotų pYAK-G-LA-1ΔGag (paveiksle žymima – LA-1ΔGag) ir pYAK-G (paveiksle žymima – K) raiškos vektoriais. M – DNR dydžio standartas („GeneRuler DNA Ladder Mix“, Thermo Scientific) bazių poromis.

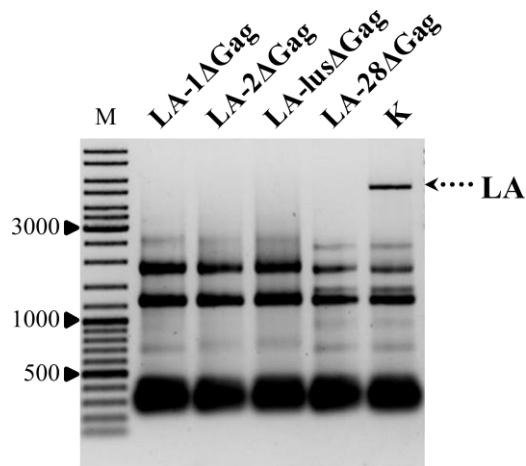
pYAK-G-LA-1ΔGag raiškos vektoriais prarado žudymo fenotipą (duomenys nepateikti).

LA virusų eliminacija iš BY4741 (LA-1), K7 (LA-1, M1) ir M437 (LA-lus, M2) kamienų taip pat tirta AT-PGR metodu. Tiksliniai nuo LA-1 arba LA-lus viruso kopijinės DNR PGR metodu padauginami fragmentai gauti tik kontroliniuose mėginiuose, tuo tarpu pYAK-G-LA-1ΔGag raiškos vektoriumi transformuotų mielių mėginiuose tikslinio dydžio fragmentas nesusidarė (**3.4 pav., B.**). AT-PGR duomenys patvirtina, jog trumpintų kapsidinių baltymų sintezė sukelia įvairių natyvių LA virusų eliminaciją iš skirtingų mielių kamienų.

39 a.r. C-galo deleciją turinčio LA-1 Gag baltymo sintezė lemia skirtingų natyvių LA virusų eliminaciją, dėl to vyksta ir satelitinio M viruso praradimas. LA-1 viruso trumpinto Gag baltymo sintezės sukeliamą natyvių virusų eliminaciją nepriklauso nuo natyvaus viruso tipo. Taigi galima daryti prielaidą, jog trumpinti LA-1 kapsidiniai baltymai geba sąveikauti su kitų tipų LA virusų kapsidiniais baltymais, taip sudarydami nefunkcionalias virusines daleles ir lemdami natyvių virusų eliminaciją.

### **3.1.2 LA-2, LA-lus ir LA-28 virusų trumpintų kapsidinių baltymų sintezės įtaka natyvių LA ir M virusų palaikymui mielėse**

LA-1 trumpinto rekombinantinio kapsidinio baltymo sintezė, nepriklausomai nuo natyvaus LA viruso tipo, sutrikdo natyvių LA virusų palaikymą ląstelėje. Išsamesniems šio fenomeno tyrimams pagal pYAK-G-LA1ΔGag vektorių sukurti raiškos vektoriai koduojantys trumpintus LA-2, LA-lus ir LA-28 virusų Gag baltymus. Šiais vektoriais ir kontroliniu vektoriumi transformuoti anksčiau paminėti kamienai ((BY4741 (LA-1), K7 (LA-1, M1), Rom K-100 (LA-2, M2), M437 (LA-lus, M2), SRB-15-4 (LA-lus, Mlus), K28 (LA-28, M28)). Iš gautų transformantų išgrynintos suminės ir dvigrandinės RNR elektroforezės agaroziniame gelyje analizė parodė, jog visų tyrimo metu naudotų baltymų sintezė sukelia natyvių LA ir M virusų eliminaciją iš ląstelės (**3.5 pav.**). Minėtais baltymų raiškos vektoriais transformuoti kamienai prarado žudymo fenotipą (duomenys nepateikti). Gauti duomenys patvirtina, jog trumpintų LA virusų Gag baltymų sintezės sukeliamą natyvių virusų eliminaciją nepriklauso nuo endogeninio LA viruso ar rekombinantinių kapsidinių baltymų tipo.



**3.5 pav.** Suminės RNR mėginiai, išgryninti iš K7 kamieno transformuoto skirtingus LA virusų trumpintus kapsidinius baltymus koduojančiais (žymima LA-1ΔGag, LA-2ΔGag, LA-lusΔGag, LA-28ΔGag) ir kontroliniu (pYAK-G –žymima K) vektoriais. Rodykle žymimas LA dgRNR genomas. M – DNR dydžio standartas („GeneRuler DNA Ladder Mix“, Thermo Scientific) bazių poromis.

### 3.1.3 Universalus natyvių LA ir M virusų eliminacijos metodas

Literatūroje dažniausiai minimi keli LA virusų eliminacijos metodai: mielių auginimas aukštesnėje nei optimali temperatūra, veikimas cikloheksimidu arba 5-fluoruracilu (Fink ir Styles, 1972; Tipper ir Schmitt, 1991; Weinstein *et al.*, 1993). Visi šie metodai gali veikti mielių ląsteles citotoksiškai (Sakaki *et al.*, 2003; Seiple *et al.*, 2006; Hoskins ir Butler, 2007; Saint-Georges *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2019). Taip pat žinoma, jog kai kurie LA virusų variantai yra atsparūs karščiui ir jų eliminacija šiuo metodu nėra galima (Weinstein *et al.*, 1993; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013). Minėti natyvių LA ir M virusų eliminacijos metodai taip pat yra sunkiai valdomi, dažnai tik nedidelė mielių kolonijų dalis praranda virusus, arba mielės būna pažeidžiamos per stipriai.

Natyvių LA ir M virusų eliminacijos metodas naudojant rekombinantinių trumpintų kapsidinių baltymų sintezę yra itin efektyvus ir neturėtų mielių ląstelių veikti citotoksiškai. Vykdam įvairius -omikos tyrimus, dėl jų jautrumo, ruošiant tiriamuosius mėginius ypatingai svarbu pasirinkti tinkamą metodiką. Siekiant įvertinti LA ir M virusų įtaką ląstelės-šeiminkės genų raiškai mūsų grupė kartu su E. Servienės grupe atliko palyginamuosius M437 (LA-lus, M2) kamieno transkriptominius tyrimus (Lukša *et al.*, 2017). LA-lus virusas yra atsparus karščiui



(Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013), todėl norint sėkmingai eliminuoti LA-lus virusą reikėjo pasirinkti alternatyvų virusų eliminacijos metodą. Natyvių LA ir M virusų eliminacijos dėl trumpintų kapsidinių baltymų sintezės metodas buvo pritaikytas ruošiant M437 kamieną be endogeninių LA-lus ir M2 virusų. Paruoštas kamienas panaudotas palyginamuosiuose transkriptominiuose tyrimuose. Transkriptominiai tyrimai parodė, jog virusų palaikymas mielėse lemia išaugusią su aminorūgščių ir lipidų biosinteze, ląsteliniu transportu ir energijos produkcija susijusių genų raišką bei sumažėjusią ribosomų biogenezės ir atsako į stresą genų raišką (Lukša *et al.*, 2017). Šis metodas taip pat buvo pritaikytas ruošiant proteominiuose tyrimuose pritaikytą kontrolinį LA-1 viruso neturintį BY4741 ( $\Delta$ LA-1) kamieną. Proteominių tyrimų metu identifikuoti 329, galimai su LA viruso kapside sąveikaujantys ląstelės-šeimininkės baltymai, kurie buvo priskirti trimis sąveikos grupėms: su Gag baltymu, su Gag baltymo C-galu ir su viruso nukleokapsidės vidaus struktūromis sąveikaujantys baltymai. Nustatyta, jog iš identifikuotų baltymų, trylika jų, reguliuoja natyvaus LA viruso genomo kiekį ląstelėje (Konovalovas, 2018).

### **3.2 Rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sąveika su natyviomis LA ir M virusų sistemomis**

Mielėse įprastai aptinkama tik vieno tipo LA ir M virusų sistema. Skirtingus LA virusus palaikančių mielių citodukcinių ir kryžminimo eksperimentų metu pastebėta LA virusų tarpusavio konkurencija. Po mielių ląstelių suliejimo, naujai susidariusioje ląstelėje palaikomas tik vieno tipo LA virusas (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013; Rodriguez-Cousino ir Esteban, 2017). Panašus konkurencinis efektas pastebėtas rekombinantinių LA-1 viruso baltymų sintezės metu. Rekombinantinių LA-1 viruso Gag ir GagPol baltymų sintezė sutrikdo natyvaus LA-1 viruso palaikymą ląstelėje (Valle ir Wickner, 1993). Nepaisant to, nuo raiškos vektoriaus sintetinami LA-1 virusiniai baltymai yra funkcionalūs ir geba palaikyti M1 viruso replikaciją (Wickner *et al.*, 1991). Išsamesnių tyrimų metu nustatyta, jog natyvių LA-1 virusų eliminacija vyksta dėl rekombinantinių virusinių baltymų sintezės, bet ne iRNR raiškos (Valle ir Wickner, 1993). Taip pat šiam procesui vykti būtini funkcionalūs Gag ir GagPol baltymai (Valle ir Wickner, 1993; Yao *et al.*, 1995). Tik Gag arba tik GagPol baltymų sintezė nėra pakankamas veiksnys natyvių LA-1 virusų palaikymui mielėse sutrikdyti (Valle and Wickner, 1993). Tyrimų autoriai endogeninio LA-1 viruso replikacijos interferenciją sieja su rekombinantinių baltymų ir natyvių virusinių baltymų

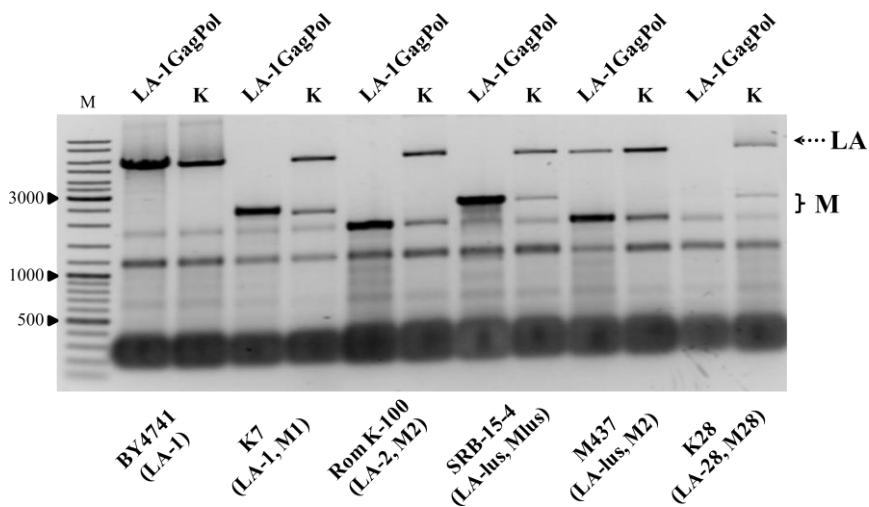
tarpusavio konkurencija dėl ląstelės-šeimininkės baltymų, būtinų virusų transkripcijai bei replikacijai vykti.

LA virusų sąveikos su skirtingomis LA ir M virusų sistemomis specifiškumas ir jį lemiančios priežastys iki šiol nėra pilnai ištytos. Literatūroje aprašomi skirtingų LA virusų tarpusavio konkurencijos tyrimai mieles kryžminant tarpusavyje ar jas suliejant citodukcijos būdu (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013; Rodriguez-Cousino ir Esteban, 2017). Suliejant mielių ląsteles perduodami ne tik natyvūs LA virusai, bet ir mitochondrijos bei kiti citoplazminiai elementai, o tai gali sukelti įvairius fenotipinius pokyčius ir tokiu būdu apsunkinti virusų tarpusavio sąveikos tyrimus (Mazar *et al.*, 2000; Montanari *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2015). Šiame darbe LA virusų sąveikos su natyviais LA ir M virusais tyrimams pritaikyti LA virusų baltymus koduojantys raiškos vektoriai, taip nesukeliant papildomų pokyčių tiriamuosiuose kamieniuose ir išlaikant nekintančią genetinę aplinką. Taip pat įvertinta M viruso palaikymo mielėse įtaka rekombinantinių LA baltymų sąveikai su natyviais LA virusais.

### **3.2.1. Skirtingų LA virusų Gag ir GagPol baltymų sintezės įtaka LA ir M virusų palaikymui mielėse**

Siekiant iširti LA-1 viruso koduojamų Gag ir GagPol baltymų sąveikos su natyviais LA ir M virusais specifiškumą, buvo sukurtas LA-1 virusinių baltymų raiškos vektorius ir įvertinta rekombinantinių baltymų įtaka natyvių virusinių sistemų palaikymui mielėse. LA-1 viruso koduojančios RNR kopijinės DNR seka įklonuota į pYAK-G raiškos plazmidę. Rekombinantinius baltymus koduojančios RNR raiška nuo plazmidės kontroliuojama konstitutyviu TEF1 ( $P^{TEF1}$ ) promotoriumi. Sukurtu raiškos vektoriumi transformuoti skirtingus LA ir M virusus palaikantys kamieniai ((BY4741 (LA-1), K7 (LA-1, M1), Rom K-100 (LA-2, M2), M437 (LA-lus, M2), SRB-15-4 (LA-lus, Mlus), K28 (LA-28, M28)). Rekombinantinių baltymų sintezės įtaka natyviems LA ir M virusams įvertinta, analizuojant suminės ir dvigrandinės RNR frakcijas elektroforezės agaroziniame gelyje metodu.

Rezultatų analizė parodė, jog rekombinantinių LA-1 virusinių baltymų sintezė lemia K7 (LA-1, M1), Rom K-100 (LA-2, M2), SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) ir K28 (LA-28, M28) kamieniuose palaikomų endogeninių LA virusų eliminaciją bei padidėjusį satelitinių M virusų genomų kopijų kiekį (išskyrus K28 (LA-28, M28) kamieną) (3.6 pav.).



**3.6 pav.** DgRNR mėginiai, išgryninti iš tiriamųjų kamienų (nurodyta paveikslė apačioje) transformuotų LA-1 virusinių Gag ir GagPol baltymų raiškos bei kontroliniu vektoriumi. K – kontrolinė plazmidė (pYAK-G), LA1-GagPol – LA-1 virusinių baltymų raiškos vektorius. M – DNR dydžio standartas („GeneRuler DNA Ladder Mix“, Thermo Scientific) bazių poromis.

Rezultatai gauti vykdant LA-1 rekombinantinių baltymų sintezę, dėl kurios sukeliama natyvių LA-28 virusų eliminacija, atitinka neseniai literatūros šaltiniuose publikuotus rezultatus. Rodríguez-Cousino su kolegomis nustatė, jog LA-1 rekombinantinių baltymų sintezė sutrikdo natyvaus LA-28 viruso palaikymą mielėse ir lemia išaugusį M28 satelito dgRNR genomo kiekį (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017). Šiame darbe atliktuose tyrimuose M28 viruso genomo akumuliacija dėl LA-1 virusinių baltymų sintezės nestebima. Nesutampantys rezultatai galėjo būti gauti dėl tyrimuose naudotų genetinė aplinka besiskiriančių kamienų.

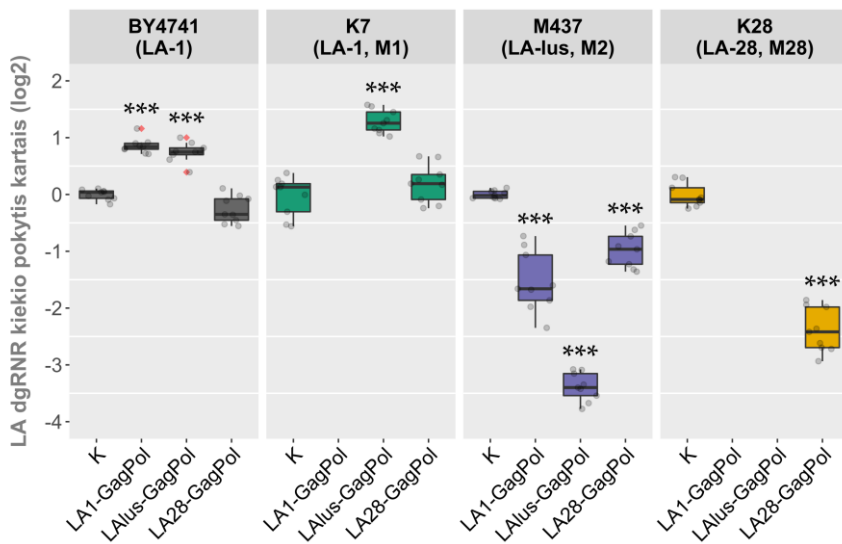
LA-1 rekombinantinių baltymų sintezė nesutrikdo natyvių LA virusų palaikymo M437 (LA-lus, M2) kamiene, o BY4741 (LA-1) kamiene netebima natyvaus LA-1 viruso dgRNR genomo akumuliacija (**3.6 pav.**). Natyvių LA virusų eliminacija dėl Gag ir GagPol baltymų sintezės gali būti priklausoma nuo mielių kamienų genetinės aplinkos ar specifinės skirtingų virusų sąveikos, tai galėtų būti priežastis lemianti LA virusų eliminaciją tik tam tikruose tirtuose kamienuose.

Detalesniems endogeninių LA virusų palaikymo mielėse sutrikdymo dėl rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezės tyrimams pritaikyta

natyvių virusų genomo kiekio pokyčio skaitinio ir statistinio įvertinimo metodika. Natyvių LA ir M virusų genomo kiekio pokyčiai dėl rekombinantinių baltymų sintezės vertinti analizuojant suminės ir/ar dvigrandinės RNR frakcijas elektroforezės agaroziniame gelyje būdu. Kiekvieno transformanto atveju gryninta po tris suminės RNR mėginius iš trijų pavienių kolonijų (iš viso devyni mėginiai). Natyvių virusų santykiniai genomo kiekiai apskaičiuoti densitometrinės analizės būdu, o dgRNR kiekis normalizuotas pagal 18S rRNR kiekį. Santykiniai virusinių genomų dgRNR kiekiai lyginti su kontroliniais mėginiais.

Eliminacijos proceso specifiškumo tyrimams pagal anksčiau minėtą schemą sukurti LA-lus ir LA-28 virusų baltymus koduojantys raiškos vektoriai. Šiais raiškos vektoriais transformuoti visi anksčiau minėti, skirtingus LA ir M virusus palaikantys, kamienai. Gauti rezultatai parodė, jog LA-lus ir LA-28 virusų, kaip ir LA-1 viruso, rekombinantinių baltymų sintezė eliminuoja ne visus laukiniuose kamienuose palaikomus LA virusus. BY4741 (LA-1) ir M437 (LA-lus, M2) kamienuose nepriklausomai nuo rekombinantinių baltymų sintezės endogeniniai LA-1 ir LA-lus virusai palaikomi stabiliai. M437 (LA-lus, M2) kamiene rekombinantinių baltymų sintezė lemia natyvaus LA-lus viruso genomo kiekio redukciją. Tuo tarpu BY4741 (LA-1) kamiene, vykstant LA-1 ir LA-lus baltymų sintezei, stebimas natyvaus LA-1 genomo kiekio padidėjimas (**3.7 pav.**). Toks rezultatas atitinka literatūroje aprašomus tyrimus, kuriais nustatyta, jog padidinta LA-1 Gag baltymo sintezė sukelia natyvaus LA-1 viruso genomo akumuliaciją (Wickner *et al.*, 1991). Padidinta kapsidinių baltymų sintezė BY4741 (LA-1) kamiene galėtų lemti efektyvesnę natyvių virusų replikaciją, todėl išaugtų virusinės dgRNR kiekis. Toks išskirtinis rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezės efektas minėtame kamiene gali būti susijęs su tuo, jog jame nepalaikomas M1 satelitas. Nesant M viruso, nesukeliama konkurencija tarp LA-1 ir M1 virusų dėl replikacijai būtinų LA viruso koduojamų baltymų. Tokia konkurencija galėtų būti vienas iš natyvaus LA viruso palaikymą ląstelėje sutrikdančių veiksnių. K7 (LA-1, M1) kamiene rekombinantinių LA-lus virusinių baltymų sintezė sukelia natyvaus LA-1 genomo dgRNR kiekio padidėjimą. LA-28 viruso rekombinantinių baltymų sintezė neeliminuoja natyvių LA virusų K7 (LA-1, M1) ir K28 (LA-28, M28) kamienuose (**3.7 pav.**).

Remiantis gautais rezultatais galima teigti, jog endogeninių virusų palaikymo ląstelėje sutrikdymas dėl rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezės priklauso nuo specifinės virusų sistemos ar mielių kamieno genetinės aplinkos. Molekuliniai procesai, lemiantys šio tipo natyvių virusų eliminaciją, skiriasi nuo trumpintų kapsidinių baltymų sintezės sukeliama natyvių virusų eliminacijos proceso, kuris vyksta nepriklausomai nuo virusų tipo ar jų šeimininkų genetinės aplinkos. Įdomu, jog nei vienomis atlikto tyrimo sąlygomis, dviejuose iš tirtų kamienų (BY4741 (LA-1) ir M437 (LA-lus, M2)) natyvių LA virusų replikacija mielėse dėl rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezės nesutrikdoma. BY4741 (LA-1) kamienas nuo kitų tyrime naudotų kamienų išsiskiria tuo, jog jame nėra palaikomas satelitinis M virusas. Tuo tarpu M437 (LA-lus, M2) kamienne aptinkama unikali virusinė sistema, sudaryta iš LA-lus viruso ir M2 palydovo, nors gamtoje paprastai LA-lus virusai aptinkami tik su sau būdingais Mlus palydovais (Lukša *et al.*, 2017). Neįprastos LA ir M virusų sistemos palaikymas M437 (LA-lus, M2) kamienne galėtų būti susijęs su specifine



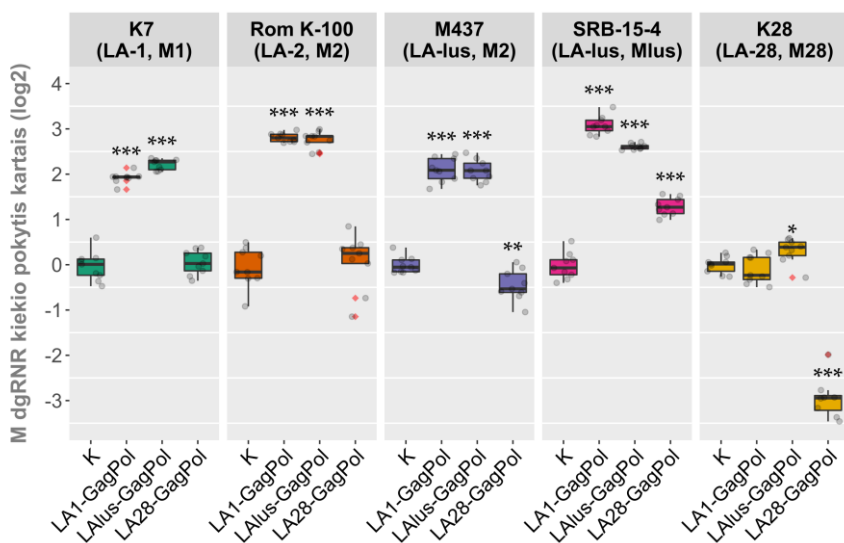
**3.7 pav.** Santykiniai natyvių LA virusų dgRNR genomų kiekio pokyčiai sukelti LA virusų rekombinantinių baltymų sintezės. Santykinis LA geno kiekio pokytis nepateikiamas K7 (LA-1, M1) ir K28 (LA-28, M28) kamienų transformuotų atitinkamai LA-1 ir LA-1 bei LA-lus virusų baltymų raiškos vektoriais, nes natyvaus LA dgRNR geno frakcija šiuose mėginiuose nestebima. Stačiakampės histogramos viršuje nurodyti tiriamieji kamieniai, x ašyje nurodomi naudoti LA virusų baltymų raiškos vektoriai (K – kontrolinis vektorius pYAK-G), y ašyje nrodomas santykinis LA dgRNR kiekio pokytis kartais ( $\log_2$  skalėje), pilkais taškais žymimi pavienių mėginių įverčiai, raudonais taškais žymimi į analizę neįtraukti įverčiai (angl. *outliers*). Duomenų statistinis patikimumas įvertintas pagal Stjudento *t* testą: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $0.001 \leq p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

kamieno genetinė aplinka. Specifinė genetinė aplinka ir išskirtinė M437 (LA-lus, M2) kamieno virusinė sistema galėtų lemti stabilų, rekombinantinių LA baltymų raiškos nesutrikdomą, virusų palaikymą mielėse.

Iš literatūrinių šaltinių yra žinoma, jog rekombinantiniai LA-1 viruso baltymai gali palaikyti M1 satelitinio viruso replikaciją (Wickner *et al.*, 1991). Šio tyrimo metu, pritaikant densitometrinę analizę, buvo įvertintas LA-1, LA-lus ir LA-28 virusų rekombinantinių baltymų gebėjimas replikuoti skirtingus M satelitinius virusus. LA-1 ir LA-lus rekombinantinių baltymų sintezė visuose tirtuose kamienuose, išskyrus K28 (LA-28, M28) kamieną, lėmė žymų natyvaus M viruso genomo kiekio padidėjimą nuo 3,8 iki 8,5 kartų. Kadangi tiriamuosiuose kamienuose daugeliu atvejų eliminuojamas natyvus LA virusas, galima teigti, jog LA-1 ir LA-lus virusų rekombinantiniai baltymai geba efektyviai atpažinti ir padauginti skirtingus M satelitinius virusus. Tuo tarpu LA-28 viruso rekombinantinių baltymų sintezė, išskyrus SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) ir K28 (LA-28, M28) kamienuose, žymių natyvių M virusų genomų kiekio pokyčių nesukėlė. Toks, išskirtinis, rekombinantinių LA-28 viruso baltymų efektas natyviems M virusams gali būti lemtas specifinės LA-28 viruso sąsajos su *S. paradoxus* mielėmis. Nepaisant to, LA-28 viruso rekombinantinių baltymų sintezė sukelia natyvių LA virusų eliminaciją Rom K-100 (LA-2, M2) ir SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) kamienuose, tačiau M virusai palaikomi stabiliai (**3.8 pav.**). Remiantis gautais rezultatais, galima teigti, jog rekombinantiniai LA-28 viruso baltymai geba atpažinti ir replikuoti sau nespecifinius M2 ir Mlus satelitinius virusus. K28 (LA-28, M28) kamiene rekombinantinių LA-28 viruso baltymų sintezė lemia M28 viruso genomo kiekio redukciją. Toks rezultatas yra netikėtas, kadangi LA-28 viruso rekombinantiniai baltymai turėtų sėkmingai palaikyti sau specifiską M28 palydovą. Mūsų laboratorijoje buvo pastebėta, jog K28 (LA-28, M28) kamiene M28 virusas gali būti pametamas spontaniškai, o tai gali reikšti, jog šiame kamiene palaikoma virusų sistema yra jautri bet kokiems aplinkoje ar ląstelės viduje vykstantiems pokyčiams. Tai galėtų būti viena iš priežasčių, kodėl LA-28 viruso rekombinantinių baltymų sintezė sukelia M28 viruso genomo kiekio sumažėjimą.

Gamtoje LA virusai dažniausiai lydimi jiems savitų satelitinių M virusų. Esteban su kolegomis iškėlė LA ir M virusų koevoliucijos hipotezę, kuri teigia, jog LA ir M virusai dėl koevoliucijos bendrame šeimininke išvystė specifiskumą, dėl to LA virusai geba palaikyti tik sau būdingus M

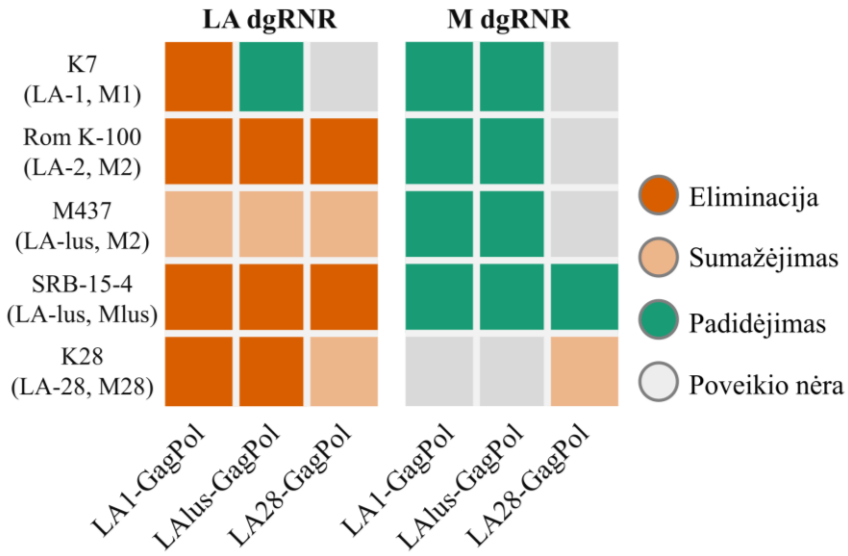
virusus (Rodriguez-Cousino ir Esteban, 2017). Tačiau literatūros šaltiniuose minimas ne vienas atvejis, kai LA virusai geba replikuoti jiems nespecifinius M palydovus (Hannig *et al.*, 1985; Schmitt ir Tipper, 1990; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013; Lukša *et al.*, 2017). Koevoliucijos hipotezės autorių teigimu, LA virusai geba palaikyti nespecifinius M virusus tik rekombinantinių baltymų sintezės ar *ski* genų mutacijų atvejais (Rodriguez-Cousino ir Esteban, 2017). Nepaisant to, jeigu LA virusai itin specifiški savo satelitams, aktyvesnė virusinių baltymų sintezė neturėtų būti pakankama skirtingų satelitų replikacijai ir palaikymui ląstelėje. Remiantis šio darbo rezultatais, skirtingi LA virusai geba palaikyti įvairius, net su skirtingomis mielių rūšimis siejamus, M virusus.



**3.8 pav.** Santykiniai natyvių M virusų dgRNR genomų kiekio pokyčiai sukelti LA virusų rekombinantinių baltymų sintezės. Stačiakampės histogramos viršuje nurodyti tiriamieji kamieniai, x ašyje nurodomi naudoti LA virusų baltymų raiškos vektoriai (K – kontrolinis vektorius pYAK-G), y ašyje nurodomas santykinis M dgRNR kiekio pokytis kartais ( $\log_2$  skalėje), pilkais taškais žymimi pavienių mėginių įverčiai, raudonais taškais žymimi į analizę neįtraukti įverčiai (angl. *outliers*). Duomenų statistinis patikimumas įvertintas pagal Stjudento *t* testą: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $0.001 \leq p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Natyvių LA virusų palaikymo mielėse sutrikdymas dėl rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezės galimai yra glaudžiai susijęs su M satelitinio viruso palaikymu ląstelėje ir rekombinantinių baltymų gebėjimu atpažinti ir replikuoti natyvų M virusą. LA-1 ir LA-lus virusų rekombinantinių baltymų sintezė daugeliu atvejų sukelia natyvių LA virusų eliminaciją ir itin stiprų M virusų genomų kopijų kiekio padidėjimą

(3.9 pav.). Šios tendencijos neatitinka LA-lus rekombinantinių baltymų sintezės sukelta natyvaus LA-1 ir M1 virusų genomų akumuliacija. Nepaisant to, M1 viruso geno kiekio akumuliacija K7 (LA-1, M1) kamiene gali vykti dėl padidėjusio natyvaus LA-1 viruso kiekio, bet ne rekombinantinių baltymų sintezės. Tuo tarpu LA-28 viruso rekombinantinių baltymų sintezė sutrikdo natyvių LA virusų palaikymą tik dviejuose (Rom K-100 (LA-2, M2), SRB-15-4 (LA-lus, Mlus)) iš penkių tirtų kamienu. Taip pat, šių baltymų sintezė nesukelia stipraus natyvių M virusų geno kiekio padidėjimo. Gali būti, jog LA-28 viruso rekombinantinių baltymų sintezė sutrikdo tik kelių tirtų natyvių LA virusų palaikymą ląstelėje dėl nepakankamai stiprios rekombinantinių baltymų sąveikos su natyviais M virusais. Kaip jau minėta anksčiau, LA-28 virusas yra priskiriamas *S. paradoxus* rūšies mielėms. Dėl šios priežasties LA-28 viruso koduojami baltymai galimai nesudaro specifinės sąveikos su tam tikrais *S. cerevisiae* mielių rūšiai būdingais M virusais arba sudaroma sąveika yra silpna.



3.9 pav. Virusinių rekombinantinių baltymų sintezės sukeltų endogeninių LA ir M virusų genomų kiekio pokyčių schema. Apačioje – baltymų raiškos vektoriai, kairėje – mielių kamienai. Schemoje žymimi geno kiekio pokyčiai siekiantys bent du kartus.

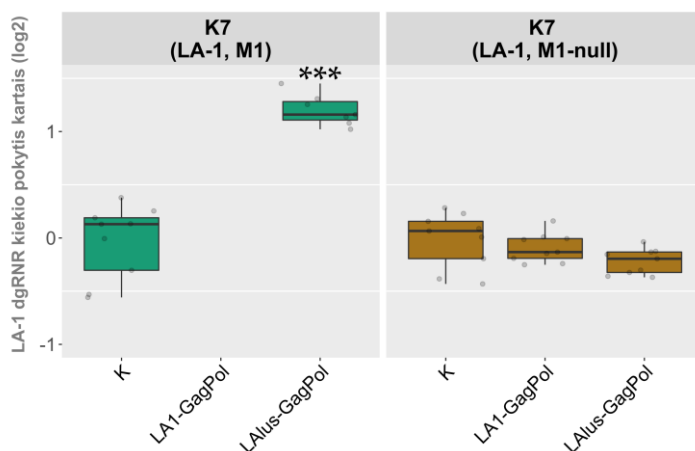
### 3.2.2. M viruso reikšmė LA virusų replikacijos interferencijoje

Remiantis išvalga, jog endogeninių LA virusų eliminacija dėl rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezės daugeliu atvejų sutampa su žymia M palydovų dgRNR akumuliacija, tirta natyvaus M viruso palaikymo ląstelėje įtaka rekombinantinių virusinių baltymų sąveikai su natyviu LA-1



virusu. Iš K7 (LA-1, M1) kamieno buvo eliminuotas satelitinis M1 virusas, šio kamieno ląsteles keturias paras auginat 37 °C temperatūroje. Palydovinio viruso eliminacija patvirtina, atlikus išgyvenusių kolonijų žudymo fenotipo analizę, suminės ir dvigrandinės RNR mėginių analizę elektroforezės agaroziniame gelyje ir atlikus AT-PGR. Pasirinktas žudymo fenotipo neturintis K7 (LA-1, M1-null) kamieno klonas, kuriame aptinkama LA-1 viruso dgRNR, tačiau nėra M1 viruso dgRNR. Gautas kamienas transformuotas LA-1 ir LA-lus virusų baltymus koduojančiais raiškos vektoriais bei kontroliniu „tuščiu“ vektoriumi. Natyvaus LA-1 genomo pokyčiai įvertinti 3.2.1 skyriuje aprašyta metodika.

K7 (LA-1, M1-null) kamiene, kuriame eliminuotas natyvus M1 virusas, natyvaus LA-1 viruso replikacija dėl rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezės nesutrikdoma (**3.10 pav.**). BY4741 (LA-1) kamiene, kuriame nėra satelitinio M viruso, rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezė taip pat nesutrikdo natyvaus LA-1 viruso palaikymo mielėse. Gauti rezultatai atitinka prielaidą, jog natyvių LA virusų replikacijos interferencija dėl rekombinantinių baltymų sintezės yra susijusi su M satelitinių virusų palaikymu ląstelėje. LA virusų rekombinantiniai baltymai galimai efektyviau



**3.10 pav.** Santykiniai natyvių LA virusų dgRNR genomų kiekio pokyčiai sukelti LA virusų rekombinantinių baltymų sintezės. Santykinis LA genomo kiekio pokytis nepateikiamas K7 (LA-1, M1) kamieno transformuoto LA-1 viruso baltymų raiškos vektoriumi, nes natyvaus LA dgRNR genomo frakcija šiuose mėginiuose nestebima. Stačiakampės histogramos viršuje nurodyti tiriamieji kamienai, x ašyje nurodomi naudoti LA virusų baltymų raiškos vektoriai (K – kontrolinis vektorius pYAK-G), y ašyje nurodomas santykinis LA dgRNR kiekio pokytis kartais ( $\log_2$  skalėje), pilkais taškais žymimi pavienių mėginių įverčiai. Duomenų statistinis patikimumas įvertintas pagal Stjudento *t* testą: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $0.001 \leq p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

sąveikauja su M viruso genomu ir vykdo jo replikaciją, tokiu būdu atitraukdami natyvaus LA viruso geno replikacijai būtinus ląstelės-šeimininkės baltymus. M1 viruso praradimas K7 (LA-1, M1) kamiene lemia natyvaus LA-1 viruso geno akumuliaciją. Tad negalima atmesti galimybės, jog K7 (LA-1, M1-null) kamiene natyvaus LA-1 viruso eliminacija nevyksta ne dėl M1 viruso praradimo, bet dėl padidėjusio natyvaus LA-1 viruso geno kiekio. Literatūros šaltiniuose teigiama, jog mielėse turinčiose *ski2* geno mutaciją, kuri lemia natyvaus LA viruso dgRNR akumuliaciją, natyvių virusų eliminacijos procesas dėl rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezės yra neefektyvus (Valle ir Wickner, 1993).

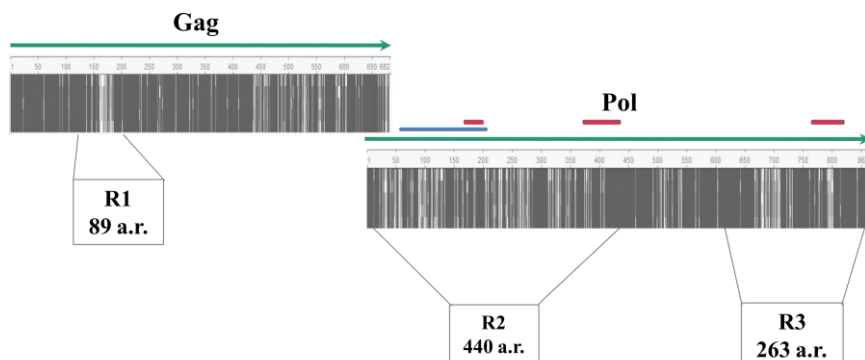
### **3.3 LA virusų sąveikos su LA ir M virusų sistemomis specifiškumo determinantės**

*S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielėse aptinkamų LA virusų baltymų sekos tarpusavyje panašios 87–98 % (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). Visuose iki šiol žinomuose LA virusuose aptinkami keli konservatyvūs baltyminiai domenai: RpRp polimerazinis domenas, N-galinis, centrinis ir C-galinis sąveikos su vgRNR domenai (Icho ir Wickner, 1989; Ribas *et al.*, 1994a; Ribas *et al.*, 1994b). Konservatyvūs LA virusų baltyminiai domenai būtini LA ir M virusų replikacijai mielėse. Kolega A. Konovalovas bioinformatiniais metodais sukūrė daugybinį visų iki šiol žinomų LA virusų genomų koduojamų baltyminių sekų palyginį. Identifikuotos kelios itin variabilios virusinių baltymų sritys. Manoma, jog variabilios LA virusų baltymų sritys galėtų būti svarbios specifinei LA virusų sąveikai su ląstelės-šeimininkės baltymais (Konovalovas, 2018).

Šio darbo metu iškelta prielaida, jog variabilios LA virusų baltymų sritys gali būti svarbios ne tik specifinei sąveikai su ląstelės-šeimininkės baltymais, bet ir specifinei sąveikai su LA ir/ar M virusais. 3.2 skyriuje aprašytų tyrimų metu nustatyta, jog rekombinantiniai LA-1, LA-lus ir LA-28 viruso baltymai specifiškai sąveikauja su skirtingomis virusinėmis sistemomis. Norint iširti LA virusų baltymų variabilių sekų reikšmę minėtai specifinei sąveikai, sukurti chimerinius LA-1 viruso baltymus koduojantys raiškos vektoriai ir įvertinta tokių baltymų sintezės įtaka įvairių natyvių LA ir M virusų sistemų palaikymui mielėse.

### 3.3.1 LA-1 viruso Gag ir GagPol chimerinių baltymų raiškos vektorių kūrimas

Skirtingų LA virusų koduojami baltymai tarpusavyje yra itin panašūs, tačiau baltyminėse sekose galima išskirti kelis labai variabilius regionus. Šiame darbe tirta trijų variabilių baltyminių sekų įtaka LA-1 viruso koduojamų baltymų specifiškumui. Pasirinkti sekų regionai atitinkamai pavadinti R1, R2 ir R3 (**3.11 pav.**).



**3.11 pav.** LA-1, LA-2, LA-lus ir LA-28 virusų koduojamų baltymų sekų palyginys. Šviesiai pilka ar balta spalva pažymėtos sritys yra variabilios. R1/R2/R3 – tyrimui pasirinkti regionai. Raudoni stačiakampiai virš sekų palyginio – sąveikos su vgrNR domenai, mėlynas stačiakampis – nukleorūgščių pakavimo sritis.

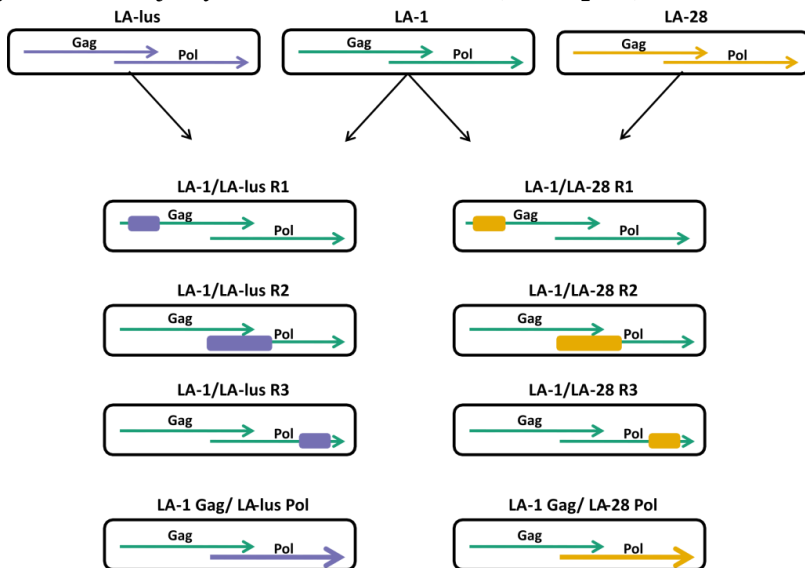
Gag baltymo N-gale išsidėstęs R1 regionas (121–210 a.r.) yra eksponuojamas į viriono paviršių (Naitow *et al.*, 2002). R1 srityje aptinkama konservatyvi kepurės nugvelbimo procese dalyvaujanti His-154 a.r. (Blanc *et al.*, 1992; Blanc *et al.*, 1994). Kitos, aplink išsidėsčiusios aminorūgštys, nėra konservatyvios. Didžiausiu variabilumu išsiskiria seka tarp 160–180 a.r.

R2 regionas (1–446 a.r.) išsidėstęs Pol domeno N-gale, į jį patenka kelios funkcinės GagPol sekos. Seka tarp 67–213 a.r. yra svarbi koduojančios (+) vgrNR pakavimo į virusines daleles procese, šioje srityje išsidėstęs N-galinis sąveikos su vgrNR domenais (172–190 a.r.). Aplink N-galinį sąveikos su vgrNR domeną išsidėsčiusios aminorūgštys galėtų būti svarbios specifinei sąveikai su vgrNR (Ribas *et al.*, 1994a). Centrinis papildomas sąveikos su vgrNR domenais (374–432 a.r.) svarbus M1 viruso palaikymui ląstelėje. Du konservatyvūs į šį domeną įeinantys sekų

fragmentai yra aptinkami tarp skirtingų koduojančių (+) vgRNR ir dgRNR virusų. Centrinio sąveikos su vgRNR domeno funkcija yra siejama su polimeraziniu Pol domeno aktyvumu. Nepaisant to, šis domenas neturi įtakos virusinių dalelių susirinkimui ar virusinės koduojančios (+) vgRNR pakavimui į šias daleles (Ribas *et al.*, 1994b). R2 regiono variabilumas pasiskirstęs per visą sekos ilgį.

R3 regionas (600–863 a.r.) išsidėstęs Pol domeno C-gale. Šioje srityje aptinkamas trečiasis sąveikos su vgRNR domenas (770–819 a.r.). C-galinis sąveikos su vgRNR domenas nėra reikalingas vgRNR pakavimui į virionus, tačiau būtinas M1 viruso palaikymui ląstelėje. Šis domenas gali būti svarbus virusinės RNR replikacijos ir/ar transkripcijos procesuose (Ribas *et al.*, 1994a). R3 regione itin dideliu variabilumu išsiskiria seka išsidėdėję tarp 678 ir 709 Pol domeno aminorūgščių, kita variabili seka išsidėdėję tarp 793–801 a.r.

LA-1, LA-lus ir LA-28 virusai pagal genominių ir baltyminių sekų panašumą grupuojasi į tris filogenetines grupes, šie virusai yra asocijuojami su skirtingais satelitiniais virusais (atitinkamai M1, Mlus ir M28) (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). Geriausiai iš šių virusų yra ištirtas LA-1 virusas. Norint įvertinti GagPol baltymų variabilių regionų įtaką natyvių virusų palaikymui ląstelėje ir galimą reikšmę specifinės sąveikos su skirtingais LA ir M virusais susidarymui, sukurti chimerinius LA GagPol baltymus koduojantys raiškos vektoriai (3.12 pav.). LA-1 baltymą



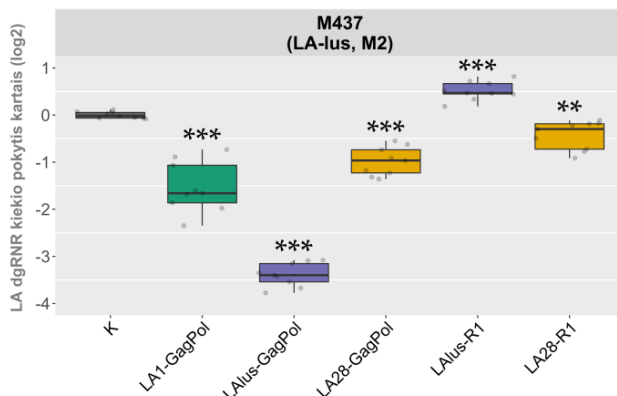
3.12 pav. Chimerinių LA-1 baltymų raiškos vektorių schema.

koduojančioje sekoje variabilumu pasižymintys regionai pakeisti atitinkamomis LA-lus arba LA-28 virusų genomėmis sekomis. Taip pat sukonstruoti raiškos vektoriai, koduojantys dalinį LA-1 kapsidinio baltymo Gag domeną (iki 642 a.r.) ir pilno ilgio LA-lus arba LA-28 Pol domeną. Minėtus baltyminius konstruktus koduojančios sekos buvo įterptos į pYAK-G plazmidę, jų raiška nuo vektoriaus reguliuojama konstitutyviu TEF1 ( $P^{TEF1}$ ) promotoriumi.

Sukurtais raiškos vektoriais transformuoti laukiniai mielių kamieniai, palaikantys skirtingas LA ir M virusų sistemas: K7 (LA-1, M1), Rom K-100 (LA-2, M2), M437 (LA-lus, M-2), SRB-15-4 (LA-lus, Mlus), K28 (LA-28, M28). Rekombinantinių baltymų sintezės įtaka natyviems virusams įvertinta 3.2.1. skyriuje aprašytu densitometrinės analizės metodu.

### 3.3.2. Gag baltymo N-galinio (R1) variabilaus regiono reikšmė LA ir M virusų sąveikai

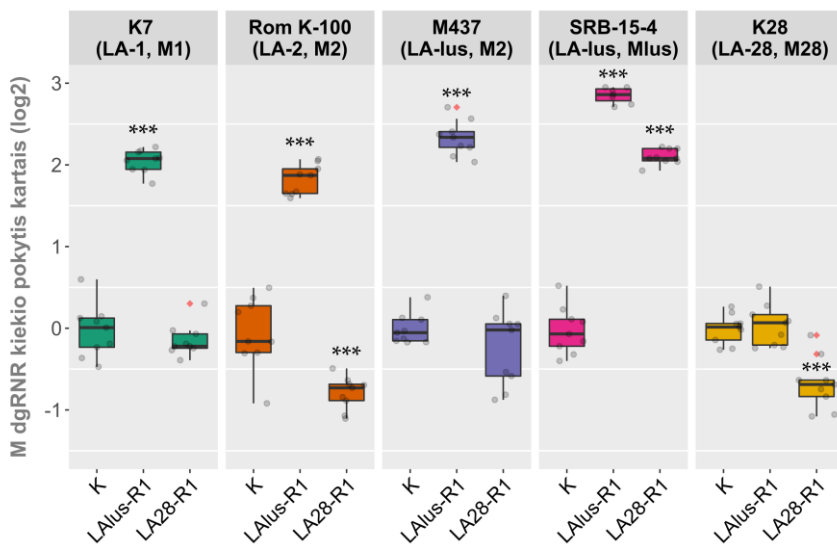
LA-1 viruso rekombinantinių baltymų sintezė sutrikdo natyvių LA virusų palaikymą daugelyje šiame darbe tirtų kamienų (K7 (LA-1, M1), Rom K-100 (LA-2, M2), SRB-15-4 (LA-lus, Mlus), K28 (LA-28, M28)) (3.7 pav.). Chimerinių LA-1 baltymų, kuriuose Gag baltymo variabilus R1 regionas (121–210 a.r.) pakeistas atitinkamais LA-lus arba LA-28 virusų regionais (toliau LAlus-R1, LA28-R1) kaip ir laukinio tipo LA-1 rekombinantinių baltymų sintezė sukelia endogeninių LA virusų eliminaciją iš visų tirtų kamienų išskyrus M437 (LAlus, M2) (3.13 pav.). Tiesa, kitaip



**3.13 pav.** Santykiniai natyvaus LA-lus viruso dgRNR genomo kiekio pokyčiai M437 (LA-lus, Mlus) kamiene sukelti LA-1 R1 chimerinių rekombinantinių baltymų sintezės. X ašyje nurodomi naudoti LA virusų baltymų raiškos vektoriai (K – kontrolinis vektorius pYAK-G), y ašyje nurodomas santykinis LA-lus dgRNR kiekio pokytis kartais ( $\log_2$  skalėje), pilkais taškais žymimi pavienių mėginių įverčiai. Duomenų statistinis patikimumas įvertintas pagal Stjudento *t* testą: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $0.001 \leq p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

nei laukinio tipo LA-1 baltymų sintezė, chimerinių baltymų sintezė nesukelia natyvaus LA-lus viruso genomo dgRNR kiekio sumažėjimo.

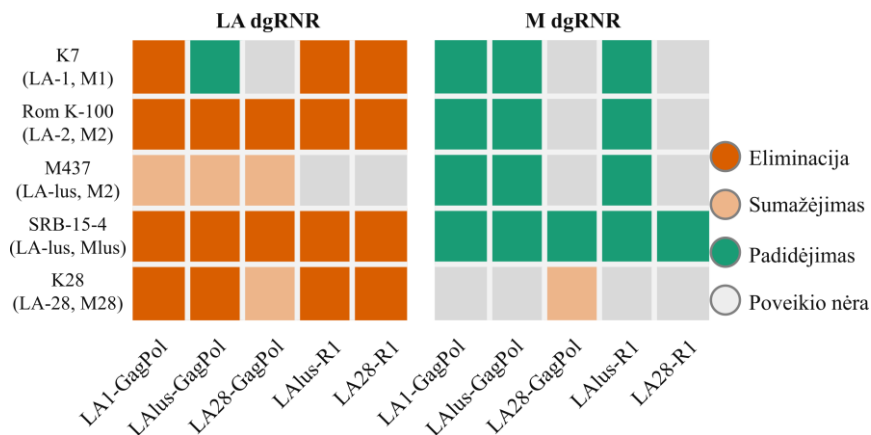
Chimerinių baltymų sintezės įtakos natyvių M virusų palaikymui mielėse tyrimo rezultatai iš dalies sutampa su rezultatais, gautais tiriant laukinio tipo LA-1 baltymų sintezės įtaką (3.8 pav.). Chimeriniai baltymai geba efektyviai palaikyti endogeninius M virusus ir daugeliu atvejų lemia M satelito dgRNR akumuliaciją ląstelėje. Iš gautų rezultatų išsiskiria LA28-R1 chimerinių baltymų sintezės įtaka endogeniniams M palydovams. K7 (LA-1, M1), Rom K-100 (LA-2, M2) ir M437 (LA-lus, M2) kamienuose šių chimerinių baltymų, kitaip nei laukinio tipo baltymų, sintezė nesukelia natyvių M virusų dgRNR kiekio padidėjimo (3.14 pav.).



**3.14 pav.** Santykiniai natyvių M virusų dgRNR genomų kiekio pokyčiai sukelti LA-lus-R1 ir LA28-R1 chimerinių rekombinantinių baltymų sintezės. Stačiakampės histogramos viršuje nurodyti tiriamieji kamieniai, x ašyje nurodomi naudoti LA virusų baltymų raiškos vektoriai (K – kontrolinis vektorius pYAK-G), y ašyje nurodomas santykinis M dgRNR kiekio pokytis kartais ( $\log_2$  skalėje), pilkais taškais žymimi pavienių mėginių įverčiai, raudonais taškais žymimi į analizę neįtraukti įverčiai (angl. *outliers*). Duomenų statistinis patikimumas įvertintas pagal Stjudento *t* testą: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $0.001 \leq p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Remiantis gautais rezultatais galima teigti, jog R1 regiono pakeitimas nesutrikdo Gag ir GagPol baltymų atliekamų funkcijų, nes eliminavus natyvius LA virusus stebima efektyvi endogeninių M virusų replikacija. Nepaisant to, LA-1 viruso R1 regiono pakeitimas į LA-28 viruso

R1 regioną lemia silpnesnę M1 ir M2 virusų replikaciją ląstelėje, o tai leidžia daryti prielaidą, jog R1 regionas gali būti svarbus specifinės LA ir M virusų sąveikos susidarymui (**3.15 pav.**).

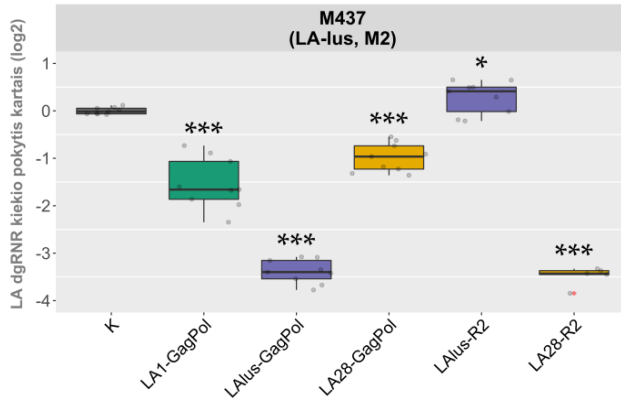


**3.15 pav.** Virusinių rekombinantinių baltymų sintezės sukeltų endogeninių LA ir M virusų genomų kiekio pokyčių schema. Apačioje – baltymų raiškos vektoriai, kairėje – mielių kamienai. Schemoje žymimi geno kiekio pokyčiai siekiantys bent du kartus.

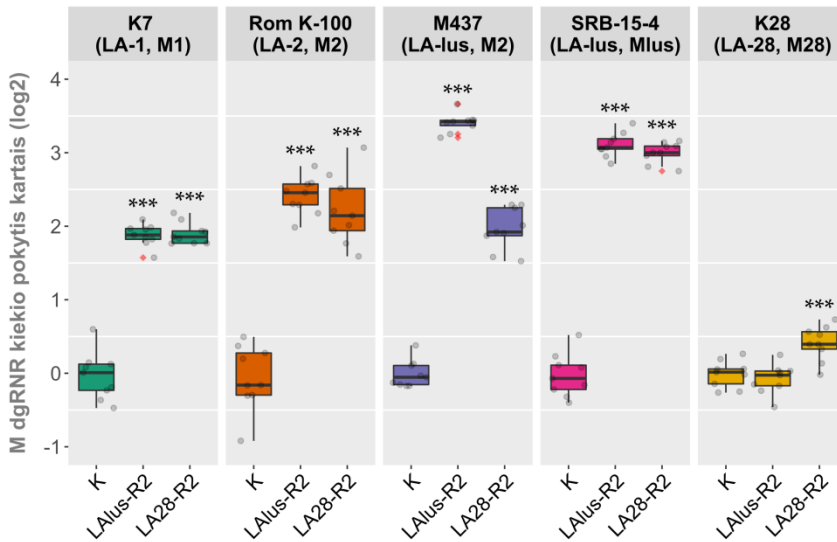
### 3.3.3 GagPol baltymo Pol domeno N-galinio (R2) variabilus regiono reikšmė LA ir M virusų sąveikai

LA-1 R2 chimerinių baltymų, kuriuose GagPol baltymo Pol domeno N-galinis variabilus regionas (1–446 a.r.) pakeistas atitinkamais LA-lus arba LA-28 virusų baltymų regionais (toliau LAlus-R2 ir LA28-R2), sintezė efektyviai stabdo natyvių LA virusų palaikymą K7 (LA-1, M1), Rom K-100 (LA-2, M2), SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) ir K28 (LA-28, M28) kamienuose (**3.16 pav.**). M437 (LA-lus, M2) kamiene LAlus-R2 chimeriniai baltymai nedaro įtakos endogeninio LA-lus viruso replikacijai. LA28-R2 chimerinių baltymų sintezė, lyginat su laukinio tipo LA-1 baltymų sinteze, M437 (LA-lus, M2) kamiene lemia sąlyginai stiprią natyvaus LA-lus viruso geno kiekio redukciją. Toks rezultatas gali reikšti, jog LA28-R2 chimerinių baltymų funkcionalumas yra dalinai pakitęs.

R2 chimeriniai baltymai, kaip ir LA-1 laukinio tipo ar R1 chimeriniai baltymai, geba palaikyti natyvius M virusus (**3.17 pav.**). Kamienuose, transformuotuose R2 chimerinių baltymų raiškos vektoriais, stebimas natyvių M virusų geno kiekio padidėjimas yra artimas rezultatams, gautiems mieles transformuojant laukinio tipo LA-1 baltymų raiškos vektoriais (**3.8 pav.**).



**3.16 pav.** Santykiniai natyvaus LA-lus viruso dgRNR geno kiekio pokyčiai M437 (LA-lus, Mlus) kamiene sukelti LAlus-R2 ir LA28-R2 chimerinių rekombinantinių baltymų sintezės. X ašyje nurodomi naudoti LA virusų baltymų raiškos vektoriai (K – kontrolinis vektorius pYAK-G), y ašyje nurodomas santykinis LA-lus dgRNR kiekio pokytis kartais ( $\log_2$  skalėje), pilkais taškais žymimi pavienių mėginių įverčiai. Duomenų statistinis patikimumas įvertintas pagal Stjudento *t* testą: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $0.001 \leq p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

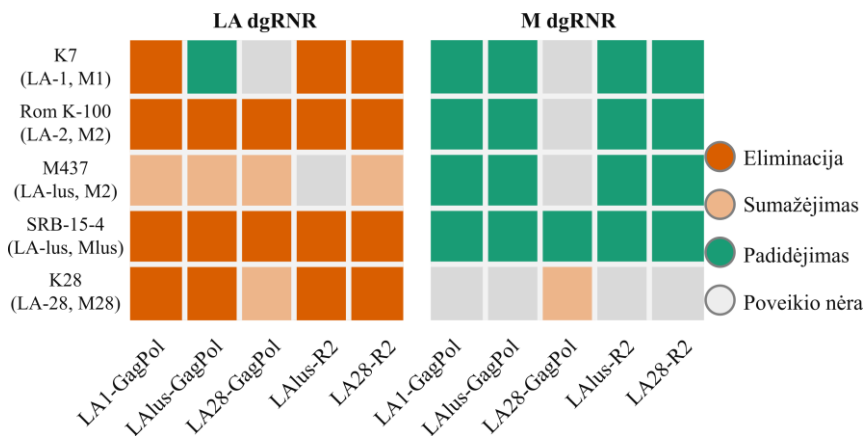


**3.17 pav.** Santykiniai natyvių M virusų dgRNR genomų kiekio pokyčiai sukelti LAlus-R2 ir LA28-R2 chimerinių rekombinantinių baltymų sintezės. Stačiakampės histogramos viršuje nurodyti tiriamieji kamienai, x ašyje nurodomi naudoti LA virusų baltymų raiškos vektoriai (K – kontrolinis vektorius pYAK-G), y ašyje nurodomas santykinis M dgRNR kiekio pokytis kartais ( $\log_2$  skalėje), pilkais taškais žymimi pavienių mėginių įverčiai, raudonais taškais žymimi į analizę neįtraukti įverčiai (angl. *outliers*). Duomenų statistinis patikimumas įvertintas pagal Stjudento *t* testą: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $0.001 \leq p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Kadangi R2 chimeriniai baltymai efektyviai replikuoja endogeninius M virusus, galima teigti, jog baltyminės sekos pokyčiai nesutrikdo jų



funktionalumo. R2 chimerinių baltymų sintezės sukelti natyvių LA ir M virusų genomų kiekio pokyčiai yra itin artimi dėl laukinio tipo LA-1 baltymų sintezės vykstantiems pokyčiams (**3.18 pav.**), tad iš gautų duomenų galima teigti, jog R2 regionas neturi įtakos specifinei LA virusų tarpusavio ar LA ir M virusų sąveikai.



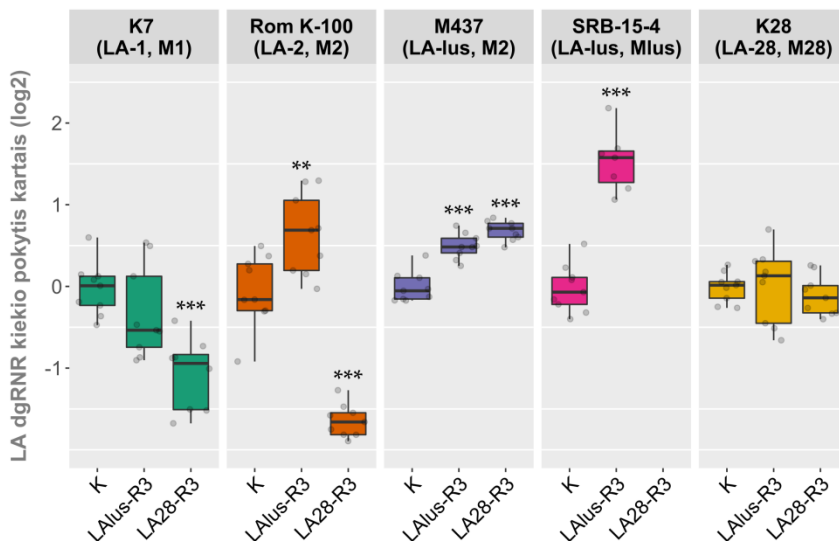
**3.18 pav.** Virusinių rekombinantinių baltymų sintezės sukeltų endogeninių LA ir M virusų genomų kiekio pokyčių schema. Apačioje nurodyti baltymų raiškos vektoriai, kairėje pusėje – mielių kamienai. Schemoje žymimi geno kiekio pokyčiai siekiantys bent du kartus.

### 3.3.4 GagPol baltymo Pol domeno C-galinio (R3) variabilaus regiono reikšmė LA ir M virusų sąveikai

LA-1 viruso GagPol baltymo Pol domeno C-galinio variabilaus regiono (R3) chimerinių baltymų (toliau LAlus-R3 ir LA28-R3) sąveika su endogeniniais LA ir M virusais žymiai skiriasi nuo laukinio tipo rekombinantinių baltymų sudaromų sąveikų. LAlus-R3 chimerinių baltymų sintezė nesutrikdo natyvių LA virusų palaikymo nei viename iš tirtų kamienų (**3.19 pav.**). Santykinis natyvių LA virusų genomų kiekis daugeliu atvejų yra artimas kontrolinių mėginių LA virusų genomų kiekiui. LA28-R3 chimerinių baltymų sintezė sukelia natyvaus LA geno kiekio sumažėjimą K7 (LA-1, M1) ir Rom K-100 (LA-2, M2) kamienuose, tuo tarpu SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) kamieno šių chimerinių baltymų sintezė lemia natyvaus LA-lus viruso eliminaciją.

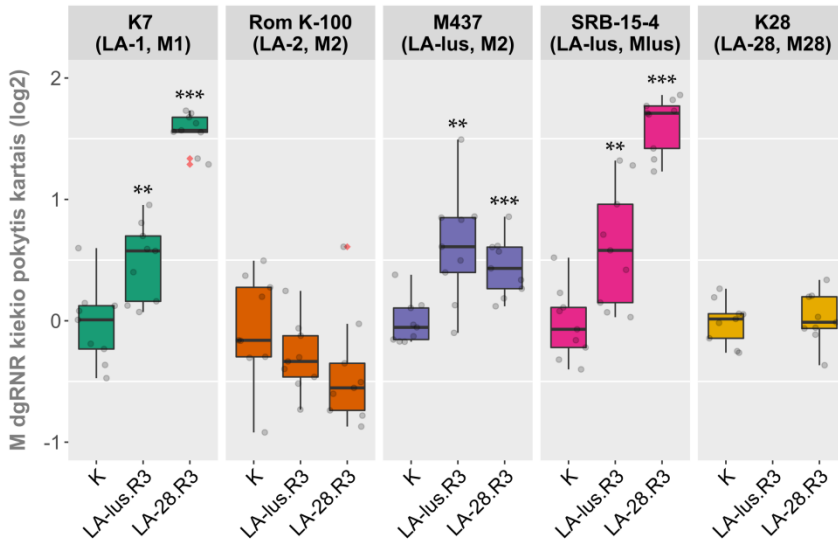
Kadangi LAlus-R3 chimerinių baltymų sintezė nesutrikdo natyvių LA virusų palaikymo mielėse, iš gautų rezultatų negalima vertinti šių baltymų gebėjimo replikuoti endogeninius M satelitus. Visuose tirtuose kamienuose, išskyrus K28 (LA-28, M28) kamieną, santykiniai natyvių M

virusų genomų kiekiai yra artimi kontrolinių mėginių M virusų genomų kiekiams (3.8 ir 3.20 pav.). LAlus-R3 chimerinių baltymų sintezė lemia itin stiprią K28 (LA-28, M28) kamiene palaikomo M28 viruso genomo kiekio redukciją. Šis rezultatas galėtų būti siejamas su minėtu K28 (LA-28, M28) kamiene aptinkamos virusų sistemos nestabilumu.



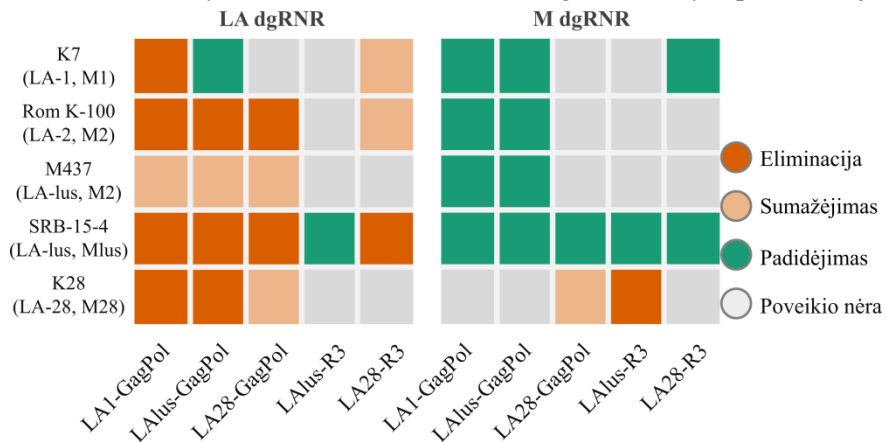
**3.19 pav.** Santykiniai natyvių LA virusų dgRNR genomo kiekio pokyčiai sukelti LAlus-R3 ir LA28-R3 chimerinių rekombinantinių baltymų sintezės. Santykinis LA genomo kiekio pokytis nepateikiamas SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) kamiene transformuotame chimerinio LA28-R3 baltymo raiškos vektoriumi, nes natyvaus LA dgRNR genomo frakcija šiuose mėginiuose nestebima. Stačiakampės histogramos viršuje nurodyti tiriamieji kamienai, x ašyje nurodomi naudoti LA virusų baltymų raiškos vektoriai (K – kontrolinis vektorius pYAK-G), y ašyje nurodomas santykinis LA dgRNR kiekio pokytis kartais ( $\log_2$  skalėje), pilkais taškais žymimi pavienių mėginių įverčiai, raudonais taškais žymimi į analizę neįtraukti įverčiai (angl. *outliers*). Duomenų statistinis patikimumas įvertintas pagal Stjudento *t* testą: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $0.001 \leq p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

LA28-R3 chimerinių baltymų sintezė lemia padidėjusį M1 ir Mlus virusų genomo kiekį K7 (LA-1, M1) ir SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) kamienuose. Kadangi SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) kamiene stebima LA-lus viruso eliminacija, galima daryti prielaidą, jog LA28-R3 chimeriniai baltymai yra funkcionalūs ir gali palaikyti Mlus virusus. Toks rezultatas koreliuoja su šiame darbe iškelta prielaida, jog natyvių LA virusų eliminacijos procesui vykti būtina efektyvi rekombinantinių baltymų sąveika su satelitiniu M virusu. Nepaisant to, rezultatai gauti vykdant LA28-R3 chimerinių baltymų raišką K7 (LA-1, M1) kamiene neatitinka šios prielaidos. Nors chimerinių baltymų sintezė lemia M1 viruso genomo kiekio akumuliaciją, natyvaus LA-1 viruso eliminacija nėra stebima.



**3.20 pav.** Santykiniai natyvių M virusų dgRNR geno kiekio pokyčiai sukelti LA-lus-R3 ir LA28-R3 chimerinių rekombinantinių baltymų sintezės. Santykinis M geno kiekio pokytis nepateikiamas K28 (LA-28, M28) kamiene transformuoto chimerinio LA-lus-R3 baltymo raiškos vektoriumi, nes natyvaus M dgRNR geno frakcija šiuose mėginiuose nestebima. Stačiakampės histogramos viršuje nurodyti tiriamieji kamieniai, x ašyje nurodomi naudoti LA virusų baltymų raiškos vektoriai (K – kontrolinis vektorius pYAK-G), y ašyje nurodomas santykinis M dgRNR kiekio pokytis kartais ( $\log_2$  skalėje), pilkais taškais žymimi pavienių mėginių įverčiai, raudonais taškais žymimi į analizę neįtraukti įverčiai (angl. *outliers*). Duomenų statistinis patikimumas įvertintas pagal Stjudento *t* testą: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $0.001 \leq p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Apibendrinus rezultatus, gautus tiriant R3 chimerinių baltymų sintezės įtaką natyviams LA ir M virusams, galima daryti prielaidą, jog



**3.21 pav.** Virusinių rekombinantinių baltymų sintezės sukeltų endogeninių LA ir M virusų genomų kiekio pokyčių schema. Apačioje nurodyti baltymų raiškos vektoriai, kairėje pusėje – mielių kamieniai. Schemoje žymimi geno kiekio pokyčiai siekiantys bent du kartus.

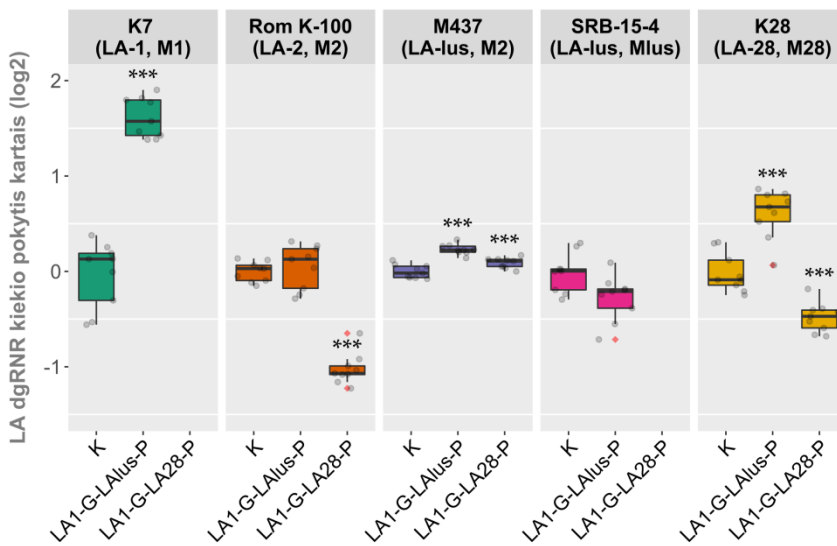
savita R3 regiono seka yra svarbi LA virusinių baltymų sintezės sukeliama endogeninių virusų eliminacijai vykti bei bendram virusinių baltymų funkcionalumui palaikyti (**3.21 pav.**). R3 regionas galimai sąveikauja su kitomis LA virusinių baltymų sritimis, taip užtikrindamas specifinę LA virusų sąveiką su satelitiniais M virusais.

### **3.3.5 Chimerinių GagPol baltymų, su pakeista Pol seka, sintezės įtaka LA ir M virusų palaikymui mielėse**

Chimerinių virusinių baltymų, kurių dalinė Gag domeno seka (iki 642 a.r.) savita LA-1 virusui, o GagPol baltymo Pol domeno seka savita LA-lus virusui (toliau LA1-G-LAlus-P), sintezė nesutrikdo natyvių LA virusų palaikymo nei viename iš tirtų kamienų, o K7 (LA-1, M1) kamiene net sukelia natyvaus LA-1 viruso genomo akumuliaciją (**3.22 pav.**). Šis efektas atitinka natyvaus LA-1 viruso genomo kiekio pokyčius dėl LA-lus laukinio tipo baltymų sintezės K7 (LA-1, M1) kamiene (**3.7 pav.**). Remiantis minėtais duomenimis galima daryti prielaidą, jog LA1-G-LAlus-P chimeriniai baltymai yra nefunkcionalūs arba jų specifiskumas yra pakitęs. Panašūs rezultatai gauti tiriant LAlus-R3 chimerinių baltymų sintezės įtaką natyviems LA ir M virusams (**3.19 pav.** ir **3.20 pav.**). Rodriguez-Cousino su kolegomis tirdami chimerinių LA1-G-LAlus-P baltymų sintezės įtaką natyviems LA virusams nustatė, jog tokie chimeriniai baltymai eliminuoja endogeninius LA-2 virusus (Rodriguez-Cousino ir Esteban, 2017). Tyrimo autorių naudotas LA1-G-LAlus-P baltyminis konstruktas sudarytas iš pilnos LA-1 Gag baltymo sekos ir dalinės LA-lus GagPol baltymo Pol domeno sekos (nuo 48 a.r.). Skirtingi minėto tyrimo ir šio darbo metu naudoti chimeriniai baltymai bei genetinė aplinka besiskiriantys mielių kamienai galėjo nulemti nesutampantčius rezultatus. Remiantis mūsų tyrimo duomenimis galima daryti prielaidą, jog su Pol sritimi persidengianti 38 a.r. ilgio Gag baltymo seka yra svarbi specifinėje LA virusų sąveikoje su natyviais LA ir/ar M virusais. Šią prielaidą atitinka ir 3.1. skyriuje aprašytų tyrimų rezultatai parodantys, jog C-galo deleciją turinčių Gag baltymų sintezė sukelia natyvių LA ir M virusų eliminaciją iš ląstelės.

LA1-G-LAlus-P chimeriniams baltymams analogiškų baltymų, kurių Pol seka atitinka LA-28 viruso Pol seką (toliau LA1-G-LA28-P), sintezė lemia natyvių LA virusų eliminaciją iš K7 (LA-1, M1) ir SRB-15-4 (LAlus, Mlus) kamienų. Tokių chimerinių baltymų sintezė taip pat sukelia nežymią genomo redukciją Rom K-100 (LA-2, M2) ir K28 (LA-28, M28) kamienuose (**3.22 pav.**). Šie rezultatai iš dalies atitinka duomenis, gautus

tiriant LA28-R3 chimerinių baltymų įtaką natyviems LA virusams (**3.19 pav.**). Tačiau, kitaip nei LA1-G-LA28-P baltymų sintezės atveju, LA28-R3 chimerinių baltymų sintezė nesutrikdo natyvaus LA-1 viruso palaikymo K7 (LA-1, M1) kamiene. Kadangi LA-28 viruso laukinio tipo baltymų sintezė nesukelia natyvaus LA-1 viruso eliminacijos bei yra žinoma, jog LA-1 kapsidinio baltymo sintezė nėra pakankamas veiksnys šiam procesui vykti (Wickner *et al.*, 1991), galima daryti prielaidą, jog endogeninių LA virusų palaikymo sutrikdymas dėl rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezės priklauso nuo kapsidinio ir polimerazinio domenų tarpusavio sąveikos. Šią prielaidą atitinka ir kituose tiriamuosiuose kamienuose stebimi natyvių virusų kiekio pokyčiai dėl LA1-G-LAlus/LA28-P chimerinių baltymų sintezės. Jeigu natyvių LA virusų eliminacija dėl rekombinantinių baltymų sintezės būtų specifiskai priklausoma tik nuo GagPol baltymo Pol domeno, vykstant minėtų chimerinių baltymų sintezei stebimi natyvių LA virusų pokyčiai turėtų būti atitinkami pokyčiams gaunamiems vykstant laukinio tipo LA-lus ar LA-28 virusų baltymų sintezei.

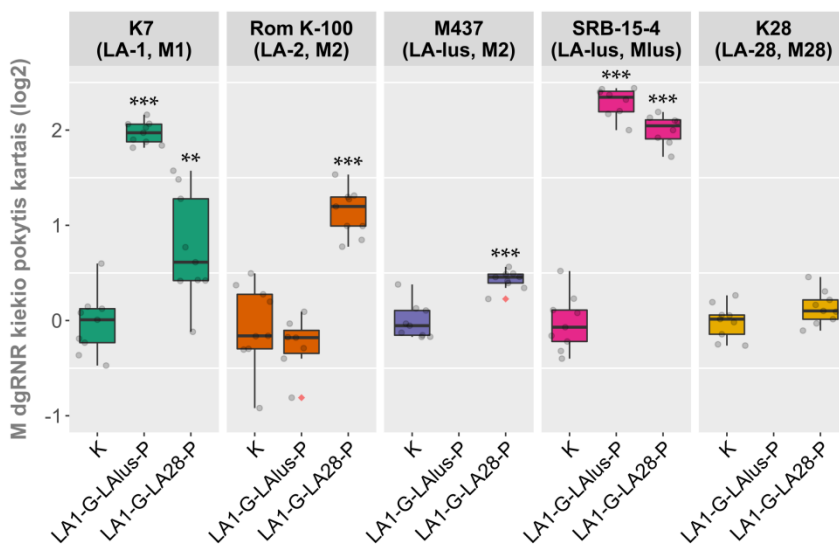


**3.22 pav.** Santykiniai natyvių LA virusų dgRNR genomų kiekio pokyčiai sukelti LA1-G-LAlus/LA28-P chimerinių rekombinantinių baltymų sintezės. Santykinis LA geno kiekio pokytis nepateikiamas K7 (LA-1, M1) ir SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) kamienuose transformuotuose chimerinio LA1-G-LA28-P baltymo raiškos vektoriumi, nes natyvaus LA dgRNR geno frakcija šiuose mėginiuose nestebima. Stačiakampės histogramos viršuje nurodyti tiriamieji kamienai, x ašyje nurodomi naudoti LA virusų baltymų raiškos vektoriai (K – kontrolinis vektorius pYAK-G), y ašyje nurodomas santykinis LA dgRNR kiekio pokytis kartais ( $\log_2$  skalėje), pilkais taškais žymimi pavienių mėginių įverčiai, raudonais taškais žymimi į analizę neįtraukti įverčiai (angl. *outliers*). Duomenų statistinis patikimumas įvertintas pagal Stjudento *t* testą: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $0.001 \leq p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

LA1-G-LAlus-P chimerinių baltymų sintezė sukelia natyvių M virusų genomų kiekio redukciją ar eliminaciją M437 (LA-lus, M2) ir K28 (LA-28, M28) kamienuose (**3.23 pav.**). M virusų dgRNR kiekio sumažėjimas K28 (LA-28, M28) kamiene vyksta ir LAlus-R3 rekombinantinių baltymų sintezės atveju (**3.20 pav.**). Toks rezultatas gali būti siejamas su K28 (LA-28, M28) kamieno virusinės sistemos nestabilumu. Tuo tarpu M2 virusų genomo eliminacija iš M437 (LA-lus, M2) kamieno šio darbo metu dar nebuvo stebėta. LA1-G-LAlus-P baltymų funkcionalumas galimai yra stipriai pakitęs ar net prarastas, o tai gali lemti natyvių M virusų eliminaciją. Rodriguez-Cousino su kolegomis nustatė, jog chimeriniai LA1-G-LAlus-P baltymai, kuriuose pilna Gag seka savita LA-1 virusui ir likusi (nuo 48 a.r.) Pol seka savita LA-lus virusui, geba palaikyti natyvius M1, M2 ir Mlus virusus (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013; Rodriguez-Cousino and Esteban, 2017). Kaip ir natyvių LA virusų eliminacijos atveju, šio darbo ir Rodriguez-Cousino grupės tyrimų rezultatai galėjo nesutapti dėl skirtingų tyrimuose naudotų baltyminių konstrukto bei genetinė aplinka besiskiriančių kamienų. Patikimai įvertinti, ar šio darbo metu naudoti LA1-G-LAlus-P chimeriniai baltymai yra išlaikę funkcionalumą negalime, kadangi jų sintezė nesukelia natyvių LA virusų eliminacijos. K7 (LA-1, M1) ir SRB-15-4 (LAlus, Mlus) kamienuose vykstant LA1-G-LAlus-P rekombinantinių baltymų sintezei, padidėja natyvių M virusų genomų kopijų skaičius (**3.23 pav.**). Tiesa, K7 (LA-1, M1) kamiene dėl rekombinantinių baltymų sintezės stebima natyvaus LA-1 viruso genomo akumuliacija, o tai gali lemti padidėjusį satelitinio M1 viruso kiekį. SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) kamiene natyvaus LA-lus genomo kiekis dėl rekombinantinių baltymų sintezės nepakinta, tad padidėjęs Mlus satelito genomo kiekis galėtų būti siejamas su chimerinių baltymų sinteze. Gali būti, jog LA1-G-LAlus-P chimeriniai baltymai geba replikuoti tik Mlus palydovus.

Chimeriniai LA1-G-LA28-P baltymai yra funkciškai aktyvūs. Jų sintezė sukelia natyvių LA virusų eliminaciją iš K7 (LA-1, M1) ir SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) kamienų, tačiau M satelitiniai virusai neprarandami. Šių chimerinių baltymų sintezė lemia padidėjusį palydovinių virusų kiekį K7 (LA-1, M1), Rom K-100 (LA-2, M2) ir SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) kamienuose (**3.23 pav.**). LA1-G-LA28-P, LA28-R3 ir LA28-R1 chimerinių baltymų sintezės sukelti endogeninių M virusų genomų kiekio pokyčiai, lyginant su laukinio tipo LA-1 ir LA-28 baltymų sintezės sukeltais pokyčiais, leidžia kelti prielaidą, jog LA-28 virusas galimai stipriau

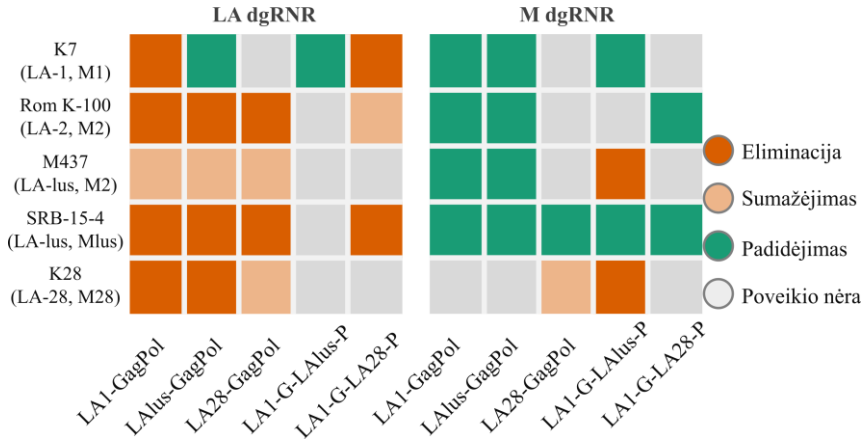
sąveikauja su Mlus palydovu nei su M1 ar M2 palydovais. LA-1 virusinių baltymų, kurių R1, R3 ar Pol sritys pakeistos į atitinkamas LA-28 viruso sritis sintezė, kitaip nei laukinio tipo LA-1 baltymų sintezė, daugeliu atvejų nesukelia natyvių M1 ar M2 virusų genomų akumuliacijos K7 (LA-1, M1), Rom K-100 (LA-2, M2) ir M437 (LA-lus, M2) kamienuose. Tuo tarpu tokių chimerinių baltymų sintezė visada sukelia natyvaus Mlus viruso geno kiekio padidėjimą SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) kamiene. Negalima atmesti galimybių, jog tokie rezultatai yra susiję ne tik su LA-28 viruso specifiskumu tam tikram palydovui, bet ir skirtinga tirtų kamienu genetine aplinka.



**3.23 pav.** Santykiniai natyvių M virusų dgRNR genomų kiekio pokyčiai sąlygoti LA1-G-LAlus/LA28-P chimerinių rekombinantinių baltymų sintezės. Santykinis M geno kiekio pokytis nepateikiamas M437 (LA-lus, M2) ir K28 (LA-28, M28) kamienuose transformuotuose chimerinio LA1-G-LAlus-P baltymo raiškos vektoriumi, nes natyvaus M dgRNR geno frakcija šiuose mėginiuose nestebima. Stačiakampės histogramos viršuje nurodyti tiriamieji kamieniai, x ašyje nurodomi naudoti LA virusų baltymų raiškos vektoriai (K – kontrolinis vektorius pYAK-G), y ašyje nurodomas santykinis M dgRNR kiekio pokytis kartais (log<sub>2</sub> skalėje), pilkais taškais žymimi pavienių mėginių įverčiai, raudonais taškais žymimi į analizę neįtraukti įverčiai (angl. *outliers*). Duomenų statistinis patikimumas įvertintas pagal Stjudento *t* testą: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $0.001 \leq p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Remiantis natyvių LA ir M virusų geno kiekio pokyčiais sukeltais chimerinių LA1-G-LAlus/LA28-P baltymų sintezės, galima daryti prielaidą, jog virusinių baltymų funkcionalumas yra glaudžiai susijęs su Gag ir GagPol baltymų tarpusavio sąveika (3.24 pav.). Chimeriniai virusiniai baltymai, kurių Gag baltymą koduojanti seka yra savita LA-1 virusui, o Pol domeną koduojanti seka savita LA-lus ar LA-28 virusams, dažnu atveju

praranda laukinio tipo baltymams būdingą funkcionalumą. Minėti baltyminių sekų pokyčiai galimai sutrikdo normalų virusinių baltymų susilankstymą, todėl gali sutrikti baltymų funkcionalumas ar sąveika su natyviais virusais ir/ar ląstelės-šeimininkės baltymais.



**3.24 pav.** Virusinių rekombinantinių baltymų sintezės sukeltų endogeninių LA ir M virusų genomų kiekio pokyčių schema. Apačioje nurodyti baltymų raiškos vektoriai, kairėje pusėje – mielių kamienai. Schemoje žymimi geno kiekio pokyčiai siekiantys bent du kartus.



### 3.4 Rezultatų apibendrinimas

Šiame darbe aprašomi *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielių rūšyse paplitusių *Totiviridae* šeimos LA ir M virusų tarpusavio sąveikos tyrimai. Norint iširti specifines virusų sąveikas, pritaikyti įvairių LA tipų virusinių baltymų raiškos vektoriai ir įvertinta rekombinantinių baltymų sudaromų virusinių dalelių įtaka natyviems, ląstelėje aptinkamiems, LA ir M virusams.

Literatūroje aprašomas trumpintų kapsidinių baltymų sintezės sukiamas natyvių LA ir M virusų eliminacijos fenomenas (Yao ir Bruenn, 1995; Ribas ir Wickner, 1998). Norint įvertinti šio proceso priklausomybę nuo LA ir M virusų sistemos tipo, sukurti skirtingoms filogenetinėms grupėms priskiriamų LA-1, LA-2, LA-lus ir LA-28 virusų kapsidinių baltymų, turinčių C-galo deleciją, raiškos vektoriai ir įvertinta tokių trumpintų kapsidinių baltymų sintezės įtaka natyvių LA ir M virusų palaikymui. Visų tirtų trumpintų kapsidinių baltymų sintezė sukelia įvairių endogeninių LA ir M virusų eliminaciją. Šie rezultatai parodo, jog natyvių virusų eliminacija dėl trumpintų kapsidinių baltymų sintezės yra nuo LA viruso rūšies nepriklausantis procesas (3.1.1 ir 3.1.2 skyriai). Mūsų laboratorijoje atliktų tyrimų metu nustatyta, jog 39 a.r. C-galo deleciją turintis LA-1 viruso kapsidinis baltymas sudaro chimerines, genomo nepakuojančias kapsides su laukinio tipo virusiniais baltymais. Iškelta hipotezė, jog trumpinti kapsidiniai baltymai sutrikdo sulietinių GagPol baltymų įtraukimą į susidarantią kapsidę, taip sukeldami natyvių virusų eliminaciją (Konovalovas, 2018). Šio darbo metu gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, jog skirtingų LA virusų trumpinti kapsidiniai baltymai sąveikaudami su įvairių natyvių LA virusų kapsidiniais baltymais sudaro nefunkcionalias kapsides, todėl natyvūs virusai prarandami.

LA ir M virusai iš mielių ląstelių įprastai eliminuojami, auginant mieles aukštesnėje nei optimali temperatūra ar į augimo terpę pridėdant ląstelinius procesus stabdančias medžiagas (5-fluoruracilas, cikloheksimidas) (Fink ir Styles, 1972; Tipper ir Schmitt, 1991; Weinstein *et al.*, 1993). Šie eliminacijos metodai yra citotoksiški mielių ląstelėms ir gali lemti klaidingus rezultatus atliekant įvairius –omikos eksperimentus (Sakaki *et al.*, 2003; Seiple *et al.*, 2006; Hoskins ir Butler, 2007; Saint-Georges *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2019). Trumpintų kapsidinių baltymų sintezės sukeltas natyvių virusų eliminacijos fenomenas buvo pritaikytas universaliam endogeninių LA ir M virusų eliminavimui (3.1.3

skyrius). Taip paruošti transkriptominiuose ir proteominiuose tyrimuose naudoti mielių kamienai be LA ir/ar M virusų (Lukša *et al.*, 2017; Konovalovas, 2018). Natyvių LA ir M virusų eliminacija vykdant LA virusų trumpintų kapsidinių baltymų sintezę yra itin efektyvi ir nesukelia citotoksinio efekto mielių ląstelėms.

LA-1 virusų replikaciją ląstelėje taip pat gali sutrikdyti rekombinantinių LA-1 Gag ir GagPol baltymų sintezė (Valle ir Wickner, 1993). Norint ištirti įvairių LA virusų baltymų specifiškumą natyvioms LA ir M virusų sistemoms, šiame darbe tirtos skirtingoms filogeninėms grupėms priskiriamų LA-1, LA-lus ir LA-28 virusų rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sąveikos su endogeniniais LA ir M virusais (**3.2.1** skyrius). Nustatyta, jog skirtingų LA virusų koduojami baltymai specifiškai sąveikauja su tam tikromis virusinėmis sistemomis. Minėtoji sąveika galimai priklauso ne tik nuo natyvios virusinės sistemos tipo, bet ir nuo ląstelės genetinės aplinkos – tai išsiaiškinta tiriant laukinio tipo mielių kamienus. Skirtingų LA virusų Gag ir GagPol baltymai geba replikuoti jiems nebūdingus satelitinius virusus, tad LA virusai galimai nėra specifiški konkrečiam palydovui. Taip pat parodyta, jog natyvių LA virusų replikacijos sutrikdymas dėl rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezės priklauso nuo M viruso palaikymo ląstelėje (**3.2.2** skyrius). Mielėse, kuriose M virusai neaptinkami, LA virusų palaikymas dėl rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezės nesutrikdomas. LA ir M virusai tarpusavyje konkuruoja dėl virusų replikacijai būtinų LA viruso koduojamų bei ląstelės-šeimininkės baltymų. Rekombinantinių baltymų sąveika su satelitiniais virusais galimai yra vienas iš veiksnių, sukeliančių natyvių LA virusų eliminaciją iš ląstelės.

Skirtingų LA virusų koduojami baltymai yra panašūs, tačiau tam tikri baltyminių sekų regionai yra itin variabilūs (**3.2.3** skyrius). Iškelta prielaida, jog variabilios virusinių baltymų sritys galėtų būti svarbios specifinei LA virusų tarpusavio ar LA ir M virusų sąveikai. Variabilių sričių įtaka virusų tarpusavio sąveikai tirta pritaikant chimerinių LA virusų baltymų raiškos vektorius, kuriuose LA-1 genomo variabilios sekos pakeistos atitinkamomis LA-lus arba LA-28 virusų sekomis. Nustatyta, jog Gag baltymo N-gale išsidėstęs variabilus regionas (R1; Gag baltymo 121–210 a.r.) yra galimai svarbus virusinių baltymų funkcionalumui ir/ar specifiškumui užtikrinti (**3.2.4** skyrius). Tuo tarpu variabilus regionas, išsidėstęs GagPol baltymo Pol domeno N-galinėje dalyje (R2; Pol domeno 1–446 a.r.), gali būti keičiamas tarp skirtingų LA virusų nesutrikdant įprasto

virusinių baltymų funkcionalumo (3.2.5 skyrius). Remiantis gautais rezultatais galima teigti, jog savitas Pol domeno N-galo variabilus regionas nėra svarbus LA virusų specifinei sąveikai su natyviais LA ar M virusais užtikrinti. Chimeriniai baltymai, turintys GagPol baltymo Pol domeno C-galinio variabilaus regiono (R3; Pol domeno 600–863 a.r.) pakitimus, yra praradę laukinio tipo baltymams būdingas funkcijas. R3 chimerinių baltymų sintezė, kitaip nei laukinio tipo baltymų sintezė, daugeliu atvejų nesukelia natyvių LA virusų eliminacijos ir natyvaus M viruso genomo akumuliacijos (3.2.6 skyrius). Savitas Pol domeno C-galinis variabilus regionas galimai svarbus LA virusinių baltymų funkcionalumui palaikyti ar sąveikai su natyviais virusais užtikrinti.

Šio darbo metu taip pat buvo įvertintas chimerinių baltymų, kurių visa GagPol baltymo Pol domeno seka pakeista kito tipo LA virusų Pol domeno seka, įtaka satelitinių virusų ir natyvių LA virusų palaikymui (3.2.7 skyrius). Tyrimo rezultatai parodė, jog Gag ir GagPol baltymų tarpusavio sąveika yra itin svarbi LA virusinių baltymų funkcionalumui užtikrinti. Viso Pol domeno pakeitimas galimai sutrikdo normalų GagPol baltymo susilankstymą ar sąveiką su Gag baltymais, taip pažeidžiant chimerinių baltymų funkcionalumą arba pakeičiant virusinių baltymų sąveiką su natyviais virusais bei ląstelės-šeimininkės baltymais. Rodriguez-Cousino su kolegomis atliktų tyrimų metu buvo nustatyta, jog chimeriniai baltymai, sudaryti iš pilno ilgio LA-1 Gag sekos ir dalinės LA-lus Pol sekos (nuo 35 a.r.) išlaiko funkcionalumą, sukelia natyvių LA-2 virusų eliminaciją bei palaiko satelitinius M1, M2 ir Mlus virusus (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013; Rodriguez-Cousino ir Esteban, 2017). Šio darbo metu tirti chimeriniai baltymai sudaryti iš dalinės LA-1 Gag sekos (iki 642 a.r.) ir pilno ilgio LA-lus Pol sekos. Tokie chimeriniai baltymai natyvių LA virusų eliminacijos ir natyvių M virusų genomo akumuliacijos nesukelia. Remiantis gautais duomenimis galima daryti prielaidą, jog persidengiančios Gag ir Pol domenų sekos yra itin svarbios virusinių baltymų funkcionalumui palaikyti. Ši prielaida koreliuoja ir su anksčiau mūsų grupėje atliktais tyrimais, kurių metu nustatyta, jog su šia sritimi galimai sąveikauja bent trys ląstelės-šeimininkės baltymai, būtini viruso replikacijai vykti (Konovalovas, 2018).

Remiantis šio darbo rezultatais galima išskirti kelis LA virusinių baltymų sąveikos su endogeniniais LA ir M virusais specifiškumo lygmenis. Skirtingų LA virusų trumpinti kapsidiniai baltymai galimai sąveikauja su

endogeninių LA virusų baltymais nepriklausomai nuo jų tipo, taip sudarydami nefunkcionalias kapsides ir sukeldami endogeninių virusų eliminaciją iš ląstelės. Tuo tarpu LA laukinio tipo baltymų sudaromų virusinių dalelių sąveika su endogeniniais LA ir M virusais pasižymi tam tikru rūšiniu specifiškumu. Pastebėta bendra tendencija, jog rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezė išstumia endogeninius LA virusus ir efektyviai palaiko M palydovus. Kai ląstelėje M virusai nėra palaikomi, rekombinantinių virusinių baltymų sintezė endogeninių LA virusų replikacijos nesutrikdo. Atsižvelgiant į gautus duomenis galima iškelti prielaidą, jog mielėse LA ir M virusų replikacija yra tarpusavyje konkuruojantys procesai. Rekombinantiniai baltymai efektyviai replikuoja būtent natyvių M, o ne LA virusų genomus galimai dėl to, jog M genomai yra trumpesni, taip pat juose aptinkama poliA sritis, kuri galėtų apsaugoti virusinę RNR nuo ląstelinių nukleazių. Chimerinių LA virusų baltymų tyrimų rezultatų analizė parodė, jog variabilios virusinių baltymų sritys yra funkciškai svarbios specifinės sąveikos tarp virusinių baltymų ir natyvių virusų susidarymui. Taip pat galima daryti prielaidą, jog specifinėje virusinių baltymų sąveikoje su endogeniniais virusais dalyvauja tiek Gag, tiek ir GagPol baltymai.

## IŠVADOS

1. LA virusų rekombinantinių Gag baltymų, kurių 36–39 C-galo aminorūgštys yra pakeistos 21 a.r. ilgio seka koduojančia afininius gryninimo inkarus, sintezė sukelia mielių ląstelėse aptinkamų natyvių LA ir M virusų eliminaciją nepriklausomai nuo LA virusų tipo.
2. LA virusų Gag ir GagPol baltymų sintezės sukeltas natyvių LA virusų eliminacijos fenomenas yra iš dalies nuo specifinės virusų sistemos priklausomas procesas.
3. Rekombinantinių LA virusų Gag ir GagPol baltymų sintezės sukeltas endogeninių LA virusų palaikymo ląstelėje sutrikdymas galimai priklauso nuo satelitinių M virusų palaikymo ląstelėje ir/ar rekombinantinių baltymų sąveikos su satelitais.
4. Savitas LA virusų Gag baltymo N-galinis variabilus regionas (121–210 a.r.) galimai svarbus virusinių baltymų funkcionalumo ir/ar specifinės sąveikos su satelitiniais virusais palaikymui.
5. Savitas LA virusų GagPol baltymo Pol domeno N-galinis variabilus regionas (1–446 a.r.) nėra svarbus rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sintezės sukeliama natyvių virusų eliminacijai ar specifinei sąveikai su satelitiniais M virusais.
6. Savitas LA virusų GagPol baltymo Pol domeno C-galinis variabilus regionas (600–863 a.r.) yra būtinas virusinių baltymų funkcionalumui palaikyti ir/ar dalyvauja specifinėje sąveikoje su satelitiniais M virusais.
7. LA virusų rekombinantinių Gag ir GagPol baltymų sąveika su endogeniniais LA ir M virusais priklauso nuo GagPol baltymų Pol domeno suderinamumo su Gag domenu arba Gag baltymais.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Alsammar, H. ir Delneri, D. (2020) 'An update on the diversity, ecology and biogeography of the *Saccharomyces* genus', *FEMS Yeast Research*, 20, pp. 1–12. doi: 10.1093/femsyr/foaa013.
2. Alves-Rodrigues, I., Galao, R. P., Meyerhans, A. ir Juana, D. (2006) '*Saccharomyces cerevisiae*: A useful model host to study fundamental biology of viral replication', *Virus Research*, 120, pp. 49–56. doi: 10.1016/j.virusres.2005.11.018.
3. Anderson, J. S. J. ir Parker, R. (1998) 'The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex', *The EMBO Journal*, 17(5), pp. 1497–1506.
4. Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajihō, H., Hoshino, S. ir Katada, T. (2001) 'Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast', *The EMBO Journal*, 20(17), pp. 4684–4693.
5. Ball, S. G., Tirtiaux, C. ir Wickner, R. B. (1984) 'Genetic Control of L-A and L-(BC) dsRNA Copy Number in Killer Systems of *Saccharomyces cerevisiae*', *Genetics*, pp. 199–217.
6. Benard, L., Carroll, K., Valle, R. C. P., Masison, D. C. ir Wickner, R. B. (1999) 'The Ski7 Antiviral Protein Is an EF1- $\alpha$  Homolog That Blocks Expression of Non-Poly(A) mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Virology*, 73(4), pp. 2893–2900.
7. Benard, L., Carroll, K., Valle, R. C. P. ir Wickner, R. B. (1998) 'Ski6p Is a Homolog of RNA-Processing Enzymes That Affects Translation of Non-Poly(A) mRNAs and 60S Ribosomal Subunit Biogenesis', *Molecular and Cellular Biology*, 18(5), pp. 2688–2696.
8. Benaroudj, N., Lee, D. H. ir Goldberg, A. L. (2001) 'Trehalose Accumulation during Cellular Stress Protects Cells and Cellular Proteins from Damage by Oxygen Radicals', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(26), pp. 24261–24267. doi: 10.1074/jbc.M101487200.
9. Bevan, E. A., Herring, A. J. ir Mitchell, D. J. (1973) 'Preliminary Characterization of Two Species of dsRNA in Yeast and their Relationship to the "Killer" Character', *Nature Publishing Group*, 245, pp. 81–86.
10. Bevan, E. A., ir Makover, M. (1963) 'The physiological basis of the killer character in yeasts.', XIth International Congress on Genetics 1:202–203.
11. Blanc, A., Goyer, C. ir Sonenberg, N. (1992) 'The Coat Protein of the Yeast Double-Stranded RNA Virus L-A Attaches Covalently to the Cap Structure of Eukaryotic mRNA', *Molecular and Cellular Biology*, 12(8), pp. 3390–3398.
12. Blanc, A., Ribas, J. C., Wickner, R. B. ir Sonenberg, N. (1994) 'His-154 Is Involved in the Linkage of the *Saccharomyces cerevisiae* L-A Double-

- Stranded RNA Virus Gag Protein to the Cap Structure of mRNAs and Is Essential for M1 Satellite Virus Expression', *Molecular and Cellular Biology*, 14(4), pp. 2664–2674.
13. Blanco, R., Carrasco, L. ir Ventoso, I. (2003) 'Cell Killing by HIV-1 Protease', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(2), pp. 1086–1093. doi: 10.1074/jbc.M205636200.
  14. Blumenthal, T. ir Carmichael, G. G. (1979) 'RNA Replication: Function and Structure of Q $\beta$ -Replicase', *Annual Review of Biochemistry*, 48, pp. 525–548.
  15. Borneman, A. R. ir Pretorius, I. S. (2015) 'Genomic Insights into the *Saccharomyces sensu stricto* Complex', *Genetics*, 199, pp. 281–291. doi: 10.1534/genetics.114.173633.
  16. Bostian, K. A., Elliott, Q., Bussey, H., Bum, V., Smith, A. ir Tippers, D. J. (1984) 'Sequence of the Preprotoxin dsRNA Gene of Type I Killer Yeast : Multiple Processing Events Produce a Two-Component Toxin', *Cell*, 36, pp. 741–751.
  17. Bostian, K. A., Sturgeon, J. A. ir Tipper, D. J. (1980) 'Encapsidation of Yeast Killer Double-Stranded Ribonucleic Acids : Dependence of M on L', *Journal of Bacteriology*, 143(1), pp. 463–470.
  18. Boynton, P. J. (2019) 'The ecology of killer yeasts : Interference competition in natural habitats', *Yeast*, 36, pp. 473–485. doi: 10.1002/yea.3398.
  19. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. ir Boeke, J. D. (1998) 'Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications.', *Yeast (Chichester, England)*, 14(2), pp. 115–32. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2.
  20. Breinig, F., Sendzik, T., Eisfeld, K. ir Schmitt, M. J. (2006) 'Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection', *PNAS*, 103(10), pp. 3810–3815.
  21. Breinig, F., Tipper, D. J., Schmitt, M. J. ir Saarbru, D. (2002) 'Kre1p , the Plasma Membrane Receptor for the Yeast K1 Viral Toxin', *Cell*, 108, pp. 395–405.
  22. Brown, J. T., Bai, X. ir Johnson, A. W. (2000) 'The yeast antiviral proteins Ski2p , Ski3p , and Ski8p exist as a complex *in vivo*', *RNA*, 6, pp. 449–457.
  23. Bruenn, J. A. (1991) '*In vivo* mapping of a sequence required for interference with the yeast killer virus', 88(February), pp. 1271–1275.
  24. Bruenn, J. ir Kane, W. (1978) 'Relatedness of the Double-Stranded RNAs Present in Yeast Virus-Like Particles', *Journal of Virology*, 26(3), pp. 762–772.
  25. Bussey, H., Saville, D., Greene, D., Tipper, D. J. ir Bostian, K. A. (1983)

- ‘Secretion of *Saccharomyces cerevisiae* Killer Toxin : Processing of the Glycosylated Precursor’, *Molecular and Cellular Biology*, 3(8), pp. 1362–1370.
26. Cansado, J., Velaquez, J. B., Sieiro, C., Gacto, M. ir Villa, T. G. (1999) ‘Presence of non-suppressive , M2-related dsRNAs molecules in *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from spontaneous fermentations’, *FEMS Microbiology Letters*, 181, pp. 211–215.
  27. Carter, D. M., Liti, G., Moses, A. M., Parts, L., James, S. A., Davey, R. P., Roberts, I. N., Blomberg, A., Warringer, J., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I. J., Bergman, C. M., Bensasson, D., Jones, M., Quail, M. A., Goodhead, I. ir Sims, S. (2009) ‘Population genomics of domestic and wild yeasts’, *Nature*, 458, pp. 337–341.
  28. Castón, J. R., Trus, B. L., Booy, F. P., Wickner, R. B., Wall, J. S. ir Steven, A. C. (1997) ‘Structure of L-A Virus: A Specialized Compartment for the Transcription and Replication of Double-stranded RNA’, *The Journal of Cell Biology*, 138(5), pp. 975–985.
  29. Chang, S.-L., Leu, J.-Y. ir Chang, T.-H. (2015) ‘A population study of killer viruses reveals different evolutionary histories of two closely related *Saccharomyces sensu stricto* yeasts’, *Molecular Ecology*, 24, pp. 4312–4322. doi: 10.1111/mec.13310.
  30. Chong, J., Chuang, R., Tung, L. ir Chang, T. (2004) ‘Ded1p , a conserved DExD / H-box translation factor , can promote yeast L-A virus negative-strand RNA synthesis in vitro’, *Nucleic Acids Research*, 32(6), pp. 2031–2038. doi: 10.1093/nar/gkh519.
  31. Chu, C., Das, K., Tyminski, J. R., Bauman, J. D., Guan, R., Qiu, W., Montelione, G. T., Arnold, E. ir Shatkin, A. J. (2011) ‘Structure of the guanylyltransferase domain of human mRNA capping enzyme’, *PNAS*, 108(25), pp. 10104–10108. doi: 10.1073/pnas.1106610108.
  32. Čitavičius, D., Inge-Večtomov, S.G. (1972) ‘Množestvennye mutanty u drožžej *Saccharomyces cerevisiae*-I’, *Polučenie i obščaja kharakteristika. Genetika*, 1, 95–102.
  33. Degreif, D., Cucu, B., Budin, I., Thiel, G. ir Bertl, A. (2019) ‘Lipid determinants of endocytosis and exocytosis in budding yeast’, *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier, 1864(7), pp. 1005–1016. doi: 10.1016/j.bbalip.2019.03.007.
  34. Demarini, D. J., Johnston, V. K., Konduri, M., Gutshall, L. L. ir Sarisky, R. T. (2003) ‘Intracellular hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity’, *Journal of Virological Methods*, 113, pp. 65–68. doi: 10.1016/S0166-0934(03)00226-X.
  35. Dinman, J. D., Icho, T. ir Wickner, R. B. (1991) ‘A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, pp. 174–178.
  36. Dinman, J. D. ir Wickner, R. B. (1992) ‘Ribosomal Frameshifting



- Efficiency and gag / gag-pol Ratio Are Critical for Yeast M1 Double-Stranded RNA Virus Propagation', *Journal of Virology*, 66(6), pp. 3669–3676.
37. Drinnenberg, I. A., Fink, G. R. ir Bartel, D. P. (2011) 'Compatibility with Killer Explains the Rise of RNAi-Deficient Fungi', *Science*, 333, p. 2011.
  38. Drinnenberg, I. A., Weinberg, D. E., Xie, K. T., Mower, J. P., Wolfe, K. H., Fink, G. R. ir Bartel, D. P. (2009) 'RNAi in Budding Yeast', *Science*, 978, pp. 544–551.
  39. Eastwood, M. D., Cheung, S. W. T., Lee, K. Y., Moffat, J. ir Meneghini, M. D. (2012) 'Article Developmentally Programmed Nuclear Destruction during Yeast Gametogenesis', *Developmental Cell*, 23, pp. 35–44. doi: 10.1016/j.devcel.2012.05.005.
  40. Eastwood, M. D. ir Meneghini, M. D. (2015) 'Developmental Coordination of Gamete Differentiation with Programmed Cell Death in Sporulating Yeast', *Eukaryotic Cell*, 14(9), pp. 858–867. doi: 10.1128/EC.00068-15.
  41. Edskes, H. K., Ohtake, Y. ir Wickner, R. B. (1998) 'Mak21p of *Saccharomyces cerevisiae*, a Homolog of Human CAATT-binding Protein, Is Essential for 60 S Ribosomal Subunit Biogenesis', *The Journal of Biological Chemistry*, 273(44), pp. 28912–28920.
  42. El-Banna, A. A., El-Sahn, M. A. ir Shehata, M. G. (2011) 'Yeasts Producing Killer Toxins : An Overview', *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.*, 8(2), pp. 41–53.
  43. El-sherbeini, M., Tipper, D. J., Mitchell, D. J. ir Bostian, K. A. (1984) 'Virus-Like Particle Capsid Proteins Encoded by Different L Double-Stranded RNAs of *Saccharomyces cerevisiae*: Their Roles in Maintenance of M Double-Stranded Killer Plasmids', *Molecular and Cellular Biology*, 4(12), pp. 2818–2827.
  44. Esteban, R., Fujimura, T. ir Wickner, R. B. (1988) 'Site-specific binding of viral plus single-stranded RNA to replicase-containing open virus-like particles of yeast', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, pp. 4411–4415.
  45. Esteban, R., Fujimura, T. ir Wickner, R. B. (1989) 'Internal and terminal cis-acting sites are necessary for *in vitro* replication of the L-A double-stranded RNA virus of yeast', *The EMBO Journal*, 8(3), pp. 947–954.
  46. Esteban, R., Vega, L. ir Fujimura, T. (2008) '20S RNA Narnavirus Defies the Antiviral Activity of SKI1 / XRN1 in *Saccharomyces cerevisiae*', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(38), pp. 25812–25820. doi: 10.1074/jbc.M804400200.
  47. Esteban, R. ir Wickner, R. B. (1986) 'Three Different M1 RNA-Containing Virus-like Particle Types in *Saccharomyces cerevisiae*: In Vitro M1 Double-Stranded RNA Synthesis', *Molecular and Cellular Biology*, 6(5), pp. 1552–1561.
  48. Esteban, R. ir Wickner, R. B. (1988) 'A Deletion Mutant of L-A

- Double-Stranded RNA Replicates Like M1 Double-Stranded RNA', *Journal of Virology*, 62(4), pp. 1278–1285.
49. Field, L. J., Bobek, L. A., Brennan, V. E., Reilly, J. D. ir Bruenn, J. A. (1982) 'There Are at Least Two Yeast Viral RNAs of the Same Size: An Explanation for Viral Exclusion', 31(November), pp. 193–200.
  50. Fink, G. R. ir Styles, C. A. (1972) 'Curing of a Killer Factor in *Saccharomyces cerevisiae*', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69(10), pp. 2846–2849.
  51. Fitchen, J. H. ir Beachy, R. N. (1993) 'Genetically Engineered Protection Against Viruses in Transgenic Plants', *Annual Review of Microbiology*, 47, pp. 739–763.
  52. Fujimura, T. ir Esteban, R. (2010) 'Yeast Double-stranded RNA Virus L-A Deliberately Synthesizes RNA Transcripts with 5'-Diphosphate', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(30), pp. 22911–22918. doi: 10.1074/jbc.M110.138982.
  53. Fujimura, T. ir Esteban, R. (2011) 'Cap-snatching mechanism in yeast L-A double-stranded RNA virus', *PNAS*, 108(43), pp. 17667–17671. doi: 10.1073/pnas.1111900108.
  54. Fujimura, T. ir Esteban, R. (2012) 'Cap Snatching of Yeast L-A Double-stranded RNA Virus Can Operate in Trans and Requires Viral Polymerase Actively Engaging in Transcription', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(16), pp. 12797–12804. doi: 10.1074/jbc.M111.327676.
  55. Fujimura, T. ir Esteban, R. (2019) 'The cap-snatching reaction of yeast L-A double-stranded RNA virus is reversible and the catalytic sites on both Gag and the Gag domain of Gag-Pol are active', *Molecular Microbiology*, 111, pp. 395–404. doi: 10.1111/mmi.14161.
  56. Fujimura, T., Esteban, R., Esteban, L. M. ir Wickner, R. B. (1990) 'Portable Encapsidation Signal of the L-A RNA Virus of *S. cerevisiae*', *Cell*, 62, pp. 619–626.
  57. Fujimura, T., Esteban, R. ir Wickner, R. B. (1986) 'In vitro L-A double-stranded RNA synthesis in virus-like particles from *Saccharomyces cerevisiae*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(June), pp. 4433–4437.
  58. Fujimura, T., Ribas, J. C., Makhov, A. M. ir Wickner, R. B. (1992) 'Pol of gag-pol fusion protein required for encapsidation of viral RNA of yeast L-A virus', *Nature Publishing Group*, 359, pp. 746–749.
  59. Fujimura, T. ir Wickner, R. (1987) 'Gene Overlap Results in a Viral Protein Having an RNA Binding Domain and a Major Coat Protein Domain', *Cell*, 55, pp. 663–671.
  60. Fujimura, T. ir Wickner, R. B. (1988) 'Replicase of L-A Virus-like Particles of *Saccharomyces cerevisiae*. In vitro conversion of exogenous L-A and M1 single-stranded RNAs to double-stranded form', *The Journal of Biological Chemistry*, 263(1), pp. 454–460.
  61. Fujimuras, T. ir Wickner, R. B. (1992) 'Interaction of Two *cis* Sites with

- the RNA Replicase of the Yeast L-A Virus', *The Journal of Biological Chemistry*, 267(4), pp. 2708–2713.
62. Gao, J., Chau, S., Chowdhury, F., Zhou, T., Hossain, S., McQuibban, G. A. ir Meneghini, M. D. (2019) 'Meiotic viral attenuation through an ancestral apoptotic pathway', *PNAS*, pp. 1–9. doi: 10.1073/pnas.1900751116.
  63. Genome, R. N. A. ir Particles, K. V. (1977) 'Translation of the L-Species dsRNA Genome of the Particles of *Saccharomyces cerevisiae*', (24), pp. 9010–9017.
  64. Ghabrial, S. A. (1998) 'Origin , Adaptation and Evolutionary Pathways of Fungal Viruses', *Virus Genes*, 16(1), pp. 119–131.
  65. Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L. ir Suzuki, N. (2015) '50-plus years of fungal viruses', *Virology*. Elsevier, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.034.
  66. Gier, S., Lermen, M., Schmitt, M. J. ir Breinig, F. (2019a) 'Substitution of cysteines in the yeast viral killer toxin K1 precursor reveals novel insights in heterodimer formation and immunity', *Scientific Reports*, 9(13127), pp. 1–8. doi: 10.1038/s41598-019-49621-z.
  67. Gier, S., Schmitt, M. J. ir Breinig, F. (2017) 'Expression of K1 Toxin Derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* Mimics Treatment with Exogenous Toxin and Provides a Useful Tool for Elucidating K1 Mechanisms of Action and Immunity', *Toxins*, 9(345), pp. 1–9. doi: 10.3390/toxins9110345.
  68. Gier, S., Schmitt, M. J. ir Breinig, F. (2020a) 'Analysis of Yeast Killer Toxin K1 Precursor Processing via Site-Directed Mutagenesis : Implications for Toxicity and Immunity', *Molecular Biology and Physiology*, 5(1), pp. 1–11.
  69. Gier, S., Simon, M., Gasparoni, G., Khalifa, S., Schulz, M. H. ir Schmitt, M. J. (2020b) 'Yeast Viral Killer Toxin K1 Induces Specific Host Cell Adaptions via Intrinsic Selection Pressure', *Applied and Enviromental Microbiology*, 86(4), pp. 1–13.
  70. Gier, S., Simon, M., Nordström, K., Khalifa, S., Schulz, M. H., Schmitt, M. J. ir Breinig, F. (2019b) 'Transcriptome Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in Response to Viral Killer Toxin K1', *Frontiers in Microbiology*, 10, pp. 1–18. doi: 10.3389/fmicb.2019.01102.
  71. Goto, K., Iwase, T., Kichise, K., Kitano, K., Totuka, A. ir Obata, T. (1990) 'Isolation and Properties of a Chromosome-dependent KHR Killer Toxin in *Saccharomyces cerevisiae*', *Agric. Biol. Chem.*, 54(2), pp. 505–509.
  72. Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F. ir Sakaguchi, K. (1981) 'Isolation and Characterization of Linear Deoxyribonucleic Acid Plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the Plasmid-Associated Killer Character', *Journal of Bacteriology*, 145(1), pp. 382–390.
  73. Halbach, F., Reichelt, P., Rode, M. ir Conti, E. (2013) 'The Yeast Ski Complex : Crystal Structure and RNA Channeling to the Exosome

- Complex', *Cell*. Elsevier Inc., 154(4), pp. 814–826. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.017.
74. Hannig, E. M. ir Leibowitz, M. J. (1985) 'Structure and expression of the M2 genomic segment of a type 2 killer virus of yeast', *Nucleic Acids Research*, 13(12), pp. 4379–4400.
  75. Hannig, E. M., Leibowitz, M. J. ir Wicknertf, R. B. (1985) 'On the Mechanism of Exclusion of M<sub>2</sub>, Double-stranded RNA by L-A-E Double-stranded RNA in *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*, 1, pp. 57–65.
  76. Hannig, E. M., Thiele, D. J. ir Leibowitz, M. J. (1984) '*Saccharomyces cerevisiae* Killer Virus Transcripts Contain Template-Coded Polyadenylate Tracts', *Molecular and Cellular Biology*, 4(1), pp. 101–109.
  77. He, C., Zhou, C. ir Kennedy, B. K. (2018) 'The yeast replicative aging model', *BBA - Molecular Basis of Disease*. Elsevier, 1864(9), pp. 2690–2696. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.02.023.
  78. Herrero, E., Bell, G. ir Castells-Roca, L. (2011) 'Heat Shock Response in Yeast Involves Changes in Both Transcription Rates and mRNA Stabilities', *PLoS ONE*, 6(2), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0017272.
  79. Hoskins, J. ir Butler, J. S. (2007) 'Evidence for distinct DNA- and RNA-based mechanisms of 5-fluorouracil cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*, 24, pp. 861–870. doi: 10.1002/yea.
  80. Hsu, C. L. ir Stevens, A. (1993) 'Yeast Cells Lacking 5' → 3' Exoribonuclease 1 Contain mRNA Species That Are Poly(A) Deficient and Partially Lack the 5' Cap Structure', *Molecular and Cellular Biology*, 13(8), pp. 4826–4835.
  81. Huang, S., Fei, D., Ma, Y., Wang, C., Shi, D., Liu, K., Li, M. ir Ma, M. (2020) 'Identification of a novel host protein interacting with the structural protein VP2 of deformed wing virus by yeast two-hybrid screening', *Virus Research*. Elsevier, 286(July), p. 198072. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198072.
  82. Icho, T. ir Wickner, R. B. (1989) 'The Double-stranded RNA Genome of Yeast Virus L-A Encodes Its Own Putative RNA Polymerase by Fusing Two Open Reading Frames', *The Journal of Biological Chemistry*, 264(12), pp. 6716–6723.
  83. Ivannikova, Y. V., Naumova, E. S. ir Naumov, G. I. (2007) 'Viral dsRNA in the wine yeast *Saccharomyces bayanus var uvarum*', *Research in Microbiology*, 158, pp. 638–643. doi: 10.1016/j.resmic.2007.07.008.
  84. Jokantaite, T., Laurinavičiene, D. and Bistrickaitė, G. (1982) 'Investigation of new killer and neutral systems in yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Abstracts of 11th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Montpellier, France*, p. 47.
  85. Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., Boutchou, M. M. ir Sonenberg, N. (2005) 'Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms', *Genes &*

- Development*, 19, pp. 104–113. doi: 10.1101/gad.1262905.(40S).
86. Kane, W. P., Pietras, D. F. ir Bruenn, J. A. (1979) 'Evolution of Defective-Interfering Double-Stranded RNAs of the Yeast Killer Virus', *Journal of Virology*, 32(2), pp. 692–696.
  87. Kapoor, P., Lavoie, B. D. ir Frappier, L. (2005) 'EBP2 Plays a Key Role in Epstein-Barr Virus Mitotic Segregation and Is Regulated by Aurora Family Kinases', *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), pp. 4934–4945. doi: 10.1128/MCB.25.12.4934.
  88. Ketting, R. F. (2011) 'The Many Faces of RNAi', *Developmental Cell*, 20, pp. 148–161. doi: 10.1016/j.devcel.2011.01.012.
  89. Konovalovas, A. (2018) 'Molecular determinants of *Totiviridae* family viruses of *Saccharomyces sensu stricto* clade', Summary of doctoral dissertation, Physical sciences, Biochemistry (04 P), Vilnius.
  90. Lee, M., Pietras, D. F., Nemeroff, M. E., Corstjanje, B. J., Field, L. J. ir Bruenn, J. A. (1986) 'Conserved Regions in Defective Interfering Viral Double-Stranded RNAs from a Yeast Virus', *Journal of Virology*, 58(2), pp. 402–407.
  91. Lee, Y. ir Wickner, R. B. (1992) 'MAK10, a glucose-repressible gene necessary for replication of a dsRNA virus of *Saccharomyces cerevisiae*, has T cell receptor alpha-subunit motifs', *Genetics*, 132(1), pp. 87–96.
  92. Liu, Y. ir Dieckmann, C. L. (1989) 'Overproduction of Yeast Virus-like Particles by Strains Deficient in a Mitochondrial Nuclease', *Molecular and Cellular Biology*, 9(8), pp. 3323–3331.
  93. Lukša, J., Podoliankaitė, M., Vepškaitė, I., Strazdaitė-Želienė, Ž., Urbonavičius, J. ir Servienė, E. (2015) 'Yeast B-1,6-Glucan Is a Primary Target for the *Saccharomyces cerevisiae* K2 Toxin', *Eukaryotic Cell*, 14(4), pp. 406–414. doi: 10.1128/EC.00287-14.
  94. Lukša, J., Ravoitytė, B., Konovalovas, A., Aitmanaitė, L., Butenko, A., Yurchenko, V., Serva, S. ir Servienė, E. (2017) 'Different Metabolic Pathways Are Involved in Response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and M Viruses', *Toxins*, 9(233), pp. 1–17. doi: 10.3390/toxins9080233.
  95. Luque, D., Mata, C. P., Suzuki, N., Ghabrial, S. A. ir Caston, J. R. (2018) 'Capsid Structure of dsRNA Fungal Viruses', *Viruses*, 10(481), pp. 1–19. doi: 10.3390/v10090481.
  96. Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. ir Polonelli, L. (1997) 'Yeast killer systems', *Clinical Microbiology Reviews*, 10(3), pp. 369–400.
  97. Martinac, B., Zhu, H., Kubalski, A., Zhou, X., Culbertson, M., Bussey, H. ir Kung, C. (1990) 'Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, pp. 6228–6232.
  98. Masison, D. C., Blanc, A., Ribas, J. C., Carroll, K., Sonenberg, N. ir Wickner, R. B. (1995) 'Decoying the Cap- mRNA Degradation System by a Double- Stranded RNA Virus and Poly(A)-mRNA Surveillance by a

- Yeast Antiviral System', *Molecular and Cellular Biology*, 15(5), pp. 2763–2771.
99. Mazar, R., Georgopoulos, D. E., Ramos, F. ir Leibowitz, M. J. (2000) 'The [KIL-d] Element Specifically Regulates Viral Gene Expression in Yeast', *Genetics*, 155, pp. 601–609.
  100. Mcbride, R. C., Boucher, N., Park, D. S., Turner, P. E. ir Townsend, J. P. (2013) 'Yeast response to LA virus indicates coadapted global gene expression during mycoviral infection', *FEMS Yeast Research*, 13, pp. 162–179. doi: 10.1111/1567-1364.12019.
  101. Mitchell, P. ir Tollrvey, D. (2000) 'Musing on the structural organization of the exosome complex', *Nature Structural Biology*, 7(10), pp. 843–846.
  102. Montanari, A., Francisci, S., Orsi, M. F. D. ir Bianchi, M. M. (2014) 'Strain-specific nuclear genetic background differentially affects mitochondria-related phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*', *MicrobiologyOpen*, 3(3), pp. 288–298. doi: 10.1002/mbo3.167.
  103. Morato, C., Gomes, C., Mariani, D., Fernandes, P. N., Pereira, M. D., Panek, A. D., Cristina, E. ir Eleutherio, A. (2008) 'The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780, pp. 1408–1411. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.05.011.
  104. Mura, M., Murcia, P., Caporale, M., Spencer, T. E., Nagashima, K., Rein, A. ir Palmarini, M. (2004) 'Late viral interference induced by transdominant Gag of an endogenous retrovirus', *PNAS*, 101(30), pp. 11117–11122.
  105. Nagy, P. D. (2008) 'Yeast as a Model Host to Explore Plant Virus-Host Interactions', *The Annual Review of Phytopathology*, 46, pp. 217–42. doi: 10.1146/annurev.phyto.121407.093958.
  106. Naito, T., Kiyasu, Y., Sugiyama, K., Kimura, A., Nakano, R., Matsukage, A. ir Nagata, K. (2007) 'An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis', *PNAS*, 104(46), pp. 18235–18240.
  107. Naitow, H., Tang, J., Canady, M., Wickner, R. B. ir Johnson, J. E. (2002) 'L-A virus at 3 . 4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism', *Nature Structural Biology*, 9(10), pp. 725–728. doi: 10.1038/nsb844.
  108. Naumova, G., Naumov, T. (1973) 'Comparative genetics of yeasts. XIII, Comparative study of *Saccharomycetes* killers from different collections', *Genetika*, 9, pp. 140–145.
  109. Nawaz-ul-rehman, M. S., Prasanth, K. R., Baker, J. ir Nagy, P. D. (2013) 'Yeast screens for host factors in positive-strand RNA virus replication based on a library of temperature-sensitive mutants', *Methods*, 59(2), pp. 207–216. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.11.001.
  110. Neiman, A. M. (2011) 'Sporulation in the Budding Yeast', *Genetics*, (November), pp. 737–765. doi: 10.1534/genetics.111.127126.

111. Nielsen, J. (2019) 'Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory', *Biotechnology Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 1800421(14), pp. 1–9. doi: 10.1002/biot.201800421.
112. Noueiry, A. O., Chen, J. ir Ahlquist, P. (2000) 'A mutant allele of essential, general translation initiation factor DED1 selectively inhibits translation of a viral mRNA', *PNAS*, 97(24), pp. 1–6.
113. Ohtake, Y. ir Wickner, R. B. (1995) 'Yeast Virus Propagation Depends Critically on Free 60S Ribosomal Subunit Concentration', *Molecular and Cellular Biology*, 15(5), pp. 2772–2781.
114. Orentaite, I., Poranen, M. M., Oksanen, H. M., Daugelavicius, R. ir Bamford, D. H. (2016) 'K2 killer toxin-induced physiological changes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *FEMS Yeast Research*, 16, pp. 1–8. doi: 10.1093/femsyr/fow003.
115. Owsianka, A. M. ir Patel, A. H. (1999) 'Hepatitis C Virus Core Protein Interacts with a Human DEAD Box Protein DDX3', *Virology*, 257, pp. 330–340.
116. Page, N., Gerard-Vincent, M., Menard, P., Beaulieu, M., Azuma, M., Dijkgraaf, G. J. P., Li, H., Marcoux, J., Nguyen, T., Dowse, T., Sdicu, A. ir Bussey, H. (2003) 'A *Saccharomyces cerevisiae* Genome-Wide Mutant Screen for Altered Sensitivity to K1 Killer Toxin', *Genetics*, 894(March), pp. 875–894.
117. Park, C.-M., Bruenn, J. A., Ganesa, C., Flurkey, W. F., Bozarth, R. F. ir Koltin, Y. (1994) 'Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin KP4', *Molecular Microbiology*, 11(1), pp. 155–164.
118. Park, C., Lopinski, J. D., Masuda, J., Tzeng, T. ir Bruenn, J. A. (1996) 'A Second Double-Stranded RNA Virus from Yeast', *Virology*, 454(216), pp. 451–454.
119. Patel, A., Malinowska, L., Saha, S., Wang, J. ir Alberti, S. (2017) 'ATP as a biological hydrotrope', *Science*, 356, pp. 753–756.
120. Pathak, K. B. ir Nagy, P. D. (2009) 'Defective Interfering RNAs: Foes of Viruses and Friends of Virologists', *Viruses*, 1, pp. 895–919. doi: 10.3390/v1030895.
121. Pereira, E. D. J., Panek, A. D., Cristina, E. ir Eleutherio, A. (2003) 'Protection against oxidation during dehydration of yeast', *Cell Stress & Chaperones*, 8(2), pp. 120–124.
122. Pfeiffer, P. ir Radler, F. (1984) 'Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2.', *Archives of microbiology*, 137(4), pp. 357–61.
123. Pieczynska, M. D., Visser, J. A. G. M. de ir Korona, R. (2013) 'Incidence of symbiotic dsRNA "killer" viruses in wild and domesticated yeast', *FEMS Yeast Research*, 13, pp. 856–859. doi: 10.1111/1567-1364.12086.
124. Ramírez, M., Velaquez, R., Maqueda, M., Lopez-Pineiro, A. ir Ribas, J. C. (2015) 'A new wine *Torulaspora delbrueckii* killer strain with broad

- antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus', *Frontiers in Microbiology*, 6, pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2015.00983.
125. Rausch, J. W., Miller, J. T. ir Grice, S. F. J. Le (2017) 'Reverse Transcription in the *Saccharomyces cerevisiae* Long-Terminal Repeat Retrotransposon Ty3', *Viruses*, 9(44), pp. 1–15. doi: 10.3390/v9030044.
126. Ribas, J. C., Fujimura, T. ir Wickner, R. B. (1994b) 'A Cryptic RNA-Binding Domain in the Pol Region of the L-A Double-Stranded RNA Virus Gag-Pol Fusion Protein', *Journal of Virology*, 68(9), pp. 6014–6020.
127. Ribas, J. C., Fujimuras, T. ir Wickner, R. B. (1994a) 'Essential RNA Binding and Packaging Domains of the Gag-Pol Fusion Protein of the L-A Double-stranded RNA virus of *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, 269(45), pp. 28420–28428.
128. Ribas, J. C. ir Wickner, R. B. (1992) 'RNA-dependent RNA polymerase consensus sequence of the L-A double-stranded RNA virus: Definition of essential domains L-A', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, pp. 2185–2189.
129. Ribas, J. C. ir Wickner, R. B. (1998) 'The Gag Domain of the Gag-Pol Fusion Protein Directs Incorporation into the L-A Double-stranded RNA Viral Particles in *Saccharomyces cerevisiae*', *The Journal of Biological Chemistry*, 273(15). doi: 10.1074/jbc.273.15.9306.
130. Ridley, S. P. ir Wickner, R. B. (1983) 'Defective Interference in the Killer System of *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Virology*, 45(2), pp. 800–812.
131. Riffer, F., Einfeld, K., Breinig, F. ir Schmitt, M. J. (2002) 'Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Microbiology*, 148, pp. 1317–1328.
132. Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. ir Séraphin, B. (1999) 'A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration', *Nature Biotechnology*, 17, pp. 7–9.
133. Risler, J. K., Kenny, A. E., Palumbo, R. J., Gamache, E. R. ir Curcio, M. J. (2012) 'Host co-factors of the retrovirus-like transposon Ty1', *Mobile DNA*, 3(12), pp. 1–22.
134. Rodríguez-cousin, N., Maqueda, M., Zamora, E., Esteban, R. ir Ramírez, M. (2011) 'A New Wine *Saccharomyces cerevisiae* Killer Toxin (Klus), Encoded by a Double-Stranded RNA Virus, with Broad Antifungal Activity Is Evolutionarily Related to a Chromosomal Host Gene', *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), pp. 1822–1832. doi: 10.1128/AEM.02501-10.
135. Rodríguez-Cousino, N. ir Esteban, R. (2017) 'Relationships and Evolution of Double- Stranded RNA Totiviruses of Yeasts Inferred from Analysis of L-A-2 and L-BC Variants in Wine Yeast Strain', *Applied and Environmental Microbiology*, 83(4), pp. 1–18.



136. Rodríguez-Cousiño, N., Gomez, P. ir Esteban, R. (2013) ‘L-A-lus, a New Variant of the L-A Totivirus Found in Wine Yeasts with Klus Killer Toxin- Encoding Mlus Double-Stranded RNA: Possible Role of Killer Toxin- Encoding Satellite RNAs in the Evolution of Their Helper Viruses’, *Applied and Enviromental Microbiology*, 79(15), pp. 4661–4674. doi: 10.1128/AEM.00500-13.
137. Rodríguez-Cousiño, N., Gomez, P. ir Esteban, R. (2017) ‘Variation and Distribution of L-A Helper Totiviruses in *Saccharomyces sensu stricto* Yeasts Producing’, *Toxins*, 9(313), pp. 1–20. doi: 10.3390/toxins9100313.
138. Rogers, D. ir Bevan, E. A. (1978) ‘Group Classification of Killer Yeasts Based on Cross-reactions between Strains of Different Species and Origin’, *Journal of General Microbiology*, 105, pp. 199–202.
139. Routhier, E. ir Bruenn, J. A. (1998) ‘Functions of Conserved Motifs in the RNA-Dependent RNA Polymerase of a Yeast Double-Stranded RNA Virus’, *Journal of Virology*, 72(5), pp. 4427–4429.
140. Rowley, P. A. (2017) ‘The frenemies within: viruses , retrotransposons and plasmids that naturally infect *Saccharomyces* yeasts’, *Yeast*, 34, pp. 279–292. doi: 10.1002/yea.
141. Rowley, P. A., Ho, B., Bushong, S., Johnson, A. ir Sawyer, S. L. (2016) ‘XRN1 Is a Species-Specific Virus Restriction Factor in Yeasts’, *PLoS Pathogens*, 12(10), pp. 1–27. doi: 10.1371/journal.ppat.1005890.
142. Saint-Georges, Y., Garcia, M., Delaveau, T., Jourden, L. ir Crom, S. Le (2008) ‘Yeast Mitochondrial Biogenesis: A Role for the PUF RNA-binding Protein Puf3p in mRNA Localization’, *PLoS ONE*, 3(6), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0002293.
143. Sakaki, K., Tashiro, K., Kuhara, S. ir Mihara, K. (2003) ‘Response of Genes Associated with Mitochondrial Function to Mild Heat Stress in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*’, *J. Biochem*, 134(3), pp. 373–384. doi: 10.1093/jb/mvg155.
144. Sampaio, J. P. and Goncalves, P. (2008) ‘Natural Populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal Are Associated with Oak Bark and Are Sympatric with *S. cerevisiae*’, *Applied and Enviromental Microbiology*, 74(7), pp. 2144–2152. doi: 10.1128/AEM.02396-07.
145. Santos, D. A., Tu, B. P. ir Weissman, J. S. (2019) ‘Cycloheximide can distort measurements of mRNA levels and translation efficiency’, *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 47(10), pp. 4974–4985. doi: 10.1093/nar/gkz205.
146. Satwika, D., Klassen, R. ir Meinhardt, F. (2012) ‘Anticodon nuclease encoding virus-like elements in yeast’, *Appl Microbiol Biotechnol*, 96, pp. 345–356. doi: 10.1007/s00253-012-4349-9.
147. Schmitt, M. J. ir Breinig, F. (2002) ‘The viral killer system in yeast: from molecular biology to application’, *FEMS Microbiology Reviews*, 26, pp. 257–276.

148. Schmitt, M. J. ir Breinig, F. (2006) 'Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection', *Nature*, 4, pp. 212–221. doi: 10.1038/nrmicro1347.
149. Schmitt, M. J., Klavehn, P., Wang, J., Schong, I. ir Tipper, D. J. (1996) 'Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin', *Microbiology*, 142, pp. 2655–2662.
150. Schmitt, M. J. ir Neuhausen, F. (1994) 'Killer Toxin-Secreting Double-Stranded RNA Mycoviruses in the Yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*', *Journal of Virology*, 68(3), pp. 1765–1772.
151. Schmitt, M. J. ir Tipper, D. J. (1990) 'K28, A Unique Double-Stranded RNA Killer Virus of *Saccharomyces cerevisiae*', *Molecular and Cellular Biology*, 10(9), pp. 4807–4815.
152. Schmitt, M. J. ir Tipper, D. J. (1992) 'Genetic Analysis of Maintenance and Expression of L and M Double-stranded RNAs from Yeast Killer Virus K28', 8, pp. 373–384.
153. Schmitt, M. J. ir Tipper, D. J. (1995) 'Sequence of the M28 dsRNA: Preprotoxin Is Processed to an a/b Heterodimeric Protein Toxin', *Virology*, 213, pp. 341–351.
154. Searfoss, A., Dever, T. E. ir Wickner, R. B. (2001) 'Linking the 3' Poly(A) Tail to the Subunit Joining Step of Translation Initiation: Relations of Pab1p, Eukaryotic Translation Initiation Factor 5B (Fun12p), and Ski2p-Slh1p', *Molecular and Cellular Biology*, 21(15), pp. 4900–4908. doi: 10.1128/MCB.21.15.4900.
155. Seiple, L., Jaruga, P., Dizdaroglu, M. ir Stivers, J. T. (2006) 'Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast', *Nucleic Acids Research*, 34(1), pp. 140–151. doi: 10.1093/nar/gkj430.
156. Sheth, U. ir Parker, R. (2003) 'Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies', *Science*, 300, pp. 805–809.
157. Sniegowski, P. D., Dombrowski, P. G. ir Fingerman, E. (2002) '*Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics', *FEMS Yeast Research*, 1, pp. 299–306.
158. Somers, J. M. (1973) 'Isolation of Suppressible Sensitive Mutants from Killer and Neutral Strains of *Saccharomyces cerevisiae*', *Genetics*, 74, pp. 571–579.
159. Somers JM, Bevan EA. (1969) 'The inheritance of the killer character in yeast', *Genetics Research*, 13 (1) , pp. 71 - 83.
160. Sommer, S. S. ir Wickner, R. B. (1982) 'Yeast L dsRNA Consists of at Least Three Distinct RNAs; Evidence That the Non-Mendelian Genes [HOK], [NEX] and [EXL] Are on One of These dsRNAs', *Cell*, 31, pp. 429–441.
161. Starheim, K. K., Gromyko, D., Evjenth, R., Rynningen, A., Varhaug, J. E., Lillehaug, J. R. ir Arnesen, T. (2009) 'Knockdown of Human Na-Terminal

- Acetyltransferase Complex C Leads to p53-Dependent Apoptosis and Aberrant Human Arl8b Localization', *Molecular and Cellular Biology*, 29(13), pp. 3569–3581. doi: 10.1128/MCB.01909-08.
162. Starmer, W. T., Ganter, P. F. ir Aberdeen, V. (1992) 'Geographic Distribution and Genetics of Killer Phenotypes for the Yeast *Pichia kluyveri* across the United States', *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3), pp. 990–997.
163. Stellberger, T., Häuser, R., Baiker, A., Pothineni, V. R., Haas, J. ir Uetz, P. (2010) 'Improving the yeast two-hybrid system with permuted fusions proteins: the *Varicella Zoster Virus* interactome', *Proteome Science*, 8(8), pp. 1–9.
164. Suzuki, G., Weissman, J. S. ir Tanaka, M. (2015) '[KIL-d] Protein Element Confers Antiviral Activity via Catastrophic Viral Mutagenesis', *Molecular Cell*, 60(4), pp. 651–660. doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.020.
165. Sweeney, T. K., Tate, A. ir Fink, G. R. (1976) 'A Study of the Transmission and Structure of Double Stranded RNAs associated with the Killer Phenomenon in *Saccharomyces Cerevisiae*', *Genetics*, (84), pp. 27–42.
166. Tang, J., Naitow, H., Gardner, N. A., Kolesar, A., Tang, L., Wickner, R. B. ir Johnson, J. E. (2005) 'The structural basis of recognition and removal of cellular mRNA 7-methyl G "caps" by a viral capsid protein: a unique viral response to host defense', *Journal of Molecular Recognition*, 18, pp. 158–168. doi: 10.1002/jmr.724.
167. Taylor, D. J. ir Bruenn, J. (2009) 'The evolution of novel fungal genes from non-retroviral RNA viruses', *BMC Biology*, 7(88), pp. 1–11. doi: 10.1186/1741-7007-7-88.
168. Tercero, J. C., Dinman, J. D. ir Wickner, R. B. (1993) 'Yeast MAK3 N-Acetyltransferase Recognizes the N-Terminal Four Amino Acids of the Major Coat Protein (gag) of the L-A Double-Stranded RNA Virus', *Journal of Bacteriology*, 175(10), pp. 3192–3194.
169. Tercero, J. C., Riles, L. E. ir Wickner, R. B. (1992) 'Localized Mutagenesis and Evidence for Post-transcriptional Regulation of MAK3', *The Journal of Biological Chemistry*, 267(28), pp. 20270–20276.
170. Terceros, J. C. ir Wickner, R. B. (1992) 'MAK3 Encodes an N-Acetyltransferase Whose Modification of the L-A gag NH2 Terminus Is Necessary for Virus Particle Assembly', *The Journal of Biological Chemistry*, 267(28), pp. 3–7.
171. Tipper, D. J. ir Schmitt, M. J. (1991) 'Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes', *Molecular Microbiology*, 5(10), pp. 2331–2338.
172. Toh-e, A., Guerry, P. ir Wickner, R. B. (1978) 'Chromosomal Superkiller Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Bacteriology*, 136(3), pp. 1002–1007.
173. Toh-e, A. ir Wickner, R. B. (1980) "' Superkiller " mutations suppress

- chromosomal mutations affecting double-stranded RNA killer plasmid replication in *Saccharomyces cerevisiae*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(1), pp. 527–530.
174. Tucker, J. M. ir Gar, D. J. (2016) 'Ty1 escapes restriction by the self-encoded factor p22 through mutations in capsid', *Mobile Genetic Elements*. Taylor & Francis, 6(2), pp. 1–5. doi: 10.1080/2159256X.2016.1154639.
175. Valle, R. P. C. ir Wickner, R. B. (1993) 'Elimination of L-A Double-Stranded RNA Virus of *Saccharomyces cerevisiae* by Expression of gag and gag-pol from an L-A cDNA Clone', *Journal of Virology*, 67(5), pp. 2764–2771.
176. Vepškaitė-Monstavičė, I., Lukša, J., Konovalovas, A., Ežerskytė, D., Stanevičienė, R., Strazdaitė-Želienė, Ž., Serva, S. ir Servienė, E. (2018) '*Saccharomyces paradoxus* K66 Killer System Evidences Expanded Assortment of Helper and Satellite Viruses', *Viruse*, 10(564), pp. 1–19. doi: 10.3390/v10100564.
177. Vodkin, M., Katterman, F. ir Fink, G. R. (1974) 'Yeast Killer Mutants with Altered Double-Stranded Ribonucleic Acid', *Journal of Bacteriology*, 117(2), pp. 681–686.
178. Warner, B. E., Ballinger, M. J., Yerramsetty, P., Reed, J., Taylor, D. J., Smith, T. J. ir Bruenn, J. A. (2018) 'Cellular production of a counterfeit viral protein confers immunity to infection by a related virus', *PeerJ*, 6, pp. 1–14. doi: 10.7717/peerj.5679.
179. Weinstein, L. A., Capaldo-kimball, F. ir Leibowitz, M. J. (1993) 'Genetics of Heat-Curability of Killer Virus of Yeast', *Yeast*, 9, pp. 411–418.
180. Wickner, R. (1980) 'Plasmids Controlling Exclusion of the KP Killer RNA Plasmid of Yeast', *Cell*, 21, pp. 217–226.
181. Wickner, R. B. (1986) 'Double-Stranded RNA Replication in Yeast: The Killer System', *Annual Review of Biochemistry*, 55, pp. 373–395.
182. Wickner, R. B. (1996) 'Double-Stranded RNA Viruses of *Saccharomyces cerevisiae*', *Microbiological Reviews*, 60(1), pp. 250–265.
183. Wickner, R. B., Fujimura, T. ir Esteban, R. (2013) 'Viruses and Prions of *Saccharomyces cerevisiae*'. 1st edn, *Advances in Virus Research*, 2013, Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-394315-6.00001-5.
184. Wickner, R. B., Icho, T., Fujimura, T. ir Widner, W. R. (1991) 'Expression of Yeast L-A Double-Stranded RNA Virus Proteins Produces Derepressed Replication: a ski-Phenocopy', *Journal of Virology*, 65(1), pp. 155–161.
185. Wickner, R. B., Shewmaker, F. P., Bateman, D. A., Edskes, H. K., Gorkovskiy, A. ir Dayani, Y. (2015) 'Yeast Prions: Structure, Biology, and Prion-Handling Systems', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), pp. 1–17. doi: 10.1128/MMBR.00041-14.
186. Wickners, R. B. (1993) 'Double-stranded RNA Virus Replication and Packaging', *The Journal of Biological Chemistry*, 268(6), pp. 3797–3800.
187. Winder, R. W. ir Wickner, R. B. (1993) 'Evidence that the SKI Antiviral

- System of *Saccharomyces cerevisiae* Acts by Blocking Expression of Viral mRNA', *Molecular and Cellular Biology*, 13(7), pp. 4331–4341.
188. Yancey, P. H. (2005) 'Organic osmolytes as compatible , metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses', *The Journal of Experimental Biology*, pp. 2819–2830. doi: 10.1242/jeb.01730.
189. Yao, W. ir Bruenn, J. A. (1995) 'Interference with Replication of Two Double-Stranded RNA Viruses by Production of N-Terminal Fragments of Capsid Polypeptides', *Virology*, 214, pp. 215–221.
190. Yao, W., Muqtadir, K. ir Bruenn, J. A. (1995) 'Packaging in a Yeast Double-Stranded RNA Virus', *Journal of Virology*, 69(3), pp. 1917–1919.

# SANTRAUKA

## Contents

List of abbreviations.....	112
Introduction.....	113
1. Materials and methods.....	117
<b>1.1 Materials .....</b>	<b>117</b>
1.1.1 Reagents .....	117
1.1.2 Enzymes and DNA ladders .....	117
1.1.3 Molecular biology kits.....	117
1.1.4 Growth media.....	117
1.1.5 Bacterial and yeast strains .....	118
1.1.6 Oligonucleotides.....	118
1.1.7 Plasmids.....	119
1.1.8 Solutions.....	121
<b>1.2 Methods .....</b>	<b>121</b>
1.2.1 Protein expression vectors.....	121
1.2.2 Identification of variable regions of LA viral proteins.....	121
1.2.3 Total RNA and dsRNA extraction .....	122
1.2.4 Yeast transformation .....	122
1.2.5 Elimination of M1 virus from K7 strain.....	123
1.2.6 Densitometric analysis .....	123
1.2.7 Statistical analysis .....	123
2. Results .....	124
<b>2.1 The impact of expression of truncated Gag proteins from different LA viruses on inherent LA and M viruses .....</b>	<b>125</b>
2.1.1 The impact of the truncated LA-1, LA-2, LA-lus, and LA-28 capsid proteins expression on endogenous LA and M viruses.....	127
2.1.2 The universal method for endogenous LA and M virus elimination .....	127
<b>2.2 The interaction of recombinant Gag and GagPol proteins with endogenous viral systems.....</b>	<b>128</b>
2.2.1 The impact of different LA virus Gag and GagPol protein expression on endogenous LA and M viruses.....	129

2.2.2 The role of M virus maintenance for interactions between LA recombinant proteins and endogenous LA viruses.....	133
<b>2.3 The specificity determinants of interactions between LA viruses .....</b>	<b>134</b>
2.3.1 The construction of chimeric LA-1 viral proteins expression vectors .....	135
2.3.2 The impact of chimeric LA-1 viral proteins expression on inherent LA and M viruses .....	136
3. Discussion .....	142
Conclusions .....	145
References .....	146

## **List of abbreviations**

aa – amino acids

bp – base pair

DMSO – dimethyl sulfoxide

dsRNA – double-stranded RNA

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid

G418 – geneticin

LB – Luria Bertani bacteria growth medium

MD - yeast growth medium supplemented with methylene blue

OD – optical density

RT-RCR – reverse-transcription polymerase chain reaction

PEG – polyethylene glycol

SDS – sodium dodecyl sulphate

ssRNA – single-stranded RNA

YPD – yeast extract, peptone, and dextrose yeast growth medium



## Introduction

*Saccharomyces cerevisiae* is a genuine model organism in industry and fundamental research. Yeast has a relatively small genome, and it was the first fully sequenced eukaryotic genome ever. Some 40% of annotated yeast genes find homologs in a human genome (Alves-Rodrigues *et al.*, 2006). *S. cerevisiae* is an attractive model organism due to its small genome and ease of cultivation under laboratory conditions. The research involving baking yeast as a model organism is also convenient because of a broad range of available molecular biology tools – deletion, overexpression, down-regulatable essential-gene libraries, and various databases. Yeast research substantiated insights on numerous critical molecular processes: cell cycle regulation, transcription, degradation, and translation pathways of mRNA, the biology of prions, protein secretion pathways, autophagy, and cell senescence (Alves-Rodrigues *et al.*, 2006; Wickner *et al.*, 2013; He *et al.*, 2018; Nielsen, 2019). *S. cerevisiae* is a desirable model organism in virus research. Yeast cells are competent for replication of various plant and animal virus genomes (Nagy, 2008). Using *S. cerevisiae* as a model organism, the functionality of proteins from pathogenic viruses such as HIV, Epstein-Barr, and Hepatitis C was revealed (Blanco *et al.*, 2003; Demarini *et al.*, 2003; Kapoor *et al.*, 2005). It was also used to identify host factors involved in the replication of various plant (Nagy, 2008), insect (Huang *et al.*, 2020), and mammal (Naito *et al.*, 2007; Stellberger *et al.*, 2010) viruses. Studies of yeast transposons elucidated the mechanism involved in retroviruses' functioning (Risler *et al.*, 2012; Rausch *et al.*, 2017).

*S. cerevisiae* and other yeast species of the *Saccharomyces* genus possess endogenous ssRNA and dsRNA viruses (Drinnenberg *et al.*, 2011; Wickner *et al.*, 2013). The best-known are killer phenotype-encoding LA and M dsRNA viruses of the *Totiviridae* family. LA genome encodes capsid protein Gag and a fusion protein GagPol, which functions as RNA-dependent RNA polymerase; these proteins are necessary for LA and M virus replication. M virus genome encodes toxin and immunity to that toxin (Wickner *et al.*, 2013). Up to now, a range of different LA and M viruses have been identified. In nature, M viruses are detected altogether with their specific helper virus LA (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). It is unknown if the observed specificity is a random evolutionary event or has a particular role in different viral systems' functioning. The interplay between LA viruses and M viruses and the specificity determinants are not fully

understood. The research of the mentioned aspects is essential for understanding the biocidal phenotype of yeasts and revealing the ontogenesis mechanism of these viruses.

### **Research aim**

The investigation of compatibility of LA and M viruses in *S. cerevisiae* and identification of potential specificity determinants.

### **Objectives**

1. Evaluation of the impact of expression of truncated Gag proteins from different LA viruses on the maintenance of endogenous LA and M viruses.
2. Examination of the interactions of various endogenous LA and M viruses with heterologous LA-1, LA-lus, and LA-28 viral particles.
3. Investigation of the role of variable sequences of LA proteins in interactions between recombinant viral proteins and endogenous LA and M viruses.

### **Scientific novelty**

This study evaluated the impact of recombinant LA viral protein expression on all known *S. cerevisiae* LA and M viral systems and one related, belonging to the *S. paradoxus* viral system. It was found that the expression of truncated LA capsid protein Gag causes the elimination of native yeast viruses despite their type. For the first time, the interactions of LA-1, LA-lus, and LA-28 viral proteins with native viral systems were studied systematically. To achieve this, we used viral protein expression vectors, which allowed us to exclude the impact of external cellular factors resulting from cytoplasm fusion, a standard method to study interactions between viruses. The results indicate that the specificity of interactions between recombinant LA proteins and endogenous yeast viral systems could depend on the specific type of M virus. The M satellite's maintenance is an essential factor in the interplay of LA recombinant protein with native LA virus. The expression vectors of chimeric LA viral proteins were constructed to examine the mechanism of specific LA protein interactions within native viral systems. The chimeric proteins are designed to change the variable protein sequences from one LA virus into a corresponding sequence of

another LA virus. The studies of the impact of chimeric protein expression on native viral systems provided insights into the functionality of variable viral protein sequences and their role in establishing the specific interactions between different viruses.

### **Research significance**

LA and M viruses are broadly spread in wild-type and laboratory *S. cerevisiae* strains (Pieczynska *et al.*, 2013). Since yeast is a classical model organism used to investigate various molecular processes, it is crucial to evaluate the overall impact of LA and M virus maintenance on a cell. Until now, LA and M viruses from host cells are typically eliminated by treatment with 5-FU, cycloheximide, or by growing yeast at elevated temperature (Fink and Styles, 1972; Tipper and Schmitt, 1991; Weinstein *et al.*, 1993). These treatments are cytotoxic and could result in false positive or false negative hits in various -omics experiments (Sakaki *et al.*, 2003; Seiple *et al.*, 2006; Hoskins and Butler, 2007; Saint-Georges *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2019). The method for elimination of native LA and M viruses from cells developed during this work was used to prepare yeast strains for transcriptomics and proteomics studies (Lukša *et al.*, 2017; Konovalovas, 2018). The results obtained in this study also indicate that capsid proteins of different LA types can directly interact with each other.

In nature, different M viruses are found along with specific LA viruses (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). As a result of this phenomenon, researchers proposed the coevolution hypothesis, which states that LA viruses evolved to propagate only a particular M virus (Rodriguez-Cousino and Esteban, 2017). The mechanisms ensuring this kind of distinction are unknown. The interactions of different LA viruses are unidentified as well. We developed the methodology to analyze LA viral protein interactions with endogenous LA and M viral systems. It was found that different LA viruses can propagate various M viruses, suggesting partially non-specific LA and M virus interactions. On the other hand, the impact of viral proteins from various LA viruses on endogenous LA viruses differed depending on the native viral system type. If the satellite virus is absent, the observed interactions of ectopically expressed proteins and endogenous LA virus change. With that in mind, it seems that LA and M viruses function as an intertwined system. As was mentioned before, the reasons for observed specificity are unknown. The viral protein sequences of different LA types

are vastly similar (87-98 % identity) (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018), although in alignment of viral proteins sequences, highly variable regions could be identified. We raised the idea that variable viral proteins regions could establish specific interactions between different viruses. The impact of chimeric LA viral protein expression on native viral systems was addressed. The obtained results enlightened specific LA protein sequence functionalities and their role in the specificity of interactions between viruses.

### **Findings presented for the defense**

1. The expression of truncated LA capsid proteins causes the non-specific elimination of endogenous LA and M viruses.
2. The Gag and GagPol proteins encoded by genomes of different LA viruses interact with endogenous LA and M viruses in a partially specific manner.
3. The impact of recombinant viral proteins on the replication of endogenous LA viruses is linked to the type of endogenous M virus and its maintenance in a host cell.
4. The variable sequences of LA Gag and GagPol proteins have different roles in the interaction between LA and M viruses and assurance of viral protein functioning.

## 1. Materials and methods

### 1.1 Materials

#### 1.1.1 Reagents

All reagents used in this study were of the highest quality available.

#### 1.1.2 Enzymes and DNA ladders

DNA polymerases "Phusion" and "DreamTaq", reverse transcriptase "Maxima", polynucleotide kinase "T4 PNK ", alkaline phosphatase "FastAP", deoxyribonuclease "DNaseI", T4 DNA ligase, restriction endonucleases, DNA ladders "O'GeneRuler DNA Ladder Mix "and "GeneRuler™ 1kb DNA ladder mix ". Enzymes and DNA ladders were obtained from "Thermo Scientific" and used according to the manufacturer's recommendations.

#### 1.1.3 Molecular biology kits

DNA purification kits "GeneJET Gel Extraction Kit "and "GeneJETMiniprep Kit "were obtained from "Thermo Scientific "and used according to the manufacturer's recommendations.

#### 1.1.4 Growth media

**Table 1.1** Growth medias used in this study.

Medium	Composition
<b>LB</b>	1 % peptone, 0,5 % yeast extract, 0,5 % NaCl. For agarized media, 2 % of agar was added.
<b>YPD</b>	2 % peptone, 1% yeast extract, 2 % glucose. For agarised media, 2 % of agar was added.
<b>MD</b>	0,5 % yeast extract, 0,5 % peptone, 0,95 % citric acid, 1,4 % Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O, 2 % glucose, 2 % agar and 0,015 % methylene blue (depending on strain tested pH adjusted to 4,7 – 5,2).

### 1.1.5 Bacterial and yeast strains

**Table 1.2** Bacterial and yeast strains used in this study.

Strain name	Species	Genotype	Reference
DH10B	<i>E. coli</i>	F- <i>endA1 deoR+ recA1 galE15 galK16 nupGrpsL Δ(lac)X74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) StrR λ-</i>	Invitrogen
BY4741	<i>S. cerevisiae</i>	MATahis3Δ1 <i>leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, ScV-LA-1</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
BY4741ΔLA	<i>S. cerevisiae</i>	MATahis3Δ1 <i>leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, LA-0</i>	Konovalovas, 2018
α'1	<i>S. cerevisiae</i>	MATα, <i>leu2-2</i>	Čitavičius and Inge-Večtomov, 1972
K7	<i>S. cerevisiae</i>	MATa, <i>arg9, kil-K1</i>	Somers and Bevan, 1969
K7ΔM	<i>S. cerevisiae</i>	MATa, <i>arg9, kil-K1-0</i>	This work
Rom K-100	<i>S. cerevisiae</i>	<i>ScV-LA-2, M-2</i>	Jokantaitė <i>et al.</i> , 1982
M437	<i>S. cerevisiae</i>	<i>ScV-LA-lus, M-2</i>	Naumova and Naumov, 1973
M437ΔLA	<i>S. cerevisiae</i>	<i>ScV-LA-lus-0, M-2-0</i>	This work
SRB-15-4	<i>S. cerevisiae</i>	<i>ScV-LA-lus, M-lus</i>	Vepškaitė-Monstavičė <i>et al.</i> , 2018
K28	<i>S. paradoxus</i>	<i>SpV-LA-28, M-28</i>	Pfeiffer and Radler, 1984

### 1.1.6 Oligonucleotides

**Table 1.3** Oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence (5' → 3')	Remarks
YCFH-AK3	GCGGATCCTTAAAAATGTT GAGATTTCGTTACCAAAAAC TCTCAAG	Primers for amplification of LA-1 Gag coding sequence (to 641 aa)
YCFH-AK4	CTCACGCGGCCGCAGATCT GAAACCCTGCTGCGTACGG CGTACACTAC	
LA-1.R1.F	AAGTCAATTTTCGTGCTTAT G	Primers for amplification of partial pYAK-G plasmid sequence.
LA-1.R1.R	CGTGATTGTCATACCAAC	

LA-lus.R1.F	TGACATTACTCATGAATAT G	Primers for amplification of C-terminal variable coding sequence of LA-lus Gag protein.
LA-28.R1.R	CAGTAACGGTCAGTGGTC	Primers for amplification of C-terminal variable coding sequence of LA-28 Gag protein.
LA-1.R2.F	GATGTTCTCACTCACAAG	Primers for amplification of partial pYAK-G-LA-1 plasmid sequence.
LA-1.R2.R	TGCTGAGTACGACGC	
LA-lus.R2.F	GGGTTTAGGAGTGGTAGG	Primers for amplification of coding sequence of LA-lus Pol protein.
LA-28.R2.F	GGGTTTAGGAGTGGTAGG	Primers for amplification of N-terminal variable coding sequence of LA-28 Pol protein.
LA-28.R2.R	CTCGCACCTGAACATAG	
LA-1.R3.F	AGGTCATACTGTAATTGCC	Primers for amplification of partial pYAK-G-LA-1 plasmid sequence.
LA-1.R3.R	GCGTCCATTATTCTTACTG	
LA-lus.R3.F	GATGCATAGAATCAATG	Primers for amplification of coding sequence of LA-lus Pol protein (from 3723 bp).
LA-28.R3.F	TATGCACAACATTAATGC	Primers for amplification of coding sequence of LA-28 Pol protein (from 3723 bp).
TEF	CATTAGAAAGAAAGCATA GC	Primer complement to TEF1 ( $P^{TEF1}$ ) promoter sequence.
CYC1	GCGTGAATGTAAGCGTGA	Primer complement to CYC1 terminator sequence.
M1-dir	GAAAAATAAAGAAATGAC GAAGCC	Primers for amplification of coding sequence of preprotoxin of M1.
M1-rev	CCCTAGTGGCCTGTGTCAC	

### 1.1.7 Plasmids

**Table 1.4** Plasmids used in this study.

Plasmid	Description	Reference
pYM-14	Chromosomal integration plasmid.	Euroscarf
pUC19-romL	DNA copy of dsRNA LA virus genome from <i>S. cerevisiae</i> Rom K-100 strain.	Konovalovas, 2018
pUC-19-m437L	DNA copy of dsRNA LA virus genome from <i>S. cerevisiae</i> M437 strain.	Konovalovas, 2018
pUC19-28L	DNA copy of dsRNA LA virus genome from <i>S. paradoxus</i> K28 strain.	Konovalovas, 2018
pYAK3	Yeast expression vector: ColE1 ori, 2mkm, AmpR, URA, $P^{TEF1}$ , $T^{CYC1}$ .	Konovalovas, 2018
pYAK3-LAcDs	Yeast expression vector coding LA-1 viral proteins.	Konovalovas, 2018

pYAK-G	Yeast expression vector: ColE1 ori, 2mkm, AmpR, URA, KanMX, P <sup>TEF1</sup> , T <sup>CYC1</sup> .	This work
pYAK3-GagΔ	Yeast expression vector coding truncated LA-1 Gag protein (1-641 aa).	Konovalovas, 2018
pYAK3-LA-lus-GagΔ	Yeast expression vector coding truncated LA-lus Gag protein (1-641 aa).	Konovalovas, unpublished
pYAK-G-LA-1ΔGag	Yeast expression vector coding truncated LA-1 Gag protein (1-641 aa).	This work
pYAK-G-LA-2ΔGag	Yeast expression vector coding truncated LA-2 Gag protein (1-644 aa).	This work
pYAK-G-LA-lusΔGag	Yeast expression vector coding truncated LA-lus Gag protein (1-641 aa).	This work
pYAK-G-LA-28ΔGag	Yeast expression vector coding truncated LA-28 Gag protein (1-644 aa).	This work
pYAK-G-LA-1	Yeast expression vector coding LA-1 viral proteins.	This work
pYAK-G-LA-lus	Yeast expression vector coding LA-lus viral proteins.	This work
pYAK-G-LA-28	Yeast expression vector coding LA-28 viral proteins.	This work
pYAK-G-LA-1.R1.LA-lus	Yeast expression vector coding chimeric LA-1 viral proteins. The variable C-terminal coding sequence of LA-1 Gag protein (383 – 629 bp) is changed to the corresponding sequence of LA-lus Gag protein-coding sequence.	This work
pYAK-G-LA-1.R1.LA-28	Yeast expression vector coding chimeric LA-1 viral proteins. The variable C-terminal coding sequence of LA-1 Gag protein (383 – 629 bp) is changed to the corresponding sequence of LA-28 Gag protein-coding sequence.	This work
pYAK-G-LA-1.R2.LA-lus	Yeast expression vector coding chimeric LA-1 viral proteins. The variable N-terminal coding sequence of LA-1 Pol protein (1929 – 3267 bp) is changed to the corresponding sequence of LA-lus Pol protein-coding sequence.	This work
pYAK-G-LA-1.R2.LA-28	Yeast expression vector coding chimeric LA-1 viral proteins. The variable N-terminal coding sequence of LA-1 Pol protein (1929 – 3267 bp) is changed to the corresponding sequence of LA-28 Pol protein-coding sequence.	This work
pYAK-G-LA-1.R3.LA-lus	Yeast expression vector coding chimeric LA-1 viral proteins. The variable C-terminal coding sequence of LA-1 Pol protein (from 3273 bp) is changed to the corresponding sequence of LA-lus Pol protein-coding sequence.	This work
pYAK-G-LA-1.R3.LA-28	Yeast expression vector coding chimeric LA-1 viral proteins. The variable C-terminal coding sequence of LA-1 Pol protein (from 3273 bp) is changed to the corresponding sequence of LA-28 Pol protein-coding sequence.	This work



pYAK-G-LA-1.G.LA-lus.P	Yeast expression vector coding chimeric LA-1 viral proteins. The coding sequence of LA-1 Pol protein is changed to the corresponding sequence of LA-lus Pol protein-coding sequence.	This work
pYAK-G-LA-1.G.LA-28.P	Yeast expression vector coding chimeric LA-1 viral proteins. The coding sequence of LA-1 Pol protein is changed to the corresponding sequence of LA-28 Pol protein-coding sequence.	This work

## 1.1.8 Solutions

### 1.5 Solutions used in this study

Solution	Composition
TB buffer	50 mM Tris-HCl (pH 9,3), 1% $\beta$ -mercaptoethanol.
TES buffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,3), 10mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.2% SDS
1X LiAc/1X TE	100 mM lithium acetate (pH 7,5), 10 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8)
1X LiAc/1X TE/40% PEG4000	100 mM lithium acetate (pH 7,5), 10 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8), 40% PEG-4000
„Sodium solution“	5 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub>
„Calcium solution“	5 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM CaCl <sub>2</sub> , 5 mM MgCl <sub>2</sub>
1X TE buffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8)
NaOH/SDS solution	100 NaOH, 1% SDS

## 1.2 Methods

### 1.2.1 Protein expression vectors

Expression vectors were constructed by standard cloning methods. All constructed vectors for correct coding sequences were confirmed by sequencing.

### 1.2.2 Identification of variable regions of LA viral proteins

Sequences of 4 different LA viruses (LA-1 (accession no. [J04692](#)), LA-2 (accession no. [KC677754](#)), LA-lus (accession no. [JN819511](#)), LA-28 (accession no. [KU845301](#)) proteins were aligned to each other with UniproUGene software (version 34.0). Regions with the lowest percentage

identity were chosen for the construction of chimeric protein expression vectors.

### **1.2.3 Total RNA and dsRNA extraction**

Yeast strains were inoculated into 4 mL YPD and grown for 16-20 hours at 30 °C on a shaker at 200 rpm. 1 mL of resulting culture was collected by 1 min centrifugation at 6000xg and washed with 1 mL of 50 mM EDTA. Collected cells were suspended in 1 mL TB buffer and incubated for 15 min at room temperature. After incubation, yeast were collected by centrifugation, resuspended in 800 µL TES buffer and 600 µL phenol solution (pH 5.2), and incubated for 45 min on a shaker. After incubation, samples were centrifuged for 30 min at 20000xg at 4 °C. The aqueous phase was transferred to a new tube, 60 µL of sodium acetate (pH 5.2), and 660 µL was added. Nucleic acids were pelleted by centrifugation at 20000xg for 10 min at room temperature. Pellet washed with 70% ethanol, dried, and dissolved in 20 µL of nuclease-free water.

DsRNA was extracted by treatment with 2.8 M LiCl. The total RNA sample was mixed with LiCl and incubated overnight at 4 °C. After incubation, ssRNA was pelleted by centrifugation at 20000xg for 45 min at 4 °C. dsRNA pelleted from the supernatant by mixing it with 1/10 volume of 3M NaCl and 1 volume of isopropanol. Pellet washed with 70% ethanol, dried, and dissolved in 10-20 µL of nuclease-free water.

### **1.2.4 Yeast transformation**

Yeast were transformed by lithium, acetate, and polyethylene glycol method (Agatep *et al.*, 1998) with adjustments. Yeast strain was inoculated into 4 mL YPD and grown for 16-20 hours at 30 °C on a shaker at 200 rpm. 500 µL of resulting culture was transferred to 50 mL of fresh YPD medium and incubated at 30 °C on a shaker at 200 rpm until it reached OD<sub>600</sub> 0.7. Yeast cells were collected by 5 min centrifugation at 1000xg and washed with 2 mL of sterile water. Collected cells were resuspended with 300 µL 1xLiAc/1xTE buffer (100 mM LiAc (pH 7.5), 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA (pH 8). For each transformation, 100 µL of competent yeast cells were mixed with 0.5-1 µg of plasmid and 600 µL of 1xLiAc/1xTE/40% PEG buffer (100 mM LiAc (pH 7.5), 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 40% PEG 4000). The resulting mixture was incubated for 30 min at 30 °C on a shaker at 200 rpm. Before heat shock, 70

$\mu\text{L}$  of DMSO was added. Heat shock was carried out by heating a sample for 15 min at 42 °C temperature. After heat shock, cells were collected by brief centrifugation of 10 s at 14000xg and resuspended in 1 mL of YPD medium. Cells incubated for 2 hours at 30 °C on a shaker at 200 rpm to express the resistance gene. After incubation, cells were collected by brief centrifugation and plated on YPD plates supplemented with G418 for selection.

### **1.2.5 Elimination of M1 virus from K7 strain**

M1 virus elimination from the K7 yeast strain was performed by growing yeast cells at elevated temperatures. Yeast were streaked on YPD agar plates and grown at 37 °C for two days. Grown colonies were streaked on new YPD agar plates and grown at 30 °C for two more days. For killer phenotype examination, the resulting colonies were transferred on MBA plates with an overlay of a K1 sensitive strain and grown at 20 °C for three days. Colonies not exhibiting killer phenotype (no formation of halos) were selected for total RNA and dsRNA purification. The elimination of the M1 virus was confirmed by analyzing dsRNA in agarose gel electrophoresis (the M1 dsRNA fraction was not observed) and 2-step RT-PCR using primers specific for the M1 coding sequence.

### **1.2.6 Densitometric analysis**

Densitometric analysis was used to quantify the relative amount of LA and M virus dsRNA genomes. Total RNA or dsRNA electrophoresis gels were analyzed by ImageJ software (version 1.52a). LA and M virus dsRNA amount for each sample was normalized by 18S rRNA and compared to control samples' values. For each yeast transformation, three biological replicates with three technical replicates per sample (total 9) were used.

### **1.2.7 Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using R software (version R-3.6.2). The obtained values from the densitometric analysis were checked for normality by the Shapiro-Wilk test. To examine if values between the control sample and specific transformants differ significantly, we applied Student's *t*-test. *P* values below 0.05 were considered statistically significant (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). Box plots were drawn by R package ggplot2.

## 2. Results

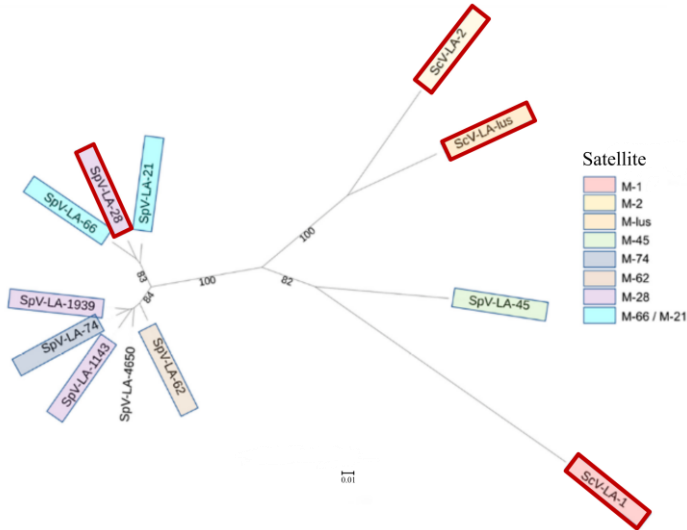
### 2.1 The impact of expression of truncated Gag proteins from different LA viruses on inherent LA and M viruses

LA and M viruses are widespread in the *Saccharomyces* genus (Drinnenberg *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2015). Usually, these viruses are maintained stably in cells and spread only by cell division or mating (Rowley, 2017). However, it is known that LA and M viruses could be eliminated from yeast by constitutive expression of truncated LA-1 capsid proteins (Yao and Bruenn, 1995; Ribas and Wickner, 1998). Wild type LA-1 capsid protein Gag is composed of 680 aa; the first 651 aa makes a structured part of Gag protein while the last 29 C-terminal aa are disordered (Naitow *et al.*, 2002). The expression of truncated Gag protein (473 aa) eliminates LA-1 and M1 viruses; however, shorter or longer versions of Gag protein do not affect endogenous LA-1 virus maintenance in a cell (Yao and Bruenn, 1995). According to the Wickners' group research, the expression of 635-665 aa long Gag protein causes the loss of the M1 virus; shorter Gag versions do not affect M1 virus maintenance in a cell (Ribas and Wickner, 1998). It is also known that truncated Gag proteins cannot form a viral capsid solely, but they could be incorporated into viral particles together with wild-type Gag and GagPol proteins (Yao and Bruenn, 1995; Ribas and Wickner, 1998).

The research of our group has shown that the expression of truncated LA-1 capsid protein (deletion of the C-terminal 39 aa.) causes the loss of LA-1 viruses from the laboratory strain BY4741. Truncated Gag proteins can form empty viral particles together with wild-type Gag proteins. Empty (without viral RNA) viral particles could be formed if GagPol proteins are not incorporated into a viral particle (Konovalovas, 2018). Until now, it was unclear if the elimination of endogenous viruses by expression of truncated Gag proteins depends on a type of native viral system. We evaluated the impact of different truncated Gag proteins expression on various endogenous viral systems in *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* strains to address this problem.

### 2.1.1 The impact of the truncated LA-1, LA-2, LA-lus, and LA-28 capsid proteins expression on endogenous LA and M viruses

Currently, different LA and M viral systems are found in the *Saccharomyces* genus. According to phylogenetic analysis of LA viruses found in *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* strains, LA viruses associated with *S. paradoxus* are more homogenous than *S. cerevisiae* LA viruses (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). During this work, we studied all known *S. cerevisiae* LA and M viral systems (LA-1, M1; LA-2, M2; LA-lus, M2; LA-lus, Mlus) and one *S. paradoxus* viral system (LA-28, M28). Studied LA viruses fall into three different phylogenetic clusters (**Fig. 1**).

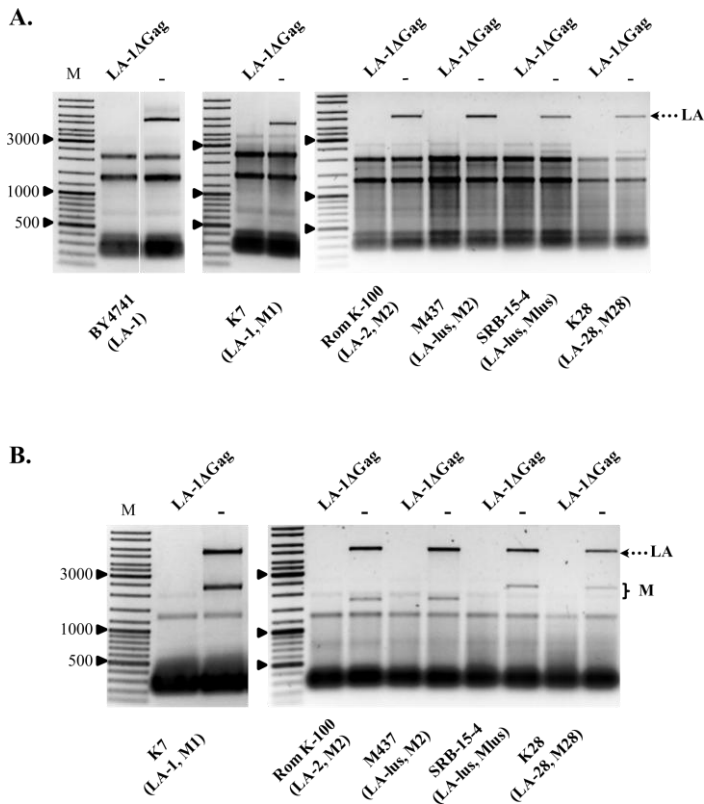


**Figure 1.** The phylogenetic tree of LA viral proteins from *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* yeast (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). The red outline marks viruses studied in this work.

To evaluate the impact of truncated LA-1 capsid protein expression on native LA viruses, the constitutive expression vector ( $P^{TEF1}$ ) of truncated LA-1 Gag protein (39 C-terminal aa were changed to 21 aa long affinity tag sequence) was constructed. *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* strains harbouring different LA and M viruses were transformed by truncated LA-1 Gag protein expression vector (pYAK-G-LA1ΔGag) and an empty control vector (pYAK-G). Two of the strains named BY4741 (LA1) and K7 (LA-1, M1) used in this study are commonly employed for research and industry purposes. The other strains, Rom K-100 (LA-2, M2), M437 (LA-lus, M2), SRB-15-4 (LA-lus, Mlus), and K28 (LA-28, M28), are wild type strains isolated from natural habitats. The impact of truncated Gag protein

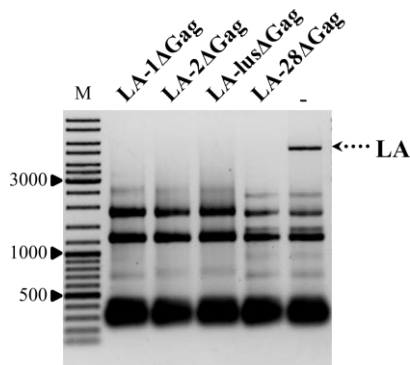
expression on native viruses was evaluated by electrophoretic analysis of total RNA (**Fig. 2A**) and dsRNA (**Fig. 2B**) extracted from yeast transformants. In control samples, the distinct band of LA dsRNA is observed, while in test samples, no dsRNA of LA virus can be detected. RT-PCR confirmed the elimination of native LA viruses from BY4741, K7, and M437 strains (data not shown). In the case of M viruses, the same effect is observed: dsRNA of M viruses were not detected, and transformed strains lost the killer phenotype.

For more detailed studies of this phenomenon, expression vectors of truncated LA-2, LA-lus, and LA-28 capsid proteins were constructed. The yeast strains mentioned above were transformed by resulting protein expression vectors. The impact of recombinant proteins on endogenous viral



**Figure 2.** The impact of truncated LA-1 Gag protein overexpression on native LA and M viruses maintenance in Rom K-100, SRB-15-4, M437, K28 yeast strains. Agarose gel electrophoresis of total RNA (**A.**) and dsRNA (**B.**) isolated from from respective yeast strain transformants; LA-1ΔGag – samples transformed with truncated LA-1 Gag protein expression vector, - - control samples; M column is the molecular size marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific).

systems was estimated by analyzing ssRNA and dsRNA extracted from yeast transformants. All the yeast transformants lost native LA and M viruses (**Fig. 3**).



**Figure 3.** The impact of truncated LA-1, LA-2, LA-lus, and LA-28 Gag proteins overexpression on native LA and M viruses maintenance in K7 yeast strain. Agarose gel electrophoresis of total RNA isolated from respective yeast strain transformants; LA-1/LA-2/LA-lus/LA-28ΔGag – samples transformed with truncated LA Gag protein expression vectors, - – control sample; M column is the molecular size marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific).

The expression of truncated LA capsid proteins causes the loss of native LA viruses; consequently, M viruses are lost. This process is not dependent on the type of endogenous viral system. Analysis of obtained results suggests that truncated LA capsid proteins can interact with wild type Gag proteins of different LA origins and form non-functional viral particles, which eventually lead to the loss of native LA and M viruses.

### 2.1.2 The universal method for endogenous LA and M virus elimination

Usually, LA viruses are eliminated from yeast cells by treatment with 5-FU, cycloheximide, or growing yeast at elevated temperatures (Fink and Styles, 1972; Tipper and Schmitt, 1991; Weinstein *et al.*, 1993). These treatments are cytotoxic (Sakaki *et al.*, 2003; Seiple *et al.*, 2006; Hoskins and Butler, 2007; Saint-Georges *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2019). Furthermore, some LA types are resistant to heat treatment and cannot be eliminated by growing yeast at elevated temperatures (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013). The elimination of endogenous LA and M viruses by expressing truncated LA capsid proteins is beneficial and does not have a cytotoxic effect. Therefore it is a suitable method for preparing yeast strains without viruses, which could be used in various –omics experiments. To study the impact of LA-lus and M2 virus maintenance on host cell gene

expression, our research group, together with the E. Servienė group, carried out transcriptomic studies of the M437 (LA-lus, M2) strain. The LA-lus virus is resistant to heat treatment, so the alternative method for eliminating the virus was chosen. The truncated LA-1 capsid protein expression let us eliminate native LA-lus and M2 viruses from the M437 strain. The resulting virus-free strain was used in transcriptomics studies. It was shown that the maintenance of LA viruses causes the upregulation of genes involved in amino acid and lipid biosynthesis, cellular transport, energy production, and downregulation of genes involved in ribosome biogenesis and stress response (Lukša *et al.*, 2017). The same method for eliminating endogenous viruses was used to prepare the BY4741 yeast strain without the LA-1 virus. The virus-free BY4741 strain was used in proteomic studies. Based on the preliminary result of proteomic studies, LA viral proteins interact with 329 host proteins. All host proteins interacting with viral proteins were assigned to three groups: interacting with Gag protein, interacting with the C-terminal part of Gag protein, and interacting with virus particle inner structures. The thirteen identified proteins modulate the amount of endogenous LA-1 dsRNA in a cell (Konovalovas, 2018).

## **2.2 The interaction of recombinant Gag and GagPol proteins with endogenous viral systems**

Typically, only one type of LA and M viral system is maintained in a yeast strain. If yeast cells with different LA viruses are fused by mating or cytoduction, only one type of LA virus remains (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013; Rodríguez-Cousino and Esteban, 2017). A similar effect was observed when LA-1 viral proteins were expressed from a plasmid. The expression of functional recombinant LA-1 Gag and GagPol proteins causes loss of endogenous LA-1 virus. Nevertheless, the M1 virus is maintained by functional recombinant proteins. The elimination of endogenous LA-1 virus happens only if both Gag and GagPol proteins are expressed (Valle and Wickner, 1993; Yao *et al.*, 1995). This competition between LA viruses could act through interactions with host proteins needed for viral RNA replication or transcription.

The specificity of different LA virus interactions with various LA and M viral systems is not fully explored. To study that by mating yeast cells or cytoduction is problematic because, during these processes, viruses are transferred together with various cellular factors, which could have a



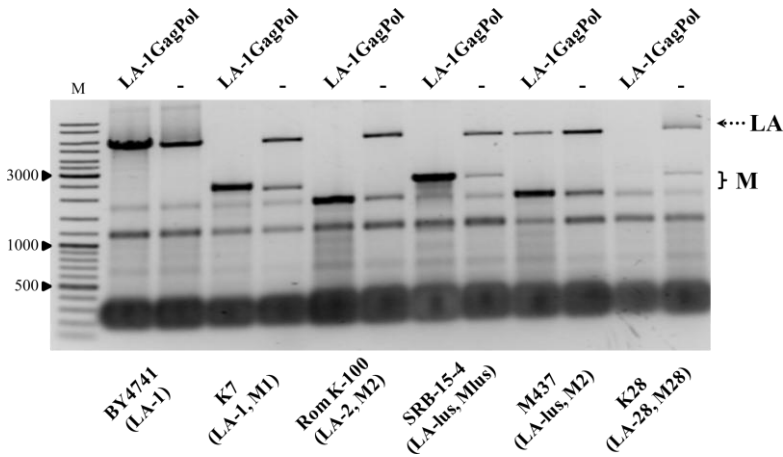
phenotypical impact on yeast cells (Mazar *et al.*, 2000; Montanari *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2015). In this work, to study the specificity of LA interactions with various LA and M viral systems, we used expression vectors of different LA virus proteins. In this way, a homogenous environment is ensured. The impact of M virus maintenance in a cell for the recombinant proteins interactions with native viruses was also addressed.

### **2.2.1 The impact of different LA virus Gag and GagPol protein expression on endogenous LA and M viruses**

The constitutive expression vectors of LA-1, LA-lus, LA-28 viral proteins were constructed and used to study the specificity of interactions between different LA and M viruses. *S. cerevisiae* (BY4741 (LA-1), K7 (LA-1, M1), Rom K-100 (LA-2, M2), M437 (LA-lus, M2), SRB-15-4 (LA-lus, Mlus)) and *S. paradoxus* (K28 (LA-28, M28)) strains maintaining different viral systems were transformed by the constructed vectors. The impact of recombinant proteins expression on endogenous viruses was evaluated by analysis of total RNA and dsRNA isolated from transformants. For detailed analysis, three biological replicates with three technical replicates of each transformant were used. DsRNA amount was normalized by 18S rRNA amount.

Expression of recombinant LA-1 viral proteins eliminates native LA viruses from K7 (LA-1, M1), Rom K-100 (LA-2, M2), SRB-15-4 (LA-lus, Mlus), and K28 (LA-28, M28) strains; on the contrary, the amount of endogenous M viruses genomes increases (except K28 (LA-28, M28) strain) (Fig. 3, Fig. 4 and Fig. 5). The impact of LA-1 viral proteins expression on endogenous K28 (LA-28, M28) LA-28 virus meets recently published results. On the other hand, studies done by Rodríguez Cousino and his group show that LA-1 viral protein expression causes the increase of the M28 virus genome amount (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017). The use of genetically distinct strains could be the reason for discrepancies between the published results and results obtained in this work. The impact of recombinant LA-1 viral proteins on endogenous viruses of BY4741 (LA-1) and M437 (LA-lus, M2) contrasts with the results described above (**Fig. 4** and **Fig. 5**). In this case, endogenous LA viruses are not lost, and in BY4741 (LA-1) strain, even the increase of LA-1 dsRNA genome amount is observed. Different effects of recombinant LA-1 Gag and GagPol proteins expression on endogenous

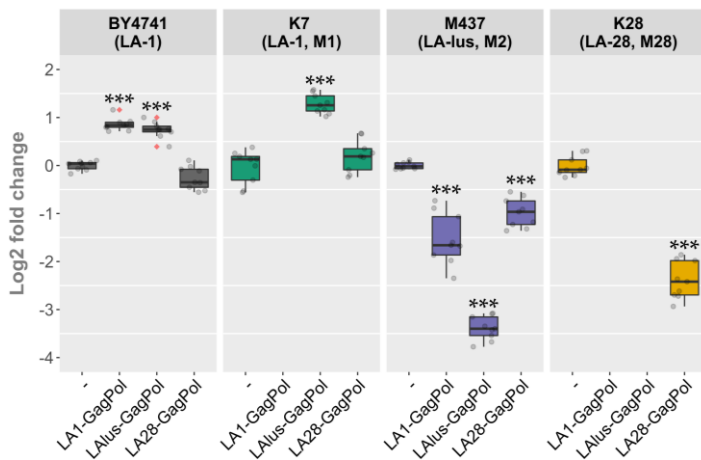
viruses could be determined by the diverse genetic background of tested strains or specific recombinant proteins interactions with particular viruses.



**Figure 4.** The impact of LA-1 Gag and GagPol proteins overexpression on native LA and M viruses maintenance in BY4741, K7, Rom K-100, SRB-15-4, M437, and K28 yeast strains. Agarose gel electrophoresis of dsRNA isolated from respective yeast strain transformants; LA1-GagPol – samples transformed with LA-1 proteins expression vector, - – control samples; M column is the molecular size marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific).

Results obtained with LA-lus and LA-28 recombinant proteins were somewhat similar (**Fig. 5**). The endogenous LA viruses of BY4741 (LA-1) and M437 (LA-lus, M2) strains are maintained stably in a host cell regardless of different recombinant LA proteins expression. In BY4741 (LA-1), the native LA-1 viral genome's amount increases when LA-1 or LA-lus viral proteins are expressed. This phenomenon could be related to the fact that only Gag protein expression results in the accumulation of endogenous LA-1 virus genome (Wickner *et al.*, 1991). It could be that LA recombinant proteins cause more efficient replication of viruses. The exclusive effect of recombinant proteins on the BY4741 (LA-1) endogenous LA-1 virus is possibly associated with the absence of the M1 virus in a cell. LA and M viruses could be competing for cellular factors or viral proteins needed for their replication, so the absence of the M virus creates a competition-free environment. M437 (LA-lus, M2) yeast strain is unique because it maintains the unusual LA-lus virus and M2 satellite's viral system. However, ordinarily, LA-lus viruses are accompanied by Mlus viruses in nature. The M437 (LA-lus, M2) strain may have a specific genetic environment that enables the stable maintenance of the unique LA and M

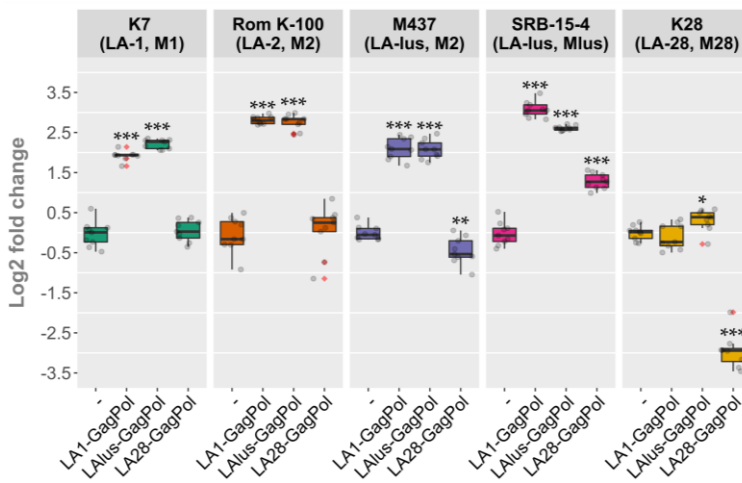
viral system, which is not disturbed by the expression of recombinant viral proteins. The expression of LA-lus viral proteins causes the accumulation of LA-1 viral genome in K7 (LA-1, M1) strain, while LA-28 recombinant proteins do not strongly affect endogenous LA viruses of K7 (LA-1, M) and K28 (LA-28, M28) strains.



**Figure 5.** The impact of LA-1, LA-lus, LA-28 Gag and GagPol proteins overexpression on native LA viruses maintenance in BY4741, K7, Rom K-100, SRB-15-4, M437, and K28 yeast strains. Relative change of native LA virus dsRNA genome amount compared to control samples (-). Examined yeast strains specified at the top, protein expression vectors used are listed below. Grey dots indicate individual samples, red dots denote outliers. Statistical significance evaluated by Student's *t*-test. *P* values below 0.05 were considered statistically significant (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001).

In terms of recombinant LA proteins expression impact on endogenous M viruses, various effects were observed. The expression of LA-1 and LA-lus proteins resulted in the accumulation of M viruses genomes (from 3,8 to 8,5 fold increase) in all tested strains, except K28 (LA-28, M28) (**Fig. 6**). Since in most of the tested strains, endogenous LA viruses are eliminated, it could be stated that recombinant LA-1 and LA-lus proteins can interact with different M viruses and replicate them. On the other hand, the expression of LA-28 recombinant proteins, in most cases, had no impact on native M viruses. The increase of endogenous Mlus satellite genome is observed only in SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) strain, while in the K28 (LA-28, M28) strain, the amount of endogenous M28 genome is decreased. The latter result is unexpected since recombinant LA-28 viral proteins should replicate its M28 satellite. We noticed that the viral system of the K28 (LA-28, M28) strain is generally unstable, so it is probable that

any changes in a host cell could lead to the decrease of native viruses' genome amount. The expression of LA-28 viral proteins leads to the loss of native LA viruses in Rom K-100 (LA2, M2) and SRB-15-4 (LA-lus, Mlus) strains. However, satellite viruses are not lost, which means that recombinant LA-28 viral proteins replicate its atypical M2 and Mlus viruses. Generally, the distinctive impact of LA-28 recombinant proteins on native viral systems could be explained by the fact that LA-28 viruses are attributed to *S. paradoxus* species. In contrast, other LA viruses studied in this work belong to the *S. cerevisiae* species.



**Figure 6.** The impact of LA-1, LA-lus, LA-28 Gag and GagPol proteins overexpression on native M viruses maintenance in BY4741, K7, Rom K-100, SRB-15-4, M437, and K28 yeast strains. Relative change of native M virus dsRNA genome amount compared to control samples (-). Examined yeast strains specified at the top, protein expression vectors used are listed below. Grey dots indicate individual samples, red dots denote outliers. Statistical significance evaluated by Student's *t*-test. *P* values below 0.05 were considered statistically significant (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001).

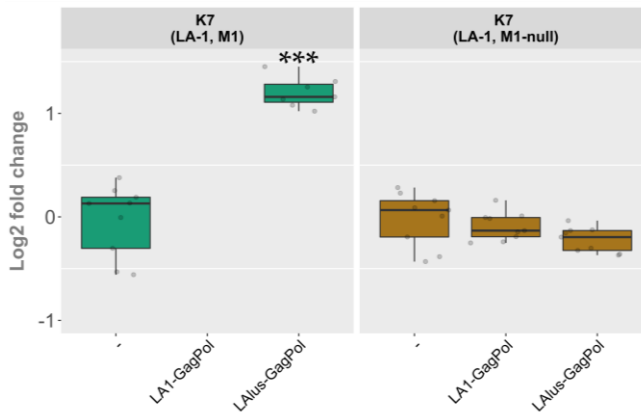
Based on the discussed results, it is likely that the interactions between different LA viruses depend on their type, the host cell's genetic environment, and the presence of M viruses and their type. The molecular mechanism involved in interactions between LA wild-type viral proteins and endogenous LA viruses and interaction between truncated LA capsid proteins and endogenous LA viruses differs. Contrasting with the specific impact of wild type LA viral proteins expression on different native viral systems, expression of all LA truncated capsid proteins used in this study unspecifically eliminates endogenous LA and M viruses. The loss of

endogenous LA viruses due to recombinant wild type LA viral proteins expression could be related to the type of M virus maintained in a host cell and recombinant proteins' ability to replicate it. The expression of LA-1 and LA-lus proteins, in most cases, results in loss of endogenous LA viruses and the increase of inherent M viruses genomes amount at the same time. While the expression of LA-28 proteins negatively impacts only two of the studied LA viruses.

Furthermore, recombinant LA-28 proteins do not induce the accumulation of endogenous M viruses. LA-28 recombinant proteins may cause loss of just a few LA viruses because they cannot interact with inherent M viruses, or the interaction is too weak. As mentioned, LA-28 viruses belong to *S. paradoxus* species, so specific species-related interactions between viruses or viruses and host proteins could be involved in this phenomenon.

### **2.2.2 The role of M virus maintenance for interactions between LA recombinant proteins and endogenous LA viruses**

Based on the observation that the expression of recombinant Gag and GagPol proteins in most cases causes the accumulation of M dsRNA and the elimination of endogenous LA viruses, we decided to evaluate the M virus maintenance role in the interplay between viral recombinant proteins and endogenous viruses. For this, we eliminated the M1 virus from K7 (LA-1, M1) strain by growing yeast at elevated temperatures. RT-PCR and killer assay confirmed the loss of the M1 satellite. The resulting strain K7 (LA-1, M1-null) was transformed by LA-1, LA-lus proteins expression vectors, and control plasmid. Analysis of total and dsRNA isolated from transformants showed that loss of M1 virus disrupts endogenous LA-1 virus replication interference caused by recombinant viral protein expression; native LA viruses are not lost (**Fig. 7**). These results match the idea that the interactions between LA viruses strongly depend on M viruses. It is possible that recombinant LA proteins can interact with M viruses more efficiently than with endogenous LA viruses in that the host factors needed for LA replication are depleted, and endogenous LA viruses are lost. Another interesting detail is that eliminating M viruses from the K7 strain increases the endogenous LA virus genome amount. Previous research showed that *ski2* mutant strains have an increased amount of LA virus, and in these strains, the expression of LA-1 viral proteins does not cause loss of



**Figure 7.** The role of M1 maintenance on native LA-1 virus replication interference by LA Gag and GagPol proteins overexpression. Relative change of native LA virus dsRNA genome amount compared to control samples is depicted (-). Examined yeast strains specified at the top, protein expression vectors used are listed below. Grey dots indicate individual samples. Statistical significance evaluated by Student's *t*-test. *P* values below 0.05 were considered statistically significant (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001).

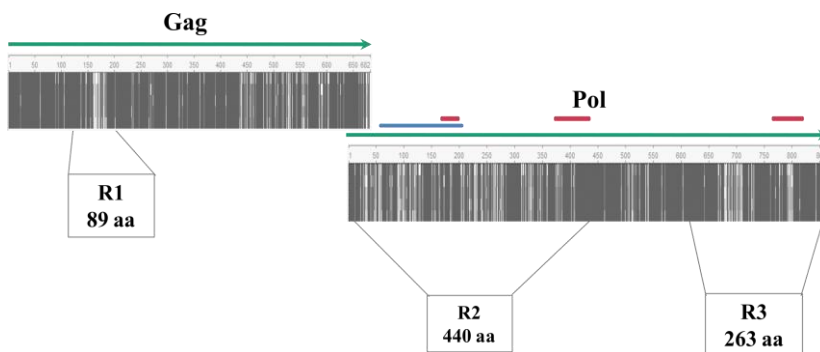
endogenous viruses. Thus there is a chance that the direct reason for the resistance of tested strain K7 (LA-1, M1-null) endogenous LA-1 virus to LA-1 recombinant proteins is the increase of viral genome amount and not the loss of M1 satellite.

### 2.3 The specificity determinants of interactions between LA viruses

*S. cerevisiae* and *S. paradoxus* LA viral proteins sequences are highly similar (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). The conservative protein domains of Gag and GagPol are essential for LA and M virus replication in yeasts. Nevertheless, in our previous analysis of viral protein sequences, highly variable regions were identified (Konovalovas, 2018). Variable regions could be significant in interactions between LA viruses and host proteins or interactions between different LA and M viruses. The expression vectors of chimeric LA proteins were constructed by replacing the LA-1 virus variable regions with appropriate sequences from LA-lus or LA-28 viruses to delve into this hypothesis. The impact of chimeric protein expression on endogenous viral systems was examined.

### 2.3.1 The construction of chimeric LA-1 viral proteins expression vectors

In this work, we have chosen to evaluate the role of three variable regions of LA proteins sequences in the specificity of interactions between different LA and M viruses (**Fig. 8**).



**Figure 8.** Alignment of LA-1, LA-2, LA-lus, and LA-28 viral protein sequences. Variable sequences are marked light grey or white colour. R1/R2/R3 – regions studied in this work. Red lines – RNA binding domains, blue line – nucleic acid packaging site.

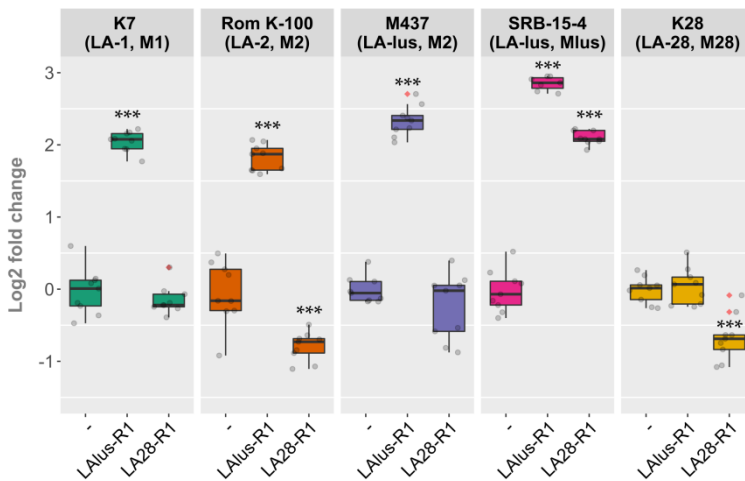
R1 region is situated in the Gag protein N-terminal part (121-210 aa), exposed to the virion surface (Naitow *et al.*, 2002). The essential residue in the decapping process His-154 is located in this region (Blanc *et al.*, 1992; Blanc *et al.*, 1994). Another variable region named R2 (1-466 aa) is located at the Pol protein N-terminal part. In this region, few conservative sequences are found: sequence between 67-213 aa is essential for encapsidation of ssRNA, and sequence between 172-190 aa, called central RNA binding domain, is needed for the M1 virus maintenance. The later sequence could be necessary for polymerase functionality; nevertheless, it does not participate in the assembly of virions or ssRNA encapsidation (Ribas *et al.*, 1994a; Ribas *et al.*, 1994b). R3 region is situated at Pol C-terminal part (600-863 aa). The third RNA binding domain (770-819 aa) is located in this region. C-terminal RNA binding domain is not needed for encapsidation of viral ssRNA but is critical for maintaining the M1 virus in a cell (Ribas *et al.*, 1994a).

LA-1, LA-lus, and LA-28 viruses are attributed to different phylogenetic groups; further on, they are associated with different satellite viruses: M1, Mlus, and M28, respectively (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*,

2018). The expression vectors of chimeric LA-1 proteins were constructed to change one of the variable regions to respective LA-lus or LA-28 regions. Also, expression vectors coding partial LA-1 Gag protein (until 642 aa) and full-length LA-lus or LA-28 Pol protein were constructed. The coding sequences of chimeric proteins were cloned under the constitutive TEF ( $P^{TEF1}$ ) promoter. *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* strains maintaining different viral systems were transformed by constructed vectors. The impact of chimeric protein expression on native viral systems was evaluated by densitometric analysis of total and dsRNA isolated from yeast transformants.

### 2.3.2 The impact of chimeric LA-1 viral proteins expression on inherent LA and M viruses

The results obtained by LA-1 R1 chimeric proteins (R1 sequence is changed to respective sequences of LA-lus or LA-28, named LA-lus-R1 and LA28-R1 respectively) expression matched the data collected after expression of LA-1 wild type proteins (Fig. 5). Chimeric LA-1 R1 proteins cause the loss of endogenous LA viruses in all tested strains, but M437. The slight difference is that R1 chimeric proteins do not trigger a decrease of the inherent LA-lus dsRNA genome amount. Chimeric LA-1 R1 proteins are competent for the replication of endogenous M viruses (Fig. 9). The primary



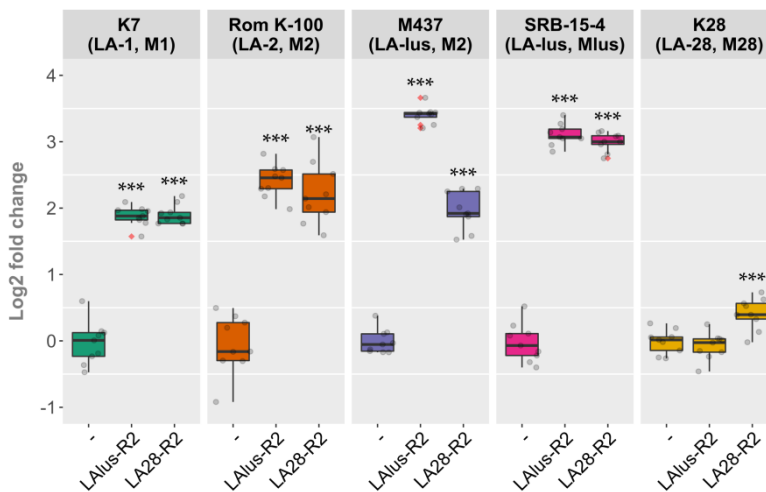
**Figure 9.** The impact of LA-1 R1 chimeric proteins overexpression on native M viruses maintenance in K7, Rom K-100, SRB-15-4, M437, and K28 yeast strains. Relative change of native M virus dsRNA genome amount compared to control samples (-). Examined yeast strains specified at the top, protein expression vectors used listed below. Grey dots indicate individual samples, red dots denote outliers. Statistical significance evaluated by Student's *t*-test. *P* values below 0.05 were considered statistically significant (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001).



difference from the results discussed above is that LA28-R1 chimeric proteins do not cause accumulation of inherent M viruses genomes in K7, Rom K-100, and M437 strains, and the wild type LA-1 proteins do (**Fig. 6** and **9**).

The change of R1 variable sequence in wild type LA-1 proteins does not disrupt Gag and GagPol proteins' functions since, after the loss of inherent LA viruses, M viruses are maintained stably by recombinant proteins. On the other hand, chimeric LA28-R1 proteins show weaker potential in replicating M1 and M2 satellites, which points to the possibility that the R1 sequence could be important for specific interactions between LA and M viruses.

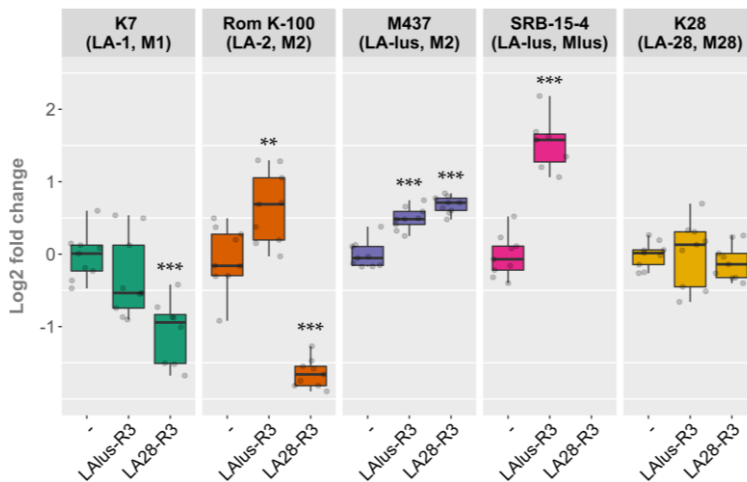
LA-1 R2 chimeric proteins expression, where R2 sequence is changed to corresponding sequences of LA-lus or LA-28 (named LAlus-R2 and LA28-R1 respectively), gives phenotype resembling phenotype we got by expressing LA-1 wild type proteins (**Fig. 5**). In all tested strains except M437, endogenous LA viruses are lost due to chimeric LA-1 R2 protein expression. The satellite viruses are maintained stably by recombinant proteins, which show that chimeric proteins are functional (**Fig. 10**). The only more significant difference compared to wild type LA-1 proteins is that



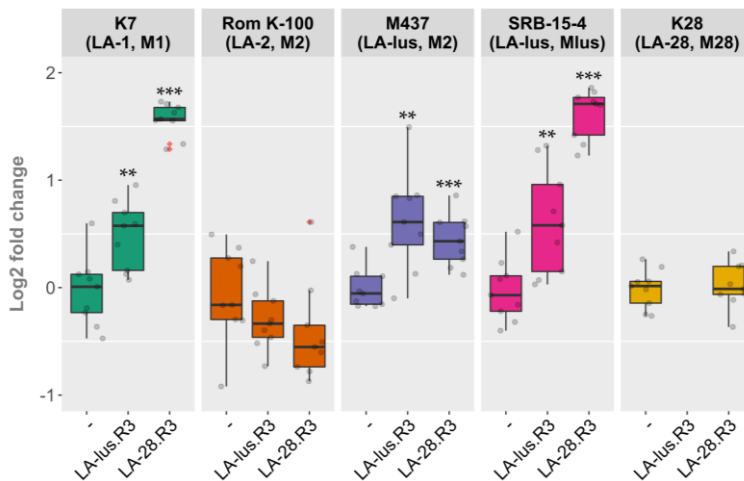
**Figure 10.** The impact of LA-1 R2 chimeric proteins overexpression on native M viruses maintenance in K7, Rom K-100, SRB-15-4, M437, and K28 yeast strains. Relative change of native M virus dsRNA genome amount compared to control samples (-). Examined yeast strains specified at the top, protein expression vectors used are listed below. Grey dots indicate individual samples, red dots denote outliers. Statistical significance evaluated by Student's *t*-test. *P* values below 0.05 were considered statistically significant (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001).

LA28-R2 proteins expression causes a notable reduction of the inherent LA-lus genome amount in the M437 strain (**Fig. 6** and **10**). To conclude, the R2 sequence is not functionally involved in specific interactions between LA and M viruses.

The changes in the R3 variable sequence of LA-1 viral protein (named LAlus-R3 and LA28-R3) significantly impair the functionality of LA-1 proteins. The expression of LAlus-R3 chimeric proteins does not interfere with endogenous LA virus maintenance in tested strains, while expression of LA28-R3 chimeric proteins causes a reduction of inherent LA-1 and LA-2 virus genome amounts and the loss of inherent LA-lus virus in SRB-15-4 strain (**Fig. 11**). Since LAlus-R3 expression does not cause loss of inherent LA viruses in any tested strains, it is impossible to determine if these chimeric proteins could replicate satellite viruses. The amount of inherent M satellites dsRNAs increases due to LA28-R3 protein expression (**Fig. 12**). Considering that native LA-lus viruses from SRB-15-4 are lost due to LA28-R3 expression, but M viruses are maintained, it could be safe to conclude that the LA28-R3 chimera is functional.



**Figure 11.** The impact of LA-1 R3 chimeric proteins overexpression on native LA viruses maintenance in K7, Rom K-100, SRB-15-4, M437, and K28 yeast strains. Relative change of native LA virus dsRNA genome amount compared to control samples (-). Examined yeast strains specified at the top, protein expression vectors used are listed below. Grey dots indicate individual samples, red dots denote outliers. Statistical significance evaluated by Student's *t*-test. *P* values below 0.05 were considered statistically significant (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001).

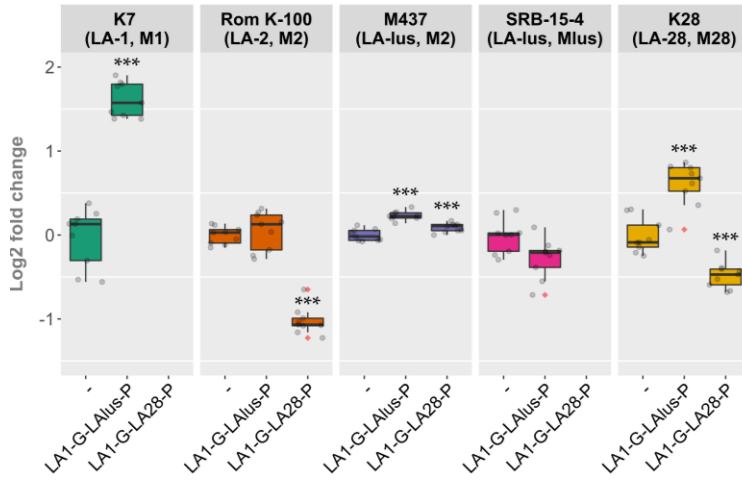


**Figure 12.** The impact of LA-1 R3 chimeric proteins overexpression on native M viruses maintenance in K7, Rom K-100, SRB-15-4, M437, and K28 yeast strains. Relative change of native M virus dsRNA genome amount compared to control samples (-). Examined yeast strains specified at the top, protein expression vectors used are listed below. Grey dots indicate individual samples, red dots denote outliers. Statistical significance evaluated by Student's *t*-test. *P* values below 0.05 were considered statistically significant (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001).

The original R3 variable sequence is essential for the functionality of LA-1 viral proteins. The R3 sequence may interact with other Gag or GagPol proteins sequences so that specific interactions between LA and M viruses are ensured.

The expression of chimeric viral proteins, which have partial LA-1 Gag sequence (to 642 aa) and the entire sequence of LA-lus Pol (LA1-G-LAlus-P), do not influence the maintenance of inherent LA viruses in any tested strains; what is more, it even increases the amount of endogenous LA-1 dsRNA in K7 strain (**Fig. 13**). The latter result matches the results obtained by the expression of wild-type LA-lus proteins. With this in mind, it appears that LA1-G-LAlus-P chimeric proteins are either unfunctional or interact differently with inherent viruses than wild-type LA-1 or LA-lus proteins. The impact of LA1-G-LAlus-P chimeric proteins on native viruses is similar to the effect of LAlus-R3 chimeric proteins. The analogous chimeric proteins with the Pol sequence of LA-28 (LA1-G-LA28-P) eliminate endogenous LA viruses from K7 and SRB-15-4 strains and reduce the amount of Rom K-100 and K28 LAs dsRNAs. These results also resemble the results we got with LA-R3 chimeric proteins. Since

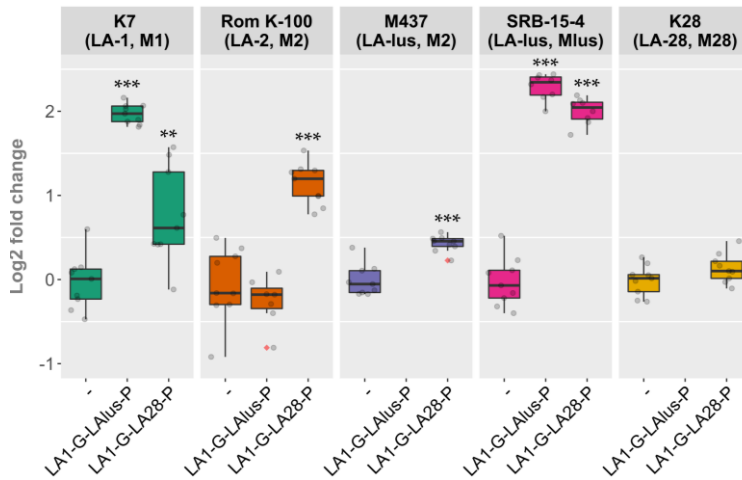
wild-type LA-28 viral protein expression does not exclude inherent LA-1 viruses, endogenous LA virus elimination may depend on specific interactions between the Pol domain with Gag domain or Gag proteins.



**Figure 13.** The impact of LA1-G-LAlusP and LA-G-LA28P chimeric proteins overexpression on native LA viruses maintenance in K7, Rom K-100, SRB-15-4, M437, and K28 yeast strains. Relative change of native LA virus dsRNA genome amount compared to control samples (-). Examined yeast strains specified at the top, protein expression vectors used are listed below. Grey dots indicate individual samples, red dots denote outliers. Statistical significance evaluated by Student's *t*-test. *P* values below 0.05 were considered statistically significant (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001).

The expression of LA1-G-LAlus-P chimeric proteins leads to an exceedingly substantial reduction or elimination of inherent M satellites in M437 and K28 strains (**Fig. 14**). The effect mentioned above is exclusive in this study since M virus loss resulting from the expression of other chimeric proteins was not observed. It could be that LA1-G-LAlus-P proteins interfere with inherent LA viruses during M replication and disrupts it. On the other hand, the amount of K7 and SRB-15-4 M satellite dsRNAs increases due to LA1-G-LAlus-P protein expression. In the K7 strain, the inherent LA-1 amount also increases; therefore, it could explain the rise of M1 dsRNA, while the amount of LA-lus in SRB-15-4 dsRNA is the same in test samples and control samples, which could mean that increase of Mlus dsRNA is caused by expression of chimeric proteins. It remains unclear if LA1-G-LAlus-P proteins are functional.

On the contrary, LA1-G-LA28P proteins are functional since they replicate the inherent viruses of K7 and SRB-15-4 strain, where LA viruses



**Figure 14.** The impact of LA1-G-LAlusP and LA1-G-LA28-P chimeric proteins overexpression on native M viruses maintenance in K7, Rom K-100, SRB-15-4, M437, and K28 yeast strains. Relative change of native LA virus dsRNA genome amount compared to control samples (-). Examined yeast strains specified at the top, protein expression vectors used are listed below. Grey dots indicate individual samples, red dots denote outliers. Statistical significance evaluated by Student's *t*-test. *P* values below 0.05 is considered statistically significant (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001).

are lost (**Fig. 14**). The expression of LA1-G-LA28-P also increases the amount of M2 satellite dsRNA in the Rom K100 strain. The expression of LA28-R1, LA28-R3, and LA1-G-LA28-P chimeric proteins mostly increases inherent Mlus dsRNA in SRB-15-4, while the amount of M2 dsRNA in Rom K-100 and M437 stays relatively the same. Based on these results, we could assume that LA-28 viruses interact with Mlus viruses more strongly than M2 viruses. The observed specificity of LA-28 viruses to particular satellite could also be determined by the different genetic environments of tested strains.

### 3. Discussion

This study focuses on interactions between LA and M viruses found in *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* yeast. To evaluate the compatibility and specificity of various LA and M viruses, we employed the expression vectors of different viral proteins and analyzed the impact of ectopically expressed viral particles on endogenous yeast viruses.

The expression of recombinant truncated LA-1 capsid proteins causes loss of inherent LA-1 and M1 viruses (Yao and Bruenn, 1995; Ribas and Wickner, 1998). Expression vectors of truncated capsid proteins from different LA viruses (LA-1, LA-2, LA-lus, and LA-28) were constructed to evaluate the specificity of this process. Yeast strains harbouring various LA and M viruses were transformed by resulting vectors. The expression of recombinant proteins was followed by the loss of endogenous LA and M viruses in all tested strains (2.1.1). The exclusion of inherent LA and M viruses by expression of truncated Gag protein is a non-specific process. Gag proteins of different LA viruses might form non-functional capsids, leading to the loss of inherent viruses.

Usually, inherent LA viruses are eliminated from yeast strains by heat treatment or supplementing yeast growth media with mutagenic compounds (5-FU, cycloheximide). These methods are of limited value for preparation of yeast strains for various -omics experiments. The expression of truncated LA Gag proteins for eliminating native LA viruses was used to prepare virus-free yeast strains used in transcriptomics and proteomics studies (Lukša *et al.*, 2017; Konovalovas, 2018) (2.1.2). Removing inherent LA and M viruses by expressing truncated capsid protein is therefore beneficial and has no mutagenic effect.

For further studies of LA and M virus interactions, we constructed expression vectors of LA-1, LA-lus, and LA-28 viral proteins. It was shown that the impact of different LA viral protein expression on the maintenance of endogenous LA and M viruses depends on their type (2.2.1). It is also possible that specific interactions depend not only on LA and M viral system type but also on a particular yeast strain's genetic environment. Gag and GagPol proteins of different LA viruses can maintain various M satellites, which indicate that LA viruses are not highly specific to a particular M virus. On the other hand, it was shown that the elimination of inherent LA viruses

by expression of Gag and GagPol proteins occurs only if the M virus is maintained in a host cell (2.2.2). Specific interactions of recombinant viral proteins with M viruses could be causing the loss of inherent LA viruses.

LA viral protein-coding sequences are highly similar, although some sequences are vastly variable. We hypothesized that variable protein sequences could be important for establishing specific interactions between LA and M viruses. To test this idea, we constructed expression vectors of chimeric LA-1 viral proteins so that variable sequences would be changed to corresponding sequences of LA-lus or LA-28 (2.3.2). It was shown that the N-terminal (R1; 121-210 aa) variable sequence of Gag protein could be necessary for the functionality of viral proteins or has a role in specific interactions between the viruses. The N-terminal (R2; 1-446 aa) variable sequence of Pol protein could be interchanged between different viral proteins without impacting proteins' functionality. Changes in the C-terminal (R3; 600-863 aa) part of Pol protein leads to a partial loss of viral protein functionality. This type of chimeric protein expression does not cause loss of inherent LA viruses and M dsRNA accumulation in most cases.

To study the importance of Pol sequence in the interaction between LA and M viruses, expression vectors of chimeric LA viral proteins, where complete coding sequence of Pol protein is changed to different LA virus Pol coding sequences, were constructed (2.3.2). In most cases, this type of chimeric proteins did not eliminate endogenous LA viruses and did not cause accumulation of M dsRNAs in tested strains. It could be that replacing the complete Pol coding sequence disrupts proper folding of GagPol proteins or interactions between GagPol and Gag proteins, leading to loss of protein functionality or changes in interactions with host factors or inherent viruses.

The results obtained in this study suggest different levels of specificity of LA viral protein interactions with endogenous LA and viruses. It appears convincing that truncated Gag proteins of different LA origins non-specifically interact with capsid proteins of endogenous LA viruses forming defective viral capsids, causing the eliminations of endogenous LA and M viruses. In contrast, the viral particles formed from recombinant wild-type proteins interact with endogenous yeast viruses in a partially specific manner. The general trend is that the expression of recombinant Gag and GagPol proteins eliminates the endogenous LA viruses and causes the accumulation of M viruses dsRNA. If a yeast cell satellite virus is absent, the

endogenous LA virus replication is not affected by the expression of recombinant LA viral proteins. Recombinant Gag and GagPol proteins may replicate M dsRNA instead of LA because of its genome features: it is smaller in size and possesses a polyA stretch, which could protect dsRNA from cellular nucleases. The research of chimeric LA proteins shows that variable protein sequences could play a functional role in establishing interactions between LA viral proteins and endogenous yeast viruses. Moreover, it is plausible that both Gag and GagPol proteins are involved in establishing specific interactions between viral proteins and endogenous yeast viruses.



## Conclusions

1. Truncated LA Gag proteins cause the unspecific elimination of endogenous LA and M viruses.
2. The impact of LA Gag and GagPol protein expression on endogenous LA and M viruses is a viral system type-dependent process.
3. The elimination of endogenous LA viruses by expression of recombinant Gag and GagPol proteins may depend on M satellite maintenance in a cell or/and interactions between recombinant proteins and endogenous M viruses.
4. Distinctive variable N-terminal sequence of LA Gag protein or GagPol Gag domain (121-210 aa) could be relevant in establishing specific interactions between the recombinant viral proteins and endogenous LA and M viruses.
5. Distinctive variable N-terminal sequence of LA Pol domain (1-466 aa) does not have a role in specific interactions between the recombinant viral proteins and endogenous LA and M viruses.
6. Distinctive variable C-terminal sequence of LA Pol domain (600-863 aa) is crucial for the functionality of viral proteins and their interactions with endogenous LA and M viruses.
7. The interactions between the LA viral recombinant proteins and endogenous LA and M viruses depend on the compatibility of the Pol domain with particular Gag domain or Gag proteins.

## References

1. Alves-Rodrigues, I., Galao, R. P., Meyerhans, A. and Juana, D. (2006) 'Saccharomyces cerevisiae : A useful model host to study fundamental biology of viral replication', *Virus Research*, 120, pp. 49–56. doi: 10.1016/j.virusres.2005.11.018.
2. Blanc, A., Goyer, C. and Sonenberg, N. (1992) 'The Coat Protein of the Yeast Double-Stranded RNA Virus L-A Attaches Covalently to the Cap Structure of Eukaryotic mRNA', *Molecular and Cellular Biology*, 12(8), pp. 3390–3398.
3. Blanc, A., Ribas, J. C., Wickner, R. B. and Sonenberg, N. (1994) 'His-154 Is Involved in the Linkage of the Saccharomyces cerevisiae L-A Double-Stranded RNA Virus Gag Protein to the Cap Structure of mRNAs and Is Essential for M1 Satellite Virus Expression', *Molecular and Cellular Biology*, 14(4), pp. 2664–2674.
4. Blanco, R., Carrasco, L. and Ventoso, I. (2003) 'Cell Killing by HIV-1 Protease \*', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(2), pp. 1086–1093. doi: 10.1074/jbc.M205636200.
5. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J. D. (1998) 'Designer deletion strains derived from Saccharomyces cerevisiae S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications.', *Yeast (Chichester, England)*, 14(2), pp. 115–32. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2.
6. Bussey, H., Sacks, W., Galley, D. and Saville, D. (1982) 'Yeast Killer Plasmid Mutations Affecting Toxin Secretion and Activity and Toxin Immunity Function', *Molecular and Cellular Biology*, 2(4), pp. 346–354.
7. Chang, S.-L., Leu, J.-Y. and Chang, T.-H. (2015) 'A population study of killer viruses reveals different evolutionary histories of two closely related *Saccharomyces sensu stricto* yeasts', *Molecular Ecology*, 24, pp. 4312–4322. doi: 10.1111/mec.13310.
8. Čitavičius, D., Inge-Večtomov, S.G. (1972) 'Množestvennye mutanty u drožžej *Saccharomyces cerevisiae*-I', Polučenie i obščaja kharakteristika. *Genetika*, 1, 95–102.
9. Demarini, D. J., Johnston, V. K., Konduri, M., Gutshall, L. L. and Sarisky, R. T. (2003) 'Intracellular hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity', *Journal of Virological Methods*, 113, pp. 65–68. doi:

10.1016/S0166-0934(03)00226-X.

10. Drinnenberg, I. A., Fink, G. R. and Bartel, D. P. (2011) 'Compatibility with Killer Explains the Rise of RNAi-Deficient Fungi', *Science*, 333, p. 2011.
11. Drinnenberg, I. A., Weinberg, D. E., Xie, K. T., Mower, J. P., Wolfe, K. H., Fink, G. R. and Bartel, D. P. (2009) 'RNAi in Budding Yeast', *Science*, 978, pp. 544–551.
12. Fink, G. R. and Styles, C. A. (1972) 'Curing of a Killer Factor in *Saccharomyces cerevisiae*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(10), pp. 2846–2849.
13. He, C., Zhou, C. and Kennedy, B. K. (2018) 'BBA - Molecular Basis of Disease The yeast replicative aging model', *BBA - Molecular Basis of Disease*. Elsevier, 1864(9), pp. 2690–2696. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.02.023.
14. Herrero, E., Belli, G. and Castells-roca, L. (2011) 'Heat Shock Response in Yeast Involves Changes in Both Transcription Rates and mRNA Stabilities', *PLoS ONE*, 6(2), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0017272.
15. Hoskins, J. and Butler, J. S. (2007) 'Evidence for distinct DNA- and RNA-based mechanisms of 5-fluorouracil cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*, 24, pp. 861–870. doi: 10.1002/yea.
16. Huang, S., Fei, D., Ma, Y., Wang, C., Shi, D., Liu, K., Li, M. and Ma, M. (2020) 'Identification of a novel host protein interacting with the structural protein VP2 of deformed wing virus by yeast two-hybrid screening', *Virus Research*. Elsevier, 286(July), p. 198072. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198072.
17. Jokantaite, T., Laurinavičiene, D. and Bistrickaitė, G. (1982) 'Investigation of new killer and neutral systems in yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Abstracts of 11th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Montpellier, France*, p. 47.
18. Kapoor, P., Lavoie, B. D. and Frappier, L. (2005) 'EBP2 Plays a Key Role in Epstein-Barr Virus Mitotic Segregation and Is Regulated by Aurora Family Kinases', *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), pp. 4934–4945. doi: 10.1128/MCB.25.12.4934.
19. Konovalovas, A. (2018) 'Molecular determinants of Totiviridae family viruses of *Saccharomyces sensu stricto* clade Summary of doctoral dissertation Physical sciences , biochemistry ( 04 P ) Vilnius , 2018'.

20. Lukša, J., Ravoitytė, B., Konovalovas, A., Aitmanaitė, L., Butenko, A., Yurchenko, V., Serva, S. and Servienė, E. (2017) 'Different Metabolic Pathways Are Involved in Response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and M Viruses', *Toxins*, 9(233), pp. 1–17. doi: 10.3390/toxins9080233.
21. Mazar, R., Georgopoulos, D. E., Ramos, F. and Leibowitz, M. J. (2000) 'The [ KIL-d ] Element Specifically Regulates Viral Gene Expression in Yeast', *Genetics*, 155, pp. 601–609.
22. Montanari, A., Francisci, S., Orsi, M. F. D. and Bianchi, M. M. (2014) 'Strain-specific nuclear genetic background differentially affects mitochondria-related phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*', *MicrobiologyOpen*, 3(3), pp. 288–298. doi: 10.1002/mbo3.167.
23. Nagy, P. D. (2008) 'Yeast as a Model Host to Explore Plant Virus-Host Interactions', *The Annual Review of Phytopathology*, 46, pp. 217–42. doi: 10.1146/annurev.phyto.121407.093958.
24. Naito, T., Kiyasu, Y., Sugiyama, K., Kimura, A., Nakano, R., Matsukage, A. and Nagata, K. (2007) 'An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis', *PNAS*, 104(46), pp. 18235–18240.
25. Naitow, H., Tang, J., Canady, M., Wickner, R. B. and Johnson, J. E. (2002) 'letters L-A virus at 3 . 4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism', *Nature Structural Biology*, 9(10), pp. 725–728. doi: 10.1038/nsb844.
26. Naumova, G., Naumov, T. (1973) 'Comparative genetics of yeasts. XIII, Comparative study of *Saccharomycetes* killers from different collections', *Genetika*, 9, pp. 140–145.
27. Nielsen, J. (2019) 'Yeast Systems Biology : Model Organism and Cell Factory', *Biotechnology Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 1800421(14), pp. 1–9. doi: 10.1002/biot.201800421.
28. Pfeiffer, P. and Radler, F. (1984) 'Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2.', *Archives of microbiology*, 137(4), pp. 357–61.
29. Pieczynska, M. D., Visser, J. A. G. M. de and Korona, R. (2013) 'Incidence of symbiotic dsRNA "killer" viruses in wild and domesticated yeast', *FEMS Yeast Research*, 13, pp. 856–859. doi: 10.1111/1567-1364.12086.
30. Rausch, J. W., Miller, J. T. and Grice, S. F. J. Le (2017) 'Reverse

Transcription in the *Saccharomyces cerevisiae* Long-Terminal Repeat Retrotransposon Ty3', *Viruses*, 9(44), pp. 1–15. doi: 10.3390/v9030044.

31. Ribas, J. C., Fujimura, T. and Wickner, R. B. (1994a) 'A Cryptic RNA-Binding Domain in the Pol Region of the L-A Double-Stranded RNA Virus Gag-Pol Fusion Protein', *Journal of Virology*, 68(9), pp. 6014–6020.
32. Ribas, J. C., Fujimuras, T. and Wickner, R. B. (1994b) 'Essential RNA Binding and Packaging Domains of the Gag-Pol Fusion Protein of the L-A Double-stranded RNA virus of', *Journal of Biological Chemistry*, 269(45), pp. 28420–28428.
33. Ribas, J. C. and Wickner, R. B. (1998) 'The Gag Domain of the Gag-Pol Fusion Protein Directs Incorporation into the L-A Double-stranded RNA Viral Particles in *Saccharomyces cerevisiae* The Gag Domain of the Gag-Pol Fusion Protein Directs Incorporation into the L-A Double-stranded RNA Viral Parti', *The Journal of Biological Chemistry*, 273(15). doi: 10.1074/jbc.273.15.9306.
34. Risler, J. K., Kenny, A. E., Palumbo, R. J., Gamache, E. R. and Curcio, M. J. (2012) 'Host co-factors of the retrovirus-like transposon Host co-factors of the retrovirus-like transposon', *Mobile DNA*, 3(12), pp. 1–22.
35. Rodríguez-Cousino, N. and Esteban, R. (2017) 'Relationships and Evolution of Double- Stranded RNA Totiviruses of Yeasts Inferred from Analysis of L-A-2 and L-BC Variants in Wine Yeast Strain', *Applied and Enviromental Microbiology*, 83(4), pp. 1–18.
36. Rodríguez-Cousiño, N., Gomez, P. and Esteban, R. (2013) 'L-A-lus, a New Variant of the L-A Totivirus Found in Wine Yeasts with Klus Killer Toxin-Encoding Mlus Double-Stranded RNA: Possible Role of Killer Toxin-Encoding Satellite RNAs in the Evolution of Their Helper Viruses', *Applied and Enviromental Microbiology*, 79(15), pp. 4661–4674. doi: 10.1128/AEM.00500-13.
37. Rodríguez-Cousiño, N., Gomez, P. and Esteban, R. (2017) 'Variation and Distribution of L-A Helper Totiviruses in *Saccharomyces sensu stricto* Yeasts Producing', *Toxins*, 9(313), pp. 1–20. doi: 10.3390/toxins9100313.
38. Rowley, P. A. (2017) 'The frenemies within : viruses , retrotransposons and plasmids that naturally infect *Saccharomyces* yeasts', *Yeast*, 34, pp. 279–292. doi: 10.1002/yea.
39. Saint-Georges, Y., Garcia, M., Delaveau, T., Jourden, L. and Crom, S. Le (2008) 'Yeast Mitochondrial Biogenesis : A Role for the PUF RNA-

- Binding Protein Puf3p in mRNA Localization', *PLoS ONE*, 3(6), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0002293.
40. Sakaki, K., Tashiro, K., Kuhara, S. and Mihara, K. (2003) 'Response of Genes Associated with Mitochondrial Function to Mild Heat Stress in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *J. Biochem*, 134(3), pp. 373–384. doi: 10.1093/jb/mvg155.
  41. Santos, D. A., Tu, B. P. and Weissman, J. S. (2019) 'Cycloheximide can distort measurements of mRNA levels and translation efficiency', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 47(10), pp. 4974–4985. doi: 10.1093/nar/gkz205.
  42. Seiple, L., Jaruga, P., Dizdaroglu, M. and Stivers, J. T. (2006) 'Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast', *Nucleic Acids Research*, 34(1), pp. 140–151. doi: 10.1093/nar/gkj430.
  43. Stellberger, T., Häuser, R., Baiker, A., Pothineni, V. R., Haas, J. and Uetz, P. (2010) 'Improving the yeast two-hybrid system with permuted fusions proteins : the Varicella Zoster Virus interactome', *Proteome Science*, 8(8), pp. 1–9.
  44. Suzuki, G., Weissman, J. S. and Tanaka, M. (2015) '[ KIL -d ] Protein Element Confers Antiviral Activity via Catastrophic Viral Mutagenesis Article [ KIL -d ] Protein Element Confers Antiviral Activity via Catastrophic Viral Mutagenesis', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 60(4), pp. 651–660. doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.020.
  45. Tipper, D. J. and Schmitt, M. J. (1991) 'Yeast dsRNA viruses : replication and killer phenotypes', *Molecular Microbiology*, 5(10), pp. 2331–2338.
  46. Valle, R. P. C. and Wickner, R. B. (1993) 'Elimination of L-A Double-Stranded RNA Virus of *Saccharomyces cerevisiae* by Expression of gag and gag-pol from an L-A cDNA Clone', *Journal of Virology*, 67(5), pp. 2764–2771.
  47. Vepškaitė-Monstavičė, I., Lukša, J., Konovalovas, A., Ežerskytė, D., Stanevičienė, R., Strazdaitė-Želienė, Ž., Serva, S. and Servienė, E. (2018) 'Saccharomyces paradoxus K66 Killer System Evidences Expanded Assortment of Helper and Satellite Viruses', *Viruse*, 10(564), pp. 1–19. doi: 10.3390/v10100564.
  48. Weinstein, L. A., Capaldo-kimball, F. and Leibowitz, M. J. (1993) 'Genetics of Heat-Curability of Killer Virus of Yeast', *Yeast*, 9, pp. 411–418.

49. Wickner, R. B., Fujimura, T. and Esteban, R. (2013) *Viruses and Prions of Saccharomyces cerevisiae*. 1st edn, *Advances in Virus Research*. 1st edn. Copyright &copy; 2013, Elsevier Inc. All Rights Reserved. doi: 10.1016/B978-0-12-394315-6.00001-5.
50. Wickner, R. B., Icho, T., Fujimura, T. and Widner, W. R. (1991) 'Expression of Yeast L-A Double-Stranded RNA Virus Proteins Produces Derepressed Replication : a ski- Phenocopy', *Journal of Virology*, 65(1), pp. 155–161.
51. Yao, W. and Bruenn, J. A. (1995) 'Interference with Replication of Two Double-Stranded RNA Viruses by Production of N-Terminal Fragments of Capsid Polypeptides', *Virology*, 214, pp. 215–221.
52. Yao, W., Muqtadir, K. and Bruenn, J. A. (1995) 'Packaging in a Yeast Double-Stranded RNA Virus', *Journal of Virology*, 69(3), pp. 1917–1919.

## PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju moksliniam vadovui prof. dr. Sauliui Servai už suteiktą galimybę atlikti mokslinius tyrimus, už diskusijas, palaikymą ir pagalbą ruošiant disertaciją. Ačiū kolegai dr. Aleksandriui Konovalovui už idėjas, pagalbą įsisavinant tyrimo metodus ir nuolatinį palaikymą. Dėkoju Miglei Gabrielaitei už pagalbą dirbant su R programine įranga bei Povilui Medvedevui, kuris bakalauro darbo metu prisidėjo prie dalies eksperimentinių tyrimų atlikimo. Taip pat dėkoju visam esamam ir buvusiam laboratorijos kolektyvui už draugišką ir darbingą atmosferą, pagalbą ir patarimus.

Dėkoju dr. Elenai Servienei ir visam GTC Genetikos laboratorijos kolektyvui už suteiktus mielių kamienus ir plazmides, bei malonų bendradarbiavimą.

Ačiū prof. dr. Editai Sužiedėlienei ir jos kolektyvui už draugišką atmosferą ir visokeriopą pagalbą atliekant mokslinius tyrimus.

Taip pat dėkoju dr. Eglei Lastauskienei ir dr. Živilei Strazdaitei-Žielienei už patarimus ir pastabas leidusias paruošti geresnę disertaciją.

Labai ačiū savo šeimai ir draugams, kurie mane palaikė visų doktorantūros studijų metu.



## MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

### Disertacijoje pateikti rezultatai paskelbti straipsniuose:

1. **Aitmanaitė L.**, Konovalovas A., Medvedevas P., Servienė S., Serva S. (2021) Specificity Determination in *Saccharomyces cerevisiae* Killer Virus Systems. *Microorganisms*. 9(2), 236.

Disertantės indėlis: atliko didžiąją dalį eksperimentų, atliko jų analizę, parengė paveikslus, aprašė metodus, prisidėjo prie publikacijos paruošimo.

2. Lukša J., Ravoitytė B., Konovalovas A., **Aitmanaitė L.**, Butenko A., Yurchenko V., Serva S., Servienė E. (2017) Different Metabolic Pathways Are Involved in Response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and M Viruses. *Toxins*. 9(8), 233.

Disertantės indėlis: sukūrė universalų LA ir M virusų eliminavimo iš mielių metodą. Jo pagrindu paruošė transkriptominiuose tyrimuose naudotus mielių kamienus. Aprašė dalį metodų.

### Disertacijoje pateikti rezultatai pristatyti tarptautinėse konferencijose:

1. **Aitmanaitė L.**, Konovalovas A., Servienė E., Serva S. 2017. Healing the yeast from L-A virus(es). *7th Congress of European Microbiologists, FEMS2017*. 2017, Valencia, Spain. Abstract book, 2348.
2. Lukša J., Ravoitytė B., Konovalovas A., **Aitmanaitė L.**, Butenko A., Yurchenko V., Serva S. ir Servienė E. Profiling of host gene expression under the action of *Saccharomyces cerevisiae* L-A-lus and M-2 viruses. *28<sup>th</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB)*. 2017, Prague, Czech Republic.
3. Konovalovas A., **Aitmanaitė L.**, Vepštaitė-Monstavičė I., Stanevičienė R., Servienė E. ir Serva S. New Double-stranded RNA Viruses From *Saccharomyces sensu stricto*. *28<sup>th</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB)*. 2017, Prague, Czech Republic.

4. **Aitmanaitė L.**, Konovalovas A., Medvedevas P., Servienė E., Serva S. Complex relationships between yeast totiviruses. *XVth Conference of the Lithuanian Biochemical Society*. 2018, Dubingiai, Lithuania.
5. **Aitmanaitė L.**, Konovalovas A., Servienė E., Serva S. Interplay between L-A and M viruses in yeast. *The 43rd FEBS Congress*. 2018, Prague, Czech Republic. FEBS Open Bio 8: Abstract number - 195.
6. **Aitmanaitė L.**, Konovalovas A., Servienė E., Serva S. Interplay between L-A and M viruses in yeast. *The 18th FEBS Young Scientist's Forum*. 2018, Prague, Czech Republic.
7. **Aitmanaitė L.**, Konovalovas A., Medvedevas P., Servienė E., Serva S. The specificity of yeast totiviruses and mechanisms behind it. *8th Congress of European Microbiologists, FEMS2019*. 2019, Glasgow, United Kingdom. Abstract book, 687.

## **MOKSLINIAI STRAIPSNIAI**

1 publikacija / 1<sup>st</sup> publication

**Different Metabolic Pathways Are Involved in  
Response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and  
M Viruses**


J. Lukša, B. Ravoitytė, A. Konovalovas, **L. Aitmanaitė**, A. Butenko,  
V. Yurchenko, S. Serva, E. Servienė

*Toxins* **9(8)**, 233, 1-17 (2017)

DOI: 10.3390/toxins9080233

Article

# Different Metabolic Pathways Are Involved in Response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and M Viruses

Juliana Lukša<sup>1</sup>, Bazilė Ravoitytė<sup>1</sup>, Aleksandras Konovalovas<sup>2</sup>, Lina Aitmanaitė<sup>2</sup>, Anzhelika Butenko<sup>3</sup>, Vyacheslav Yurchenko<sup>3</sup> , Saulius Serva<sup>2</sup> and Elena Servienė<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Genetics, Institute of Botany, Nature Research Centre, Akademijos str. 2, Vilnius LT-08412, Lithuania; juluksa@gmail.com (J.L.); bazilerav@gmail.com (B.R.)

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biosciences, Vilnius University, Saulėtekio al. 7, Vilnius LT-10257, Lithuania; aleksandras.konovalovas@gf.vu.lt (A.K.); lina.aitmanaitė@gf.vu.lt (L.A.); saulius.serva@gf.vu.lt (S.S.)

<sup>3</sup> Life Science Research Centre and Institute of Environmental Technologies, Faculty of Science, University of Ostrava, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, Czech Republic; rolando24@ya.ru (A.B.); vyacheslav.yurchenko@osu.cz (V.Y.)

\* Correspondence: elena.serviene@botanika.lt; Tel.: +370-52-72-9363

Academic Editor: Manfred J. Schmitt

Received: 30 June 2017; Accepted: 21 July 2017; Published: 25 July 2017

**Abstract:** Competitive and naturally occurring yeast killer phenotype is governed by coinfection with dsRNA viruses. Long-term relationship between the host cell and viruses appear to be beneficial and co-adaptive; however, the impact of viral dsRNA on the host gene expression has barely been investigated. Here, we determined the transcriptomic profiles of the host *Saccharomyces cerevisiae* upon the loss of the M-2 dsRNA alone and the M-2 along with the L-A-lus dsRNAs. We provide a comprehensive study based on the high-throughput RNA-Seq data, Gene Ontology and the analysis of the interaction networks. We identified 486 genes differentially expressed after curing yeast cells of the M-2 dsRNA and 715 genes affected by the elimination of both M-2 and L-A-lus dsRNAs. We report that most of the transcriptional responses induced by viral dsRNAs are moderate. Differently expressed genes are related to ribosome biogenesis, mitochondrial functions, stress response, biosynthesis of lipids and amino acids. Our study also provided insight into the virus–host and virus–virus interplays.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; dsRNA viruses; host gene expression; RNA-Seq

## 1. Introduction

Mycoviruses are common in fungi and typically possess dsRNA genome [1]. Fungal viruses lack the extracellular phase; they are inherited vertically either after cell division or through mating with a donor cell [2,3]. It has been demonstrated that genes of dsRNA viruses (i.e., *Totiviridae* and *Partitiviridae*) have widespread homologs in the nuclear genomes of eukaryotic organisms, such as plants, arthropods, fungi, nematodes, and protozoa, suggesting that viral genes might have been transferred horizontally from viral to eukaryotic genomes [3,4]. *Totiviridae* viruses in yeast are generally associated with symptomless and persistent infections [1], affecting host fitness in various ways by changing the virulence of fungal plant pathogens [5,6] and/or inducing toxin production [7–9].

Budding yeast is one of the best-described unicellular eukaryotic model organisms. It hosts *Totiviridae* dsRNA viruses such as L (L-A-1, L-A-2, L-A-28, L-A-lus, and L-BC) and M (M-1, M-2, M-28, and M-lus) [2,10,11]. These relatively small (around 4.6 kb for L; 1.5–2.3 kb for M) dsRNA determine yeast killer phenotype discovered almost 50 years ago [12]. The genome of the L-A virus

typically encompasses two ORFs, one for the capsid protein another one for the RNA-dependent RNA polymerase, latter encoded as a frameshift-dependent read-through protein. M dsRNA genome contains a single ORF encoding precursor of the toxin, processed into the secreted toxin and the preprotoxin providing self-immunity [2]. The killer phenotype, which may also be determined by chromosome- or plasmid-encoded toxins, is known to be widespread in nature [13]. The killer system confers increase competitiveness toward sensitive strains contending for resources in the environment [14]. This attractive property encouraged the application of killer yeast in many industrial and therapeutic processes [15–20]. Screening for yeast genes related to altered cell susceptibility to certain M dsRNA-encoded killer toxins (K1, K2, and K28) addressed the killing mechanisms in further details [21–23]. In contrast, the role of the L virus, maintained in yeast cells lacking killer phenotype, remains obscure. There is no current agreement whether the residual L virus is a relic of a killer system, which has lost the M dsRNA, or if it grants yet uncovered benefits for the host cell. One example of such beneficial relationship is dsRNA of mycoviruses, providing the host with virulence-associated traits such as increase in growth rate and sporulation [5]. Loss of the M dsRNA would be unfavorable in killer yeast populations, since a virus-free cell would be vulnerable to the toxin produced by the surrounding cells [14].

Yeasts and their dsRNA viruses provide a convenient model system for studying the host–virus interactions. In terms of phylogeny, recent studies revealed killer strains to be more related to each other than to the non-killer kins [24], suggesting co-adaptation of natural yeast killer strains and their viruses [25]. Gene expression analysis has been employed to examine the impact of viral infections on host cells of various organisms (bacteria [26,27]; plants [28]; and animals [29,30] including human [31,32]). Previously, transcriptional responses related to fungal viruses have been investigated [33–35]. Meanwhile, data on transcriptional responses induced by the elimination of dsRNA viruses from their yeasts hosts are scarce. To the best of our knowledge, the only report concerned the impact of yeast L-A-1 and M-1 dsRNA viruses on the host transcription alteration of *S. cerevisiae* utilized a microarray approach to assay transcriptional changes [36].

In this study, we provide an overview of yeast (*S. cerevisiae*) gene expression changes in M437 strain cured of the M-2 exclusively or from both M-2 and L-A-lus dsRNA viruses analyzed by Next-Generation Sequencing technique. Differently expressed genes were subjected to Gene Ontology (GO) analysis and their physical and/or functional interaction networks were established. Our results provide new insights into the virus–host and virus–virus interactions and the bases of co-adaptation.

## 2. Results

### 2.1. Differential Gene Expression Induced by Elimination of Viral DsRNA(s)

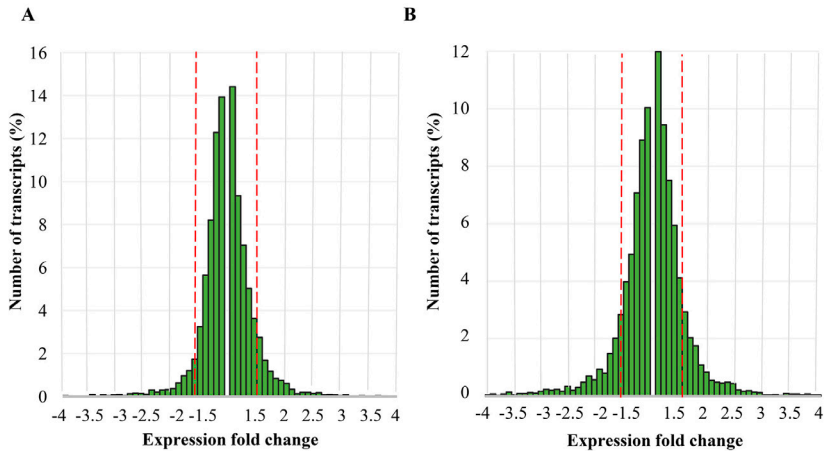
To study the transcriptional response to the loss of viruses, yeast cells lacking either M-2 (M437 [L+M–]) or both L-A-lus and M-2 dsRNA viruses (M437 [L–M–]) were generated. The absence of corresponding dsRNA(s) in particular cells was confirmed by functional tests, dsRNA gel electrophoresis and RT-PCR (Figure S1).

To elucidate changes in gene transcription of the yeast strain induced by different sets of dsRNA viruses, whole transcriptome profiling was performed. Transcriptional changes induced by the absence of viral dsRNA(s) in M437 [L+M–] and M437 [L–M–] cells were compared to the wild type *S. cerevisiae* M437 [L+M+] K2-killer strain, which naturally possesses L-A-lus and M-2 dsRNAs. Hereafter, upregulation indicates higher and downregulation lower transcription levels in dsRNA(s)-free cells compared to M437 [L+M+].

In total, 486 genes were shown to be differentially expressed (at least 1.5-fold change; Benjamini and Hochberg False Discovery Rate corrected, with  $p < 0.05$  significance level) after eliminating the M-2 dsRNA (Table S1). Out of these, 239 and 247 genes were significantly up- and downregulated compared to the reference strain M437 [L+M+], respectively. Elimination of both M-2 and L-A-lus dsRNAs affected transcriptional changes of 715 genes (about 1.5 times more genes compared to the M-2 loss

alone) (Table S1). In M437 [L–M–] cells, 291 and 424 genes were up- and downregulated, respectively. Interestingly, while elimination of M-2 dsRNA caused upregulation and downregulation of similar number of genes, simultaneous removal of both viruses increased the proportion of negatively regulated genes about 1.5 times, compared to the M-2-free cells.

Most changes in host gene expression in response to the loss of viral dsRNA(s) were moderate and did not exceed the limit of four-fold change (Figure 1).



**Figure 1.** Distribution of expression fold differences induced by the loss of viral dsRNA(s). Distribution of expression fold changes induced by elimination: of M-2 dsRNA (L+M–) (A); or of both L-A-lus and M-2 dsRNAs (L–M–) (B). Range of represented fold changes is from –4 to 4. Red dashed lines mark the threshold of significant fold change value (1.5-fold change) in our analyses. Bar heights represent percentage of genes showing corresponding fold change compared to the *S. cerevisiae* S288C reference genome (6008 genes in total).

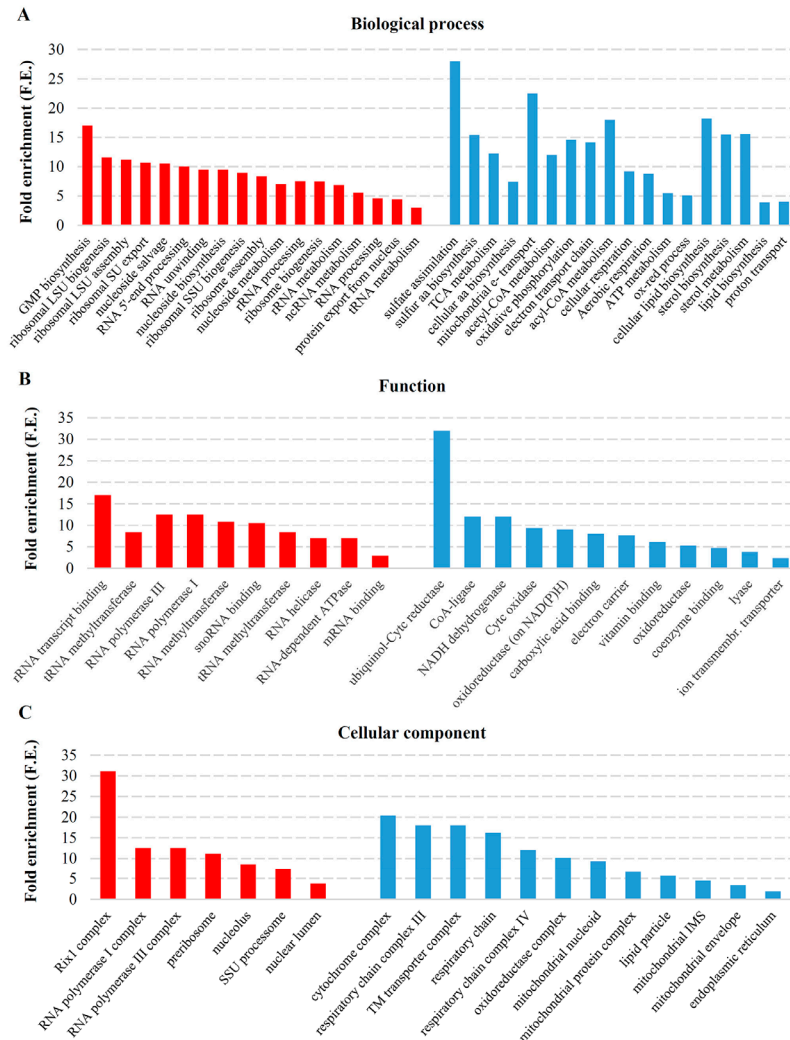
Only 19 genes in M437 [L+M–] and 22 genes in M437 [L–M–] cells were upregulated four-fold or more, while downregulation for more than four-fold was documented for 39 genes in M437 [L+M–] and 66 genes in M437 [L–M–] cells in comparison to the reference strain.

Representative examples of the up- and down-regulated genes were evaluated by qRT-PCR confirming the data obtained in whole-transcriptome profiling experiments (Figure S2).

## 2.2. Transcriptional Response to M-2 DsRNA Elimination

To characterize the cellular activities connected with the viral dsRNA elimination, we calculated the enrichment of “biological process”, “cellular component” and “function” gene ontology (GO) terms associated with genes of altered transcription. We identified 363 and 231 statistically enriched GO terms of genes altered by the elimination of M-2 and both M-2 and L-A-lus, respectively (Tables S2–S4).

In transcriptional response to the M-2 dsRNA elimination, RNA-related processes such as ribosome biogenesis and assembly (Fold enrichment (F.E.) of 7.5 and 8.4, respectively); metabolic processes of rRNA, ncRNA, and tRNA (F.E. of 6.9, 5.5, and 3, respectively); and RNA 5′-end and rRNA processing (F.E. of 10.0 and 7.5, respectively) were positively stimulated (Figure 2A).



**Figure 2.** Statistically significant enriched gene ontology terms associated with the functioning of M-2 virus. Fold enrichment (F.E.) was calculated by dividing the frequency of specific gene cluster to the total frequency for each GO term, according to the data presented in Tables S2–S4: (A) enriched GO terms associated with biological processes; (B) functions; and (C) cellular components. Color coding is as follows: red, upregulated genes; blue, downregulated. snoRNA: small nucleolar RNA; rRNA: ribosomal RNA; SSU: small ribosome subunit; LSU: large ribosome subunit; TM: transmembrane; IMS: intermembrane space; Cyt c-cytochrome c.

Nucleoside biosynthetic and metabolic processes were highly enriched (F.E. of 9.5 and 7, respectively), including GMP biosynthesis and nucleoside salvage (F.E. of 17 and 10.5, respectively). Genes involved in RNA secondary structure unwinding, ribosomal subunit and protein export from the nucleus (F.E. of 9.5, 10.7 and 4.4, respectively) were upregulated in response to the M-2 virus



loss. Functional allocation of the upregulated genes fell into the activities of RNA methyltransferase (F.E. of 10.8), RNA-dependent ATPase and RNA helicase (F.E. of 7 of each), and RNA polymerase I and III (F.E. of 12.5 of each) (Figure 2B, Table S3). GO terms defining localization were consistent with the assigned RNA-related processes (Table S4). Enriched cellular component terms included nuclear lumen (F.E. of 3.8), nucleolus (F.E. of 8.53) and preribosome (F.E. of 11.15). Complexes such as DNA-directed RNA polymerase I and RNA polymerase III (F.E. of 12.5 of each) and Rix1 (F.E. of 31.05) were also highly represented (Figure 2C, Table S4).

Elimination of the M-2 dsRNA resulted in downregulation of genes involved in distinct biological processes (Figure 2A, Table S2). Genes involved in energy production (electron transport chain and cellular respiration with respective F.E. of 14.2 and 9.2), cellular lipid biosynthesis and sterol metabolism (F.E. of 18.3 and 15.6, respectively), and biosynthesis of cellular amino acids (F.E. of 7.4) were downregulated. The decreased activity of mentioned above systems are consistent with diminished demand for energy, amino acids and lipids in the absence of the M-2 virus. Sulfate assimilation (F.E. of 28) and sulfur amino acid biosynthetic processes (F.E. of 15.4) along with mitochondrial electron transport (ubiquinol to cytochrome c) (F.E. of 22.5), acyl-CoA, acetyl-CoA and sterol metabolic processes (F.E. of 18.01, 12.0 and 15.6, respectively) were among the most enriched GO terms (Figure 2A). Function ontology confirmed downregulation of electron carrier, oxidoreductase, cytochrome c oxidase, NADH dehydrogenase and CoA-ligase with respective F.E. of 7.6, 5.3, 9.3, 12 and 12 activities, related to mitochondria (Figure 2B, Table S3). Localization enrichment also supports the importance of mitochondria in the functioning of M-2 virus (mitochondrial respiratory chain (F.E. of 17.3), cytochrome complex (F.E. of 20.3), mitochondrial envelope (F.E. of 3.4), mitochondrial protein complex (F.E. of 6.6), and respiratory chain complexes III and IV (F.E. of 18 and 12, respectively) were all downregulated) (Figure 2C, Table S4).

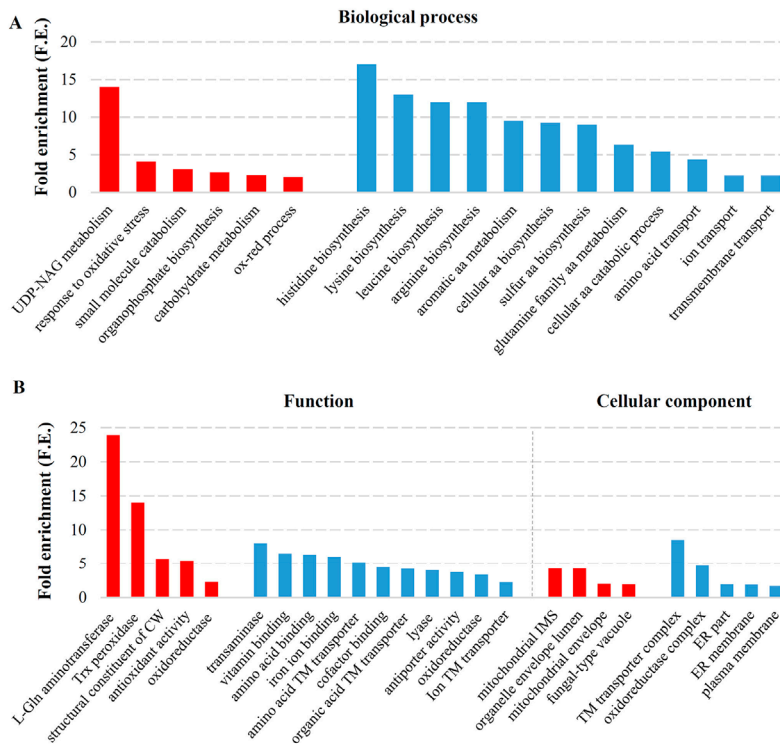
### 2.3. Transcriptional Response to Elimination of Both M-2 and L-A-lus

While genes upregulated in the M-2-free cells positioned within highly enriched and quite specific categories, elimination of the L-A-lus and M-2 dsRNAs triggered fewer number of broader processes in terms of upregulation (Figure 3A). More than 50 out of 291 upregulated genes in M437 [L–M–] cells are listed as uncharacterized. This is the largest number of uncharacterized genes among all four sets of differently expressed genes described in our study. Enriched GO terms of positively regulated genes are related to stress response, namely cellular response to oxidative stress, oxidation-reduction process, carbohydrate metabolic process and UDP-N-acetylglucosamine metabolic process (F.E. of 4.06, 2.02, 2.27 and 14, respectively) (Figure 3A). Proteins involved in UDP-N-acetylglucosamine metabolic process are related to cell wall biogenesis (synthesis of chitin, GPI anchor and mannoproteins) [37]. Response to stress is supported by function ontology enrichment of structural constituent of cell wall (F.E. of 5.7) and related L-glutamine aminotransferase activity (F.E. of 23.9), as well as antioxidant (F.E. of 5.4) and related thioredoxin peroxidases (F.E. of 14) (Figure 3B).

Downregulated genes are involved in highly similar processes in response to elimination of the M-2 dsRNA alone or both L-A-lus and M-2 viruses (Figures 2A and 3A). M437 [L+M–] and M437 [L–M–] cells share negative regulation of genes related to more than 50% of total number of enriched processes (assigned to downregulated genes in both cell types), namely cellular amino acid biosynthetic process (F.E. of 7.4 and 9.3, respectively), cellular lipid biosynthetic process (F.E. of 18.25 and 13, respectively), cellular respiration (F.E. of 9.2 and 3, respectively) (Figures 2 and 3). Total number of downregulated genes was higher in M437 [L–M–] than in M437 [L+M–] cells (424 and 247 genes, respectively), indicating that the fold enrichment values tend to be lesser despite the greater number of genes assigned to the same process.

Nevertheless, judging by F.E. values and assigned number of genes, amino acid biosynthesis was clearly downregulated in M437 [L–M–] in a greater extent than in M437 [L+M–] cells. The expression of genes related to overall and specific amino acid biosynthesis (arginine (F.E. of 12), histidine (F.E. of 17), leucine (F.E. of 12), and lysine (F.E. of 13)) and transport (F.E. of 4.4) were

highly repressed upon elimination of both viruses (Figure 3A). Negatively regulated processes were related to ATP synthesis (such as aerobic respiration, tricarboxylic acid metabolism, mitochondrial electron transport (ubiquinol to cytochrome c) and proton transport with respective F.E. of 8.8, 11.3, 22.5, 4.1) were more specific to M437 [L+M−] cells (Figure 2A). Functional ontology confirmed downregulation of oxidoreductases, transaminases and lyases (F.E. of 3.3, 8.0, 4.0, respectively), functions of transmembrane transporters (of amino acids, organic acids and ions, with respective F.E. 5.2, 4.2 and 2.2) and binding activities (of various cofactors (F.E. 4.4), amino acids (F.E. 6.3), vitamins (6.5)) were more typical to M437 [L−M−] cells (Figure 3B). However, more specific assignment of oxidoreductase function confirms that oxidoreductase activity in M437 [L−M−] cells is related to synthesis of amino acids and sterols by acting on CH-NH, CH-NH<sub>2</sub> groups and on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen (Table S3). In M437 [L+M−] cells, the oxidoreductase activity was linked to ubiquinol and cytochrome c, by acting on CH-CH and CH-OH groups of donors (Table S3). This indicates that M-2 disposal significantly reduces cellular energy costs, but L-A-lus dsRNA possessing cells still require elevated synthesis of amino acids comparing to that of dsRNA-free cells.



**Figure 3.** Statistically significant enriched gene ontology terms associated with the functioning of both M-2 and L-A-lus viruses: (A) statistically significant enriched GO terms associated with biological process; and (B) functioning and cellular components. Red color represents upregulated genes in both virus-free cells, blue-downregulated genes. Fold enrichment (F.E.) was calculated by dividing the frequency of specific gene cluster to the total frequency for each GO term, according to the data presented in Tables S2–S4. Trx: thioredoxin; CW: cell wall; IMS: intermembrane space; TM: transmembrane; UDP-NAG: UDP-N-acetylglucosamine; L-Gln: L-glutamine.

#### 2.4. Gene Products Involved in M-2 and L-A-lus Virus Biology Are Physically and Functionally Highly Interconnected In Vivo

The physical and/or functional interaction of gene products identified in RNA-Seq. analysis was addressed next. For this, a STRING database of known and predicted protein interactions was used to analyze gene products involved in processes altered by elimination of M-2 (Figure 4) and both L-A-lus and M-2 viral dsRNAs (Figure 5).

Products of genes with altered expression level in M-2-free cells and related to ribosome biogenesis, oxidation-reduction and lipid metabolism were shown to be highly interconnected (Figure 4). Interconnections formed highly-reliable hub between members of ribosome biogenesis group. Most of the genes encoding these proteins are essential. They are related to ribosomal RNA processing (Rrp1, -5, -12, and -14); ATP-dependent RNA helicases of the DEAD-box protein family (Dbp2, -8, and -10); components of the Rix1 complex and pre-replicative complexes Ipi1 and Ipi3; components of RNA polymerases (Rpb8, and Rpc10 and -19); many nucleolar proteins (e.g., Nop1, -4, -7, -8, and -10); and others. In terms of fold change, *NSR1*, *RRS1* and *ALB1* were the most (almost three-fold) upregulated genes in this group. Among the closely interconnected gene products involved in ribosome biogenesis, we noted those that are also required for maintenance of M-1 dsRNA (Mak5, Mak11, Mak16) [38–40] and involved in susceptibility to K1 (Kre33) [21] or both K1 and K2 killer toxins (Fyv7) [23].

The products of downregulated genes in M437 [L+M–] cells showed interconnections of high confidence level between members related to cellular energetic processes (Figure 4B). Most genes are directly involved in mitochondrial structure and function, such as cytochrome b and c (*CYB2*, *CYB-5*, *CYT1*, *CYC1* and *CYC7*), cytochrome c oxidase complex subunits (*COX4*, *COX5A*, *COX6-7*, *COX12-13* and *COX15*), and ubiquinol cytochrome c reductase subunits (*COR1*, *RIP1*, *QCR2* and *QCR6-10*) encoding genes. There are also many genes involved in various cellular processes associated with the generation of energy, such as sulfate assimilation and methionine metabolism (*MET1*, -3, -5, -8, -10, -13, -14 and -16), lipid metabolism and genes that may be related to stress response (*MRX1*, *SOD2*, *HMX1*, *NDI1*, *MIX17*, and *ZWF1*). Among downregulated genes, clustered into group associated with oxidation-reduction processes and generation of energy, a sub-network of highly interconnected 29 gene products involved in lipid metabolism was evident (high confidence level). Most of them were associated with ergosterol biosynthesis and metabolism (*Mcr1*; *Erg4*, -5, -9, -10, -24, -26, and -27; *Osh6* and -7; *Idi1*; and *Mvd1*) and homeostasis of lipid particles (*Are2*, *Yeh1*, *Tg14*, *Eht1*, *Faa1*) (Figure 4B). *TAR1* is the most downregulated (almost nine-fold) gene in the group of cellular energetic processes. Interestingly, it is encoded in the antisense strand of the nuclear 25S rDNA. *TAR1* and rDNA transcription might be inversely regulated consistent with the finding that ribosome biogenesis is highly upregulated in M-2 dsRNA-free cells. Even though *Tar1* function is still unknown, this regulation could provide means to coordinate rDNA transcription and mitochondrial function in response to changing cellular needs or energy demands [41].

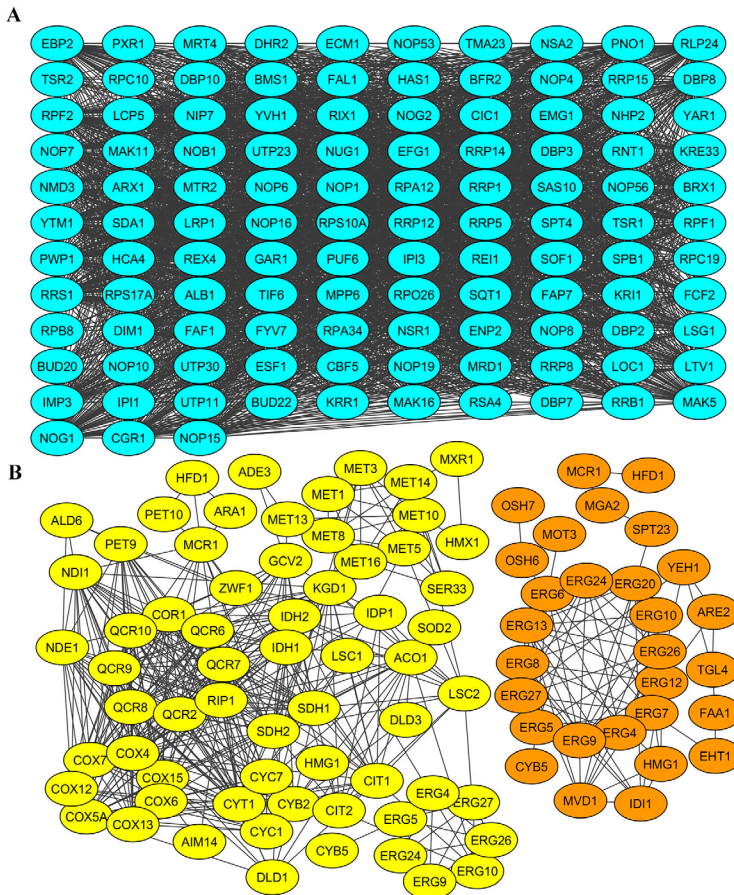
Among the gene products, differently expressed in M437 [L–M–] cells, three interconnected groups related to oxidation-reduction, amino acid biosynthesis and transmembrane transport were built (Figure 5). Products of represented genes possess high (0.7) interaction confidence level.

Numerous upregulated genes assigned to oxidation-reduction group encoded reductases (*Gor1*, *Mxr2*, and *Rnr2*), dehydrogenases (*Imd2*, *Imd4*, *Adh1*, *Adh2*, *Ald4*, and *Gcy1*) and peroxidases (*Tsa2*, *Hyr1*, and *Gpx1*). *PRX1*-encoded mitochondrial peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity has most interactions in the group and is known to be induced during oxidative stress (Figure 5A).

Importantly, elimination of either M-2 or M-2 and L-A-lus dsRNA altered expression of several genes, related to oxidation-reduction processes. However, these genes do not overlap and were shown to be involved in distinct processes: in M-2 dsRNA-free cells they are associated with energy generation and in M-2 and L-A-lus free cells they are related to stress response.

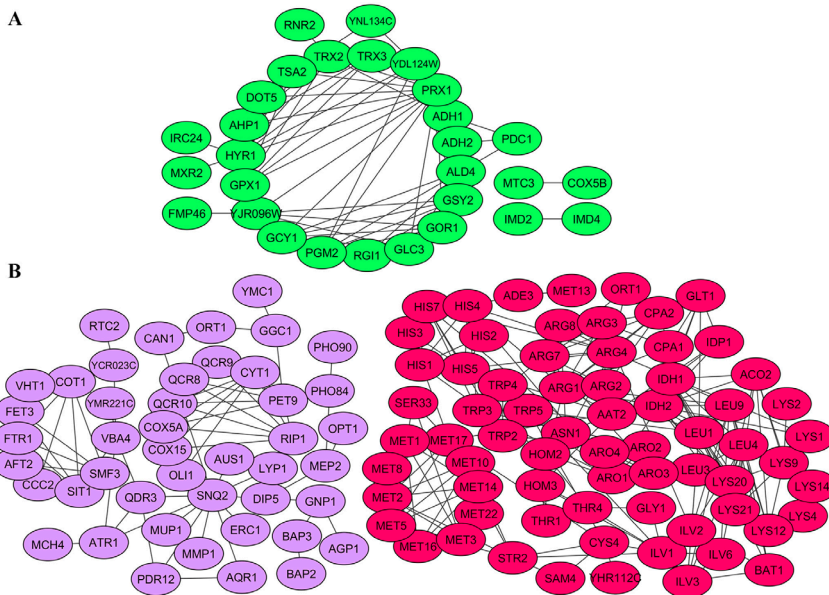
Interactions among gene products of downregulated genes related to amino acid biosynthesis were represented by the highest confidence level (Figure 5B). Certain enzymes, involved in biosynthesis

of more than one amino acid (e.g., enzymes of TCA cycle (Aco2, Idh1, and Idh2), Ade3 (required for biosynthesis of methionine and histidine), Hom2 and -3 (for methionine and threonine biosynthesis), Aro1–4 (for aromatic amino acids), and others) strengthen interactions among group members. Connections between gene products, related to biosynthesis of glutamate (Idh1 and Glt1), arginine (Ort1, Arg1–4, Arg5–6, Arg7–8, and Cpa1–2), methionine and cysteine (Met1–3, -5, -8, -10, -13, -14, -16, -17, and -22; Sam4; Cys4; and Str2), leucine, isoleucine and valine (Leu1, -3, -4, and -9 and Ilv1–3, and -6), serine and glycine (Ser33 and Gly1), threonine (Thr1 and -4), aromatic amino acids (Trp2–5, and His1–5, and -7), were also well represented. Genes involved in arginine biosynthesis (ARG1, -7 and -5,6) were the most downregulated (more than five-fold) in this group.



**Figure 4.** Networks of interconnected gene products involved in viral M-2 dsRNA biology. Networks of physically and/or functionally interacting gene products were established with STRING (see Materials and Methods). Gene products are depicted as color-coded nodes, according to cellular processes, and are connected by edges. Color coding is as follows: blue, ribosomal biogenesis; yellow, oxidation-reduction processes and energy generation; orange, lipid metabolism. (A) Gene products upregulated in response to loss of M2 virus; and (B) downregulated gene products in M2 virus-free cells.

Interactions of negatively regulated genes in transmembrane transport group were represented at medium confidence level (Figure 5B). Most of the highly-interconnected genes were related to mitochondria. Some were connected to respiratory chain and ATP synthesis (e.g., CYT1, RIP1, COX5A, COX15, OLI1, and PET9), transporters of amino acids and their biosynthesis intermediates (MMP1, MUP1, MCH4, VBA4, RTC2, GNP1, BAP2 and -3, AGP1, AQR1, and VBA4), phosphate transporters (PHO84 and PHO90), transporters of divalent metal ions of iron, copper, zinc (FTR1, SMF3, CCC2, and COT1), ABC transporters (AUS1, SNQ2, and PDR12) and other multidrug transporters (QDR3, ERC1, and YCR023C). Thus, majority of genes were involved in transport of amino acid, consistent with downregulated biosynthesis of these molecules.



**Figure 5.** Networks of interconnected gene products involved in biology of L-A-lus and M-2 dsRNAs. Physical and/or functional networks were established with STRING (see Materials and Methods). Gene products are depicted as color-coded nodes, according to cellular processes, and are connected by edges. Color coding is as follows: green, oxidation-reduction and stress response; purple, transmembrane transport; red, amino acid biosynthesis. (A) Gene products upregulated in response to loss of M2 and L-A-lus viruses; and (B) downregulated gene products in M2 and L-A-lus-free cells.

### 2.5. Link between Host Gene Expression Altered by Viral DsRNA and Cell Sensitivity to K2 Toxin

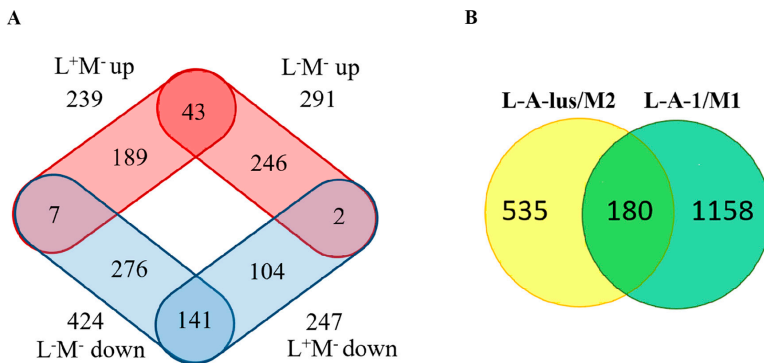
We compared the list of differently expressed genes of virus hosting cells, with the genes conferring increased resistance or sensitivity of target cell to the K2 killer toxin [23]. There were 42 common genes, dispersed in upregulated and downregulated processes, as well as those involved in an increased toxin susceptibility and resistance. Elimination of the M-2 virus deprives cells of both K2 toxin production and immunity to the toxin. M437 [L+M−] cells boost expression of genes, whose absence confers increased sensitivity for the K2 toxin (*LTV1*, *BUD23*, *NSR1*, *FYV5*, *FYV7*, *LRP1*, *MRT4* and *HGH1*). The majority of those upregulated genes are related to ribosomes and RNA processing. In line with previous observation, part of genes conferring increased resistance of target-cell to K2 toxin in corresponding knockout strains were downregulated upon M-2 dsRNA elimination (namely *BIO3*, *MCRI*, *COR1*, *COX7*, *COX15*, *CWH41*, *VTC2*, *SEL1*, *SNZ1*, *ARR2*, *YCP4* and *ECM1*). These negatively

regulated genes are involved in several processes (e.g., oxidation-reduction, membrane trafficking, glycosylation, and ER-associated protein degradation). Genes, whose deletions were shown to confer either increased susceptibility (*VPS41*, *SNX41*, *SIT1*, *ARO1*, *SCS7*, *GCV1*, *CAF17* and *YPR013C*) or resistance (*YOR010C*, *YOL136C*, *YOR154W*, *DIE2*, *FKH1*, *ARG4*, *SML1* and *ISU1*) to K2 toxin, were preferentially downregulated upon elimination of both L-A-lus and M-2 viruses.

### 3. Discussion

In this study, we addressed the impact of dsRNA viruses on transcriptional status of native strain M437 [L+M+]. Prolonged infection of yeast with L-A-lus and M-2 viruses resulted in versatile coadaptation of viruses and host, thus the strains representing virus-naïve conditions—either M-2 free or L-A-lus and M-2 free—were prepared manually. In such a way, transcriptional alterations of wild type strain M437 were described from the perspective of dsRNA-cured cells. We measured transcript levels using RNA-Seq, a robust and an extremely sensitive standard for analysis of global gene expression [23,42–44]. We have demonstrated that curing cells from either M-2 or L-A-lus simultaneously with M-2 resulted in moderate alterations of host gene expression.

The Venn diagram represents numbers of differently expressed genes identified in M437 [L+M−] and M437 [L−M−] cells (Figure 6A).



**Figure 6.** Number of genes differently expressed in virus-free cells: (A) Response to the loss of M2 dsRNA (L+M−) or both L-A-lus and M2 dsRNA's (L−M−). Red color represents set of upregulated genes, blue—downregulated genes. (B) Overlap of genes impacted by L-A-1/M1 (green color) and L-A-lus/M2 viruses (yellow).

Elimination of M-2 dsRNA alone led to exclusive upregulation and downregulation of 189 and 104 genes, respectively. Combined removal of the L-A-lus and M-2 dsRNAs resulted in unique upregulation and downregulation of 246 and 276 genes, respectively, suggesting that L-A-lus virus has a more profound impact on host gene expression. M437 [L+M−] cells share number of downregulated and upregulated genes (141 and 43, respectively) with M437 [L−M−] cells. It might be the consequence of co-adaptation and additive effects of small transcriptional changes induced by the elimination of both dsRNA viruses. There was also a small number of differently expressed genes that were oppositely regulated in M437 [L+M−] and M437 [L−M−] cells, further confirming high compatibility of L-A-lus and M-2 dsRNA viruses.

M-2 dsRNA is responsible for toxin and immunity-ensuring component production. Maintenance of K2 toxin demands higher cellular energy production; thus, M-2 removal should be associated with a relief for a host cell by lowering energy costs for synthesis of viral RNA and proteins. Propagation of L-A-lus dsRNA and capsid proteins in host cells also requires more resources than completely cured,

dsRNA-free cells. Our study uncovers the processes related to amino acid and lipid biosynthesis, transport and energy production to be positively regulated upon infection with L-A-lus and M-2 dsRNAs, whereas ribosome biogenesis and stress responses are downregulated following the infection. This observation is consistent with the notion that killer cells could be more competitive and less stress-aware due to the presence of the host protection system. It is also possible that dsRNA viruses might have yet unrevealed roles in controlling of cellular RNA metabolism and other processes, not linked directly to the maintenance of a virus in the cell.

Upregulation or downregulation of genes do not necessarily mean that elimination of viral dsRNA is altering “normal” gene expression levels. It might be just the opposite, when the presence of virus is attenuating or boosting the expression of certain genes. In this case, transcription of genes related to ribosome biogenesis and RNA processing could be normally suppressed, while amino acid biosynthesis might be stimulated to produce killer toxin and capsid proteins in natural K2 killer cells. Ribosome biogenesis might be repressed in native K2 killer strain for mobilizing of the host cell resources for killer toxin maintenance while following the M-2 elimination it returns to normal state. Alternatively, elimination of the M-2 dsRNA might change the L-A-lus induced transcription to compensate the loss of M-2, thus upregulating the ribosome biogenesis. From the perspective of L-A-lus virus, M-2 acts like a parasite by utilizing resources from the host and helper virus. It has been demonstrated that dsRNA satellite benefits from the drop in the L-A virus copy number [14,45]. Critical dependence of yeast virus propagation on the concentration of ribosomal content was previously reported, suggesting that most *mak* mutations affect M-1 virus propagation by targeting the supply of proteins from the L-A virus and that the translation of the L-A mRNA depends critically on the amount of free 60S ribosomal subunits [46]. Indeed, in our study, *MAK5*, *MAK11*, *MAK16* and *PET18* genes, required for maintenance of M-1 dsRNA, were found upregulated exclusively in the presence of the L-A-lus dsRNA and absence of M-2 dsRNA, in agreement with altered transcription of these four genes reported previously [36].

The magnitude of the impact of dsRNA viruses on gene expression of *Saccharomyces cerevisiae* observed in our study was consistent with findings of microarray data published by McBride et al. (2013) [36]. The alterations of host gene expression affected by L-A-lus and M2 viruses were moderate, usually not exceeding the limit of four-fold change. Similarly, the loss of L-A-1 and the M-1 viruses resulted in the change to host gene expression pattern, mostly not exceeding three-fold [36]. We found that 180 genes, detected in the analysis of L-A-lus and M2 viruses, significantly affecting gene expression, overlapped with uncovered in the L-A-1/M1 study, while the other 535 genes were uniquely upregulated and downregulated in our study (Figure 6B). Comparative analysis of strains possessing different viral systems found the enriched GO terms of positively regulated genes related to mitochondria functioning, cytosolic and transmembrane transport. However, genes associated with organic acid metabolism, including amino acid metabolism, were affected differently. In response to the loss of L-A-lus and M2 viruses, small molecule metabolic process was downregulated, while, in L-A-1 and the M-1 viruses-free cells, overexpressed. Typical differences were highlighted for biosynthesis of valine, leucine and isoleucine (Figure S3). Such discrepancy could be attributed to different viral systems in different strains targeted, as well as alternative experimental techniques, e.g., RNA-Seq and microarray, employed.

Long lasting coadaptation of dsRNA viruses and host cells led to moderate transcriptional responses induced by the elimination of viral dsRNA. Disruption of tightly linked killer system by removing either M or L-A along with M dsRNAs resulted in stress response, alterations in the biosynthesis of ribosomes, lipids and amino acids. Our study is the first attempt to employ high-throughput RNA-Seq. for evaluation of the impact of individual mycoviral dsRNAs on baking yeast gene expression. The roles of M and L-A dsRNAs in the individual biological pathways of the cell have been deciphered. Insights on alteration of host gene expression will help to understand the biology of dsRNA mycoviruses and their impact on the host cells.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Yeast Strains and Culture Media

*S. cerevisiae* strain M437 (*wt HM/HM [kil-K2]*) [47], harboring L-A-lus and M-2 dsRNA viruses, and isogenic strains M437 [L+M−] (*wt, HM/HM [kil-0]*) and M437 [L−M−] (*wt, HM/HM [kil-0]*), cured of the M-2 dsRNA and both L-A-lus and M-2 viruses, respectively, were used for gene expression profiling. *S. cerevisiae* yeast strain  $\dot{\imath}$ '1 (MAT $\dot{\imath}$  *leu2-2 [kil-0]*) was used as the sensitive strain for testing of killing phenotype [48].

Yeast cells were grown in standard YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, and 2% agar). To test the K2 activity, MBA medium (0.5% yeast extract, 0.5% peptone, and 2% dextrose), adjusted to pH 4 with 75 mM phosphate-citrate buffer and supplemented with 0.002% methylene blue dye, was used.

### 4.2. Curing Yeast Strain from M-2 DsRNA

M-2 dsRNA was eliminated from the M437 cells by means of moderate heat treatment. Yeast cells were spread onto YPD-agar plates and incubated at 37 °C for 4–5 days. The surviving colonies were replica-plated on MB-agar plates overlaid with sensitive to K2 toxin *S. cerevisiae* strain  $\dot{\imath}$ '1 and grown for 2 days at 25 °C. Colonies lacking killer phenotype (not forming lysis zones) were selected for dsRNA isolation and visual inspection by gel electrophoresis. Absence of M-2 dsRNA was also confirmed by 2-step RT-PCR.

### 4.3. Curing Yeast Strain from L-A-lus DsRNA

*S. cerevisiae* strain M437 was transformed with pYAK-G-LA-1gag [49] expression vector with truncated version of the L-A-1 GAG gene. Constitutive overexpression of the truncated GAG resulted in both L-A-lus and M-2 dsRNAs elimination from yeast cells. The absence of viral genome in yeast was examined and confirmed by agarose gel electrophoresis of dsRNA and by RT-PCR. The absence of killing phenotype was confirmed by the killing assay. The L-A-1 GAG expression vector was eliminated by several passages for 24 h in liquid YPD medium. Elimination of vector was confirmed by non-growth of yeast cells on selective YPD medium supplemented with 200  $\mu$ g/mL of G418 (geneticin) and by PCRs with primers specific for pYAK-G-LA-1gag vector (5'-CATTAGAAAAGAAAAGCATAGC and 5'-TCATGTAAAGGACTGCAAG) and for GAG gene sequences (5'-CGGAATTATGTCGTCTC and 5'-TCATGTAAAGGACTGCAAG). PCR cycling parameters consisted of an initial denaturation at 98 °C for 30 s; following as 30 cycles of 98 °C for 10 s, 58 °C for 20 s and 72 °C for 45 s; and a final extension step at 72 °C for 5 min.

### 4.4. Detection of Killing Phenotype

K2 toxin producing yeast strain M437 [L+M+] and yeast colonies after the dsRNA curing process were spotted onto MBA medium seeded with sensitive yeast strain  $\dot{\imath}$ '1 ( $1 \times 10^6$  cells/plate). Plates were incubated for 2 days at 25 °C. Non-growth zones around the colonies tested were attributed to the presence of killing phenotype [50].

### 4.5. Total RNA and DsRNA Extraction

Yeast cells were grown in liquid YPD medium at 25 °C for 16 h with shaking at 250 rpm. Collected cells ( $2 \times 10^8$  cells) were washed with 1 mL 50 mM EDTA solution, resuspended in 1 mL 50 mM TrisCl pH 8.8 containing 1%  $\alpha$ -mercaptoethanol and incubated at room temperature (RT) for 15 min. Cells were precipitated and mixed with 800  $\mu$ L TES (0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-Cl pH 7.5, 0.01 M EDTA, 0.2% SDS) solution, then 600  $\mu$ L phenol added and incubated for 30 min by using moderate shaking. The upper aqueous phase, separated by centrifugation at 15,000 g for 30 min, was treated with 60  $\mu$ L 3M NaAc pH 5.2 and 660  $\mu$ L 2-propanol. The pellet was collected by centrifugation at 15,000 g for



10 min, washed with cold 75% ethanol and resuspended in 16 µL of nuclease-free water. For DNA elimination, additional incubation with DNase I at 37 °C for 30 min was performed. DNase I was inactivated by adding EDTA to final concentration of 5 mM and incubating at 65 °C for 10 min. Total RNA was used for cDNA synthesis and subsequent PCR reaction for checking M-2 and L-A-lus dsRNA presence. After total RNA isolation, rRNA and other single-stranded RNAs were subsequently removed by precipitation with 2.8 M LiCl for 16 h at 4 °C and centrifugation at 15,000 g for 45 min at 4 °C. Double-stranded RNR was precipitated from the aqueous phase by ethanol [51].

#### 4.6. Detection of L-A-lus and M-2 DsRNAs by 2-step RT-PCR

Total RNA was used as a template for cDNA synthesis carried out with RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, Vilnius, Lithuania), according to the manufacturer's instructions. L-A-lus-specific primers (5'-CATGCATTAAAAAGTTCTGGAC and 5'-GTGCTAACTAGAGCATGTGTAAGG) and M-2-specific primers (5'-GGGAAAAAATGAAAGAGACTACCACCAG and 5'-GGGCTAGCCGCTGCACATTC) accordingly were used in cDNA synthesis. The same primers were used to detect L-A-lus and M-2 virus specific cDNAs conducting PCRs with DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher, Vilnius, Lithuania). PCR cycling parameters for L-A-lus detection consisted of an initial denaturation at 95 °C for 3 min; following as 30 cycles of 95 °C for 30 s, 54 °C for 30 s and 72 °C for 2 min; and a final extension step at 72 °C for 5 min. The following thermocycler conditions were used for M-2 dsRNA detection: 95 °C initial denaturation for 3 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, 72 °C for 80 s; and a final extension step at 72 °C for 5 min. PCR products analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel.

#### 4.7. Preparation of Total RNA for Next-Generation Sequencing

The total RNA was isolated using GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher, Vilnius, Lithuania), according to the Yeast Total RNA Purification Protocol. DNA from total RNA samples was eliminated by DNase I (Thermo Fisher, Vilnius, Lithuania) treatment at 37 °C for 30 min. RNA quantity and integrity were primarily evaluated by agarose gel electrophoresis (see Figure S1). Additionally, RNA quantity and quality was assessed by MacroGene Inc., Seoul, Korea (<https://dna.macrogen.com/>) using the Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer prior proceeding to RNA-Seq. The RNA integrity number (RIN) of total RNA was greater than 8.0.

#### 4.8. RNA Sequencing and Data Analysis

cDNA library construction, quality control and sequencing were performed by MacroGene Inc., South Korea (<https://dna.macrogen.com/>). The cDNA libraries were constructed and sequenced for three independent biological replicates with 100 bp paired-end reads on the Illumina HiSeq 2000 platform (MacroGen Inc., Seoul, Korea). All resulting RNA-Seq data have been made available in GEO, with accession number GSE100290.

Prior to assembly, reads were subjected to trimming and filtering using CLC Genomics Workbench v. 8.5 (CLC Inc., Aarhus, Denmark). Low quality reads were discarded (quality limit of 0.01). We also removed: ambiguous nucleotides (ambiguities 1), adapter sequences and sequences less than 50 nucleotides in length. Reads were mapped to the *S. cerevisiae* S288C reference genome (NCBI reference sequence: GCF\_000146045.2\_R64\_genomic\_20170309) with the following alignment parameters: maximum number of mismatches 2; minimum length fraction 0.9; minimum identity within the mapped sequence 0.95; maximum number of best-scoring hits for a read 30. The expression values for each transcript were calculated as Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads (RPKM). The "Exact Test" for two-group comparisons was implemented and the Empirical analysis of DGE tool was applied. Transcripts with expression fold change  $\geq 1.5$  and an FDR-corrected  $p$ -value  $\leq 0.05$  (false-discovery rate of 5%) were chosen for further analyses.

Specific gene functions and biological pathways were annotated according to SGD (Saccharomyces Genome Database, <http://www.yeastgenome.org>). Differentially expressed transcripts were

subjected to term enrichment analysis using GOTermFinder (<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>) [52]. Significance *p* values were calculated with the hypergeometric test, using the Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) correction for the enrichment of each GO term. Fold enrichment (F.E.) was determined by dividing the frequency of specific gene cluster to the total frequency for each GO term.

The protein network was created by STRING v. 10 [53] and imported in Cytoscape v. 3.5.1 [54,55]. Associations between proteins are represented by thick lines based on chosen confidence score (0.5, medium; 0.7, high; or 0.9, highest confidence level). The Venn diagram was created manually, comparing set of genes differently expressed in M437 [L–M–] and M437 [L+M–] cells as well as in A364AXS7 K1 killer strain and virus-cured cells [36]. Amino acids metabolic pathways were drawn using as a reference the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database [56].

#### 4.9. qRT-PCR Analysis

Quantitative PCRs for *FYV7*, *ARO10* and *TAF10* genes were performed using Luminaris HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Fisher, Vilnius, Lithuania), and the protocol according to the manufacturer's instructions. The following primer pairs were used: *TAF10* (5'-CCTATCATTCCCGATGCAGT-3' and 5'-AGTCTCGCCTGACTGTTGT-3'), *ARO10* (5'-CCTGGTGATGTTGTCGTTT-3' and 5'-TGA GCGTTTGAGTGGTCTTG-3'), *FYV7* (5'-GGGTACAGCCAAGCAAATC-3' and 5'-ATTGCCCT GGCTTCCTTAAT-3'). All measurements were taken in triplicates. The expression ratios were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [57].

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/2072-6651/9/8/233/s1](http://www.mdpi.com/2072-6651/9/8/233/s1). Figure S1: Quality control of RNA extraction and elimination of L-A-Ius and M-2 viral dsRNA from independently isolated clones, Figure S2: qRT-PCR validation of *FYV7* and *ARO10* expression compared to the RNA-Seq values for [L+M–] and [L+M+] cells, Figure S3. Fragment of amino acid metabolism pathways. Pathways constructed according to KEGG database [56], Table S1: The list of differentially expressed genes in response to the loss of either M-2 dsRNA or both L-A-Ius and M-2 dsRNA viruses, Table S2: GO terms in biological process for genes with altered expression level in response to elimination of viral RNAs, Table S3: GO terms in molecular functions for genes induced or repressed in host cells with eliminated viral RNAs, Table S4: GO terms in cellular localization of genes induced or repressed in host cells with eliminated viral RNAs.

**Acknowledgments:** This study was supported by a grant from the Lithuanian Research Council (No. SIT-7/2015).

**Author Contributions:** E.S. and S.S. conceived and designed the experiments; J.L., B.R., A.K. and L.A. performed the experiments; J.L., B.R. and E.S. analyzed the data; J.L. and A.B. performed bioinformatic analysis; E.S. and V.Y. contributed to analysis tools; B.R., E.S., S.S. and V.Y. wrote the paper.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

## References

- Ghabrial, S.A. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes* **1998**, *16*, 119–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wickner, R.B. Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, *46*, 347–375. [[CrossRef](#)]
- Wickner, R.B. Prions and RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **1996**, *30*, 109–139. [[CrossRef](#)]
- Liu, H.; Fu, Y.; Jiang, D.; Li, G.; Xie, J.; Cheng, J.; Peng, Y.; Ghabrial, S.A.; Yi, X. Widespread horizontal gene transfer from double-stranded RNA viruses to eukaryotic nuclear genomes. *J. Virol.* **2010**, *84*, 11876–11887. [[CrossRef](#)]
- Ahn, I.-P.; Lee, Y.-H. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2001**, *14*, 496–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Xie, J.; Jiang, D. New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2014**, *52*, 45–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Wickner, R.B. Double-stranded RNA replication in yeast: The killer system. *Ann. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 373–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Varga, J.; Kevei, F.; Vagvolgyi, C.; Vriesema, A.; Croft, J.H. Double-stranded RNA mycoviruses in section Nigri of the *Aspergillus* genus. *Can. J. Microbiol.* **1994**, *40*, 325–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Magliani, W.; Conti, S.; Gerloni, M.; Bertolotti, D.; Polonelli, L. Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* **1997**, *10*, 369–400. [[PubMed](#)]
10. Schmitt, M.J.; Tipper, D.J. K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10*, 4807–4815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Rodriguez-Cousino, N.; Gomez, P.; Esteban, R. L-A-lus, a new variant of the L-A totivirus found in wine yeasts with Klus killer toxin-encoding Mlus double-stranded RNA: Possible role of killer toxin-encoding satellite RNAs in the evolution of their helper viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 4661–4674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bevan, E.A.; Herring, A.J.; Mitchell, D.J. Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the “killer” character. *Nature* **1973**, *245*, 81–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Starmer, W.T.; Ganter, P.F.; Aberdeen, V.; Lachance, M.A.; Phaff, H.J. The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can. J. Microbiol.* **1987**, *33*, 783–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rowley, P.A. The frenemies within: Viruses, retrotransposons, and plasmids that naturally infect *Saccharomyces* yeasts. *Yeast* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Palpacelli, V.; Ciani, M.; Rosini, G. Activity of different “killer” yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiol. Lett.* **1991**, *68*, 75–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Salek, A.; Schnettler, R.; Zimmermann, U. Stably inherited killer activity in industrial yeast strains obtained by electrotransformation. *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, *75*, 103–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Javadekar, V.S.; SivaRaman, H.; Gokhale, D.V. Industrial yeast strain improvement: Construction of a highly flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *15*, 94–102. [[CrossRef](#)]
18. Buzzini, P.; Martini, A. Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 3362–3364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Vadkertiova, R.; Slavikova, E. Killer activity of yeasts isolated from natural environments against some medically important *Candida* species. *Pol. J. Microbiol.* **2007**, *56*, 39–43. [[PubMed](#)]
20. Banjara, N.; Nickerson, K.W.; Suhr, M.J.; Hallen-Adams, H.E. Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *222*, 23–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Pagé, N.; Gérard-Vincent, M.; Ménard, P.; Beaulieu, M.; Azuma, M.; Dijkgraaf, G.J.P.; Li, H.; Marcoux, J.; Nguyen, T.; Dowse, T.; Sdicu, A.M.; Bussey, H. A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics* **2003**, *163*, 875–894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Carroll, S.Y.; Stirling, P.C.; Stimpson, H.E.M.; Giebelmann, E.; Schmitt, M.J.; Drubin, D.G. A Yeast killer toxin screen provides insights into A/B toxin entry, trafficking, and killing mechanisms. *Dev. Cell* **2009**, *17*, 552–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Serviène, E.; Luksa, J.; Orentaite, I.; Lafontaine, D.L.J.; Urbonavicius, J. Screening the budding yeast genome reveals unique factors affecting K2 toxin susceptibility. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pieczynska, M.D.; de Visser, J.A.G.M.; Korona, R. Incidence of symbiotic dsRNA “killer” viruses in wild and domesticated yeast. *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 856–859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pieczynska, M.D.; Korona, R.; De Visser, J.A.G.M. Experimental tests of host-virus coevolution in natural killer yeast strains. *J. Evol. Biol.* **2017**, *30*, 773–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Veses-Garcia, M.; Liu, X.; Rigden, D.J.; Kenny, J.G.; McCarthy, A.J.; Allison, H.E. Transcriptomic analysis of Shiga-toxic bacteriophage carriage reveals a profound regulatory effect on acid resistance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 8118–8125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lin, X.; Ding, H.; Zeng, Q. Transcriptomic response during phage infection of a marine cyanobacterium under phosphorus-limited conditions. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 450–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hillung, J.; Garcia-Garcia, F.; Dopazo, J.; Cuevas, J.M.; Elena, S.F. The transcriptomics of an experimentally evolved plant-virus interaction. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Castorena, K.M.; Stapleford, K.A.; Miller, D.J. Complementary transcriptomic, lipidomic, and targeted functional genetic analyses in cultured *Drosophila* cells highlight the role of glycerophospholipid metabolism in Flock House virus RNA replication. *BMC Genom.* **2010**, *11*, 183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Martinez-Rubio, L.; Evensen, O.; Krasnov, A.; Jorgensen, S.M.; Wadsworth, S.; Ruohonen, K.; Vecino, J.L.G.; Tocher, D.R. Effects of functional feeds on the lipid composition, transcriptomic responses and pathology in heart of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) before and after experimental challenge with Piscine Myocarditis Virus (PMCV). *BMC Genom.* **2014**, *15*, 462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Yen, J.Y.; Garamszegi, S.; Geisbert, J.B.; Rubins, K.H.; Geisbert, T.W.; Honko, A.; Xia, Y.; Connor, J.H.; Hensley, L.E. Therapeutics of Ebola hemorrhagic fever: Whole-genome transcriptional analysis of successful disease mitigation. *J. Infect. Dis.* **2011**, *204* (Suppl. 3), S1043–S1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Tsuge, M.; Oka, T.; Yamashita, N.; Saito, Y.; Fujii, Y.; Nagaoka, Y.; Yashiro, M.; Tsukahara, H.; Morishima, T. Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis. *J. Neurovirol.* **2014**, *20*, 73–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Allen, T.D.; Nuss, D.L. Specific and common alterations in host gene transcript accumulation following infection of the chestnut blight fungus by mild and severe hypoviruses. *J. Virol.* **2004**, *78*, 4145–4155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cho, W.K.; Yu, J.; Lee, K.-M.; Son, M.; Min, K.; Lee, Y.-W.; Kim, K.-H. Genome-wide expression profiling shows transcriptional reprogramming in *Fusarium graminearum* by *Fusarium graminearum* virus 1-DK21 infection. *BMC Genom.* **2012**, *13*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Eusebio-Cope, A.; Sun, L.; Tanaka, T.; Chiba, S.; Kasahara, S.; Suzuki, N. The chestnut blight fungus for studies on virus/host and virus/virus interactions: From a natural to a model host. *Virology* **2015**, *477*, 164–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. McBride, R.C.; Boucher, N.; Park, D.S.; Turner, P.E.; Townsend, J.P. Yeast response to LA virus indicates coadapted global gene expression during mycoviral infection. *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 162–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Milewski, S.; Gabriel, I.; Olchow, J. Enzymes of UDP-GlcNAc biosynthesis in yeast. *Yeast* **2006**, *23*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Wickner, R.B.; Leibowitz, M.J. Chromosomal genes essential for replication of a double-stranded RNA plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: The killer character of yeast. *J. Mol. Biol.* **1976**, *105*, 427–443. [[CrossRef](#)]
39. Toh-E, A.; Wickner, R.B. “Superkiller” mutations suppress chromosomal mutations affecting double-stranded RNA killer plasmid replication in *saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 527–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Icho, T.; Wickner, R.B. The MAK11 protein is essential for cell growth and replication of M double-stranded RNA and is apparently a membrane-associated protein. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1467–1475. [[PubMed](#)]
41. Coelho, P.S. R.; Bryan, A.C.; Kumar, A.; Shadel, G.S.; Snyder, M. A novel mitochondrial protein, Tar1p, is encoded on the antisense strand of the nuclear 25S rDNA. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2755–2760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Wang, Z.; Gerstein, M.; Snyder, M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 57–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ellahi, A.; Thurtle, D.M.; Rine, J. The chromatin and transcriptional landscape of native *Saccharomyces cerevisiae* telomeres and subtelomeric domains. *Genetics* **2015**, *200*, 505–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bendjilali, N.; MacLeon, S.; Kalra, G.; Willis, S.D.; Hossian, A.K. M.N.; Avery, E.; Wojtowicz, O.; Hickman, M.J. Time-course analysis of gene expression during the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic response. *G3 Genes Genomes Genet.* **2017**, *7*, 221–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ball, S.G.; Tirtiaux, C.; Wickner, R.B. Genetic control of L-A and L-(BC) dsRNA copy number in killer systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **1984**, *107*, 199–217. [[PubMed](#)]
46. Ohtake, Y.; Wickner, R.B. Yeast virus propagation depends critically on free 60S ribosomal subunit concentration. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 2772–2781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Naumova, G.I.; Naumova, T.I. Comparative genetics of yeasts. XIII, Comparative study of *Saccharomycetes*-killers from different collections. *Genetika* **1973**, *9*, 140–145. (In Russian) [[PubMed](#)]
48. Citavicius, D.; Inge-Vectomov, S.G. *Saccharomyces cerevisiae* multiple mutants: I. construction and general characterization. *Genetika (Moscow)* **1972**, *1*, 95–102. (In Russian)
49. Aitmanaitė, L.; Konovalovas, A.; Servienė, E.; Serva, S. Healing yeast from L-A virus, unpublished work.

50. Gulbiniene, G.; Kondratiene, L.; Jokantaite, T.; Serviene, E.; Melvydas, V.; Petkuniene, G. Occurrence of killer yeast strains in fruit and berry wine yeast populations. *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 159–163.
51. Drinnenberg, I.A.; Fink, G.R.; Bartel, D.P. Compatibility with killer explains the rise of RNAi-deficient fungi. *Science* **2011**, *333*, 1592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Boyle, E.I.; Weng, S.; Gollub, J.; Jin, H.; Botstein, D.; Cherry, J.M.; Sherlock, G. GO: TermFinder open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 3710–3715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Szklarczyk, D.; Franceschini, A.; Wyder, S.; Forslund, K.; Heller, D.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Roth, A.; Santos, A.; Tsafou, K.P.; et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D447–D452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Killcoyne, S.; Carter, G.W.; Smith, J.; Boyle, J. Cytoscape: A community-based framework for network modeling. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *563*, 219–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kanehisa, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M.; Sato, Y.; Morishima, K. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D353–D361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Wong, M.L.; Medrano, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **2005**, *39*, 75–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2 publikacija / 2<sup>nd</sup> publication

**Specificity Determination in *Saccharomyces cerevisiae* Killer Virus Systems**

**L. Aitmanaitė**, A. Konovalovas, P. Medvedevas, S. Servienė, S. Serva

*Microorganisms*, **9(2)**, **236**, 1-14 (2021)

DOI: [10.3390/microorganisms9020236](https://doi.org/10.3390/microorganisms9020236)



Article

# Specificity Determination in *Saccharomyces cerevisiae* Killer Virus Systems

Lina Aitmanaitė<sup>1</sup>, Aleksandras Konovalovas<sup>1</sup>, Povilas Medvedevas<sup>1</sup>, Elena Servienė<sup>2</sup> and Saulius Serva<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Nucleic Acid Biochemistry, Institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University, 10257 Vilnius, Lithuania; lina.aitmanaitė@gf.vu.lt (L.A.); aleksandras.konovalovas@gf.vu.lt (A.K.); povilas.medvedevas@gmc.stud.vu.lt (P.M.)

<sup>2</sup> Laboratory of Genetics, Nature Research Centre, 08412 Vilnius, Lithuania; elena.serviene@gamtc.lt

\* Correspondence: saulius.serva@gf.vu.lt; Tel.: +370-5239-8244

**Abstract:** *Saccharomyces* yeasts are widely distributed in the environment and microbiota of higher organisms. The killer phenotype of yeast, encoded by double-stranded RNA (dsRNA) virus systems, is a valuable trait for host survival. The mutual relationship between the different yet clearly defined LA and M virus pairs suggests complex fitting context. To define the basis of this compatibility, we established a system devoted to challenging inherent yeast viruses using viral proteins expressed in trans. Virus exclusion by abridged capsid proteins was found to be complete and nonspecific, indicating the presence of generic mechanisms of *Totiviridae* maintenance in yeast cells. Indications of specificity in both the exclusion of LA viruses and the maintenance of M viruses by viral capsid proteins expressed in trans were observed. This precise specificity was further established by demonstrating the importance of the satellite virus in the maintenance of LA virus, suggesting the selfish behavior of M dsRNA.

**Keywords:** *Saccharomyces* yeast; *Totiviridae*; dsRNA; LA virus; killer virus



**Citation:** Aitmanaitė, L.; Konovalovas, A.; Medvedevas, P.; Servienė, E.; Serva, S. Specificity Determination in *Saccharomyces cerevisiae* Killer Virus Systems. *Microorganisms* **2021**, *9*, 236. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020236>

Received: 1 December 2020

Accepted: 21 January 2021

Published: 23 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

*Saccharomyces* yeasts are widely distributed in the environment and microbiota of higher organisms, including humans [1,2]. Historically, yeasts were employed in fermentation industries, and current research has made yeast a profitable host for the production of biotechnologically and pharmaceutically relevant proteins [3]. The biocidal property of yeast—known as its killer phenotype—was found to be a highly desirable trait in industrial strains for the restraining of spoilage microorganisms and preservation of the quality of food products and beverages [4]. Yeast's killer trait is often determined by two viruses, LA, and M, ensuring killer toxin production and maintenance in a host cell. The frequency of killer M viruses among *S. cerevisiae* strains is estimated to be relatively low [5], whereas the LA virus is prevalent in various wild, industrial and laboratory yeasts [6].

The double-stranded RNA (dsRNA) genome of the LA virus encodes the coat protein Gag and RNA-dependent RNA polymerase GagPol. These two proteins assemble into capsids, hosting the replication and transcription of LA itself and satellite M virus to provide a killer phenotype to the host cell [7]. The extracellular phase of LA virus is unknown [8], and the presence of LA alone appears to be symptomless in yeast cells [9]. The amount of 4.6 kbp size LA dsRNA was found comparable to that of cellular rRNA [10], making a significant contribution to the total RNA content. The killer virus M hijacks LA capsids for its maintenance, encoding preprotoxin targeting virus-free cells after the maturation and secretion [7]. This mutual relationship makes LA and M dsRNA viruses functionally linked in precise synergy with the host cell.

Structurally, LA viruses comprise a uniform group featuring a short 5' untranslated region, followed by a two partially overlapping ORFs and a 3' untranslated region. The capsid protein Gag is encoded on the 5' part of the genome, whereas 101 nt from its CDS

end, there is a robust secondary structure, a region resulting in a  $-1$  frameshift of the ribosome and synthesis of the fusion protein GagPol [11,12]. M dsRNA features the short 5' untranslated region followed by ORF of K toxin, synthesized in preprotoxin form, with a 3' polyA stretch of several hundred nucleotides and a 3' untranslated region, hosting encapsidation and replication signals [8]. By far the best explored K1 toxin binds to yeast cell envelope glucans, as does the K2 toxin [13–15], and both of them form pores in the cytoplasmic membrane of sensitive cells. K28 penetrates into the cell and further into the nucleus to block DNA synthesis [16], whereas the Klus' mode of action remains to be uncovered.

Several *Totiviridae* LA variants have been described in *Saccharomyces cerevisiae* [17–19]. Despite the average 74% nucleotide sequence identity shared by LA viruses, their compatibility with sequence-unrelated M satellites is complex [18,19]. Currently, four LA family viruses, namely LA-1, LA-2, LA-lus and LA-28, have been described to associate with respective M1, M2, Mlus and M28 satellites, although the number of following pairs was found to be larger than four [17,20]. Among the wild-type *S. cerevisiae* strains, LA-1 was found to exclusively maintain the M1 satellite, whereas LA-2 maintains M2 and LA-28 maintains the M28 satellite. LA-lus was reported to maintain either Mlus or M2 in wild-type strains [20]. The association of distinct LA viruses with different M viruses is interpreted to stem from coevolution, driven by the toxin encoded by the satellite virus [17]. *Totiviridae* viruses have moderate impact on host gene expression, yet the transcriptional response to viral dsRNA elimination is broad, supporting the idea of long-lasting coadaptation [20,21]. The importance of the host background was revealed by different killer phenotypes of distinct strains bearing dsRNA viruses of the same type, which is also explained by a virus and host coevolution in different populations [5]. Specific *S. cerevisiae* host cell lipidomic and transcriptomic adaptations were found to occur in cells producing the K1 killer toxin [22]. The LA virus appears to be less demanding than the satellite M, since only a few host genes were described as crucial for LA maintenance [8]. In addition, LA tends to be more resilient to elimination than M, suggesting a more vital interconnection with the host [8].

In this study, we took advantage of the current repertoire of *Saccharomyces cerevisiae* killer systems to address the foundations of the specificity within the complete range of LA and M virus pairs. For this, we cloned the representatives of all known *Saccharomyces cerevisiae* LA viruses. A plasmid-based system, devoted to challenging the inherent yeast dsRNA viruses in trans expressing viral proteins from either the same or related viruses, was established. Expression of the abridged capsid protein led to complete and nonspecific virus exclusion within the LA range, pointing to generic mechanisms of *Totiviridae* maintenance in yeast cells. Indications of specificity in both the exclusion of LA viruses and the maintenance of M viruses by viral capsid proteins expressed in trans were observed. The concurrent mode of M1 dsRNA in the maintenance of LA-1 in a wild-type strain was uncovered, suggesting selfish behavior by M dsRNA, with a yet-unknown mechanism.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Strains and Growth Medium

Yeast strains used in this study are summarized in Table 1. Yeast cells were grown in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose; for plates, 2% of agar was added). For the selection of yeast transformants, YPD medium was supplemented with different G418 concentrations (K7—400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Rom K-100/ SRB-15-4/ M437—200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; K28—100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). For killer assays, MBA medium was used (0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 1.05% citric acid, 3.53% disodium phosphate, 2% glucose, 2% agar, 0.003% methylene blue). The medium was adjusted to pH 4.2. Yeast cells for the purification of viral particles were grown in SD medium (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose). According to need, uracil (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and amino acids L-leucine (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), L-methionine (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and L-histidine (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were added.



**Table 1.** Yeast strains used in this study.

Strain	Species	Genotype	Reference
BY4741	<i>S. cerevisiae</i>	MATa, <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> , ScV-LA-1	[23]
K7	<i>S. cerevisiae</i>	MATa, <i>arg9</i> , [kil-K1], ScV-LA-1, M-1	[24]
K7 M1_null	<i>S. cerevisiae</i>	MATa, <i>arg9</i> , [kil-K0], ScV-LA-1, M1-0	This study
Rom K-100	<i>S. cerevisiae</i>	Wt, HM/HM, [kil-K2], ScV-LA-2, M-2	[25]
M437	<i>S. cerevisiae</i>	Wt, HM/HM, [kil-K2], ScV-LA-lus, M-2	[26]
SRB-15-4	<i>S. cerevisiae</i>	Wt, [kil-Mlus], ScV-LA-lus, M-lus	[19]
K28	<i>S. paradoxus</i>	Wt, [kil-K28], SpV-LA-28, M-28	[27]
a'1	<i>S. cerevisiae</i>	MATα, <i>leu2-2</i> , [Kil-0]	[28]

## 2.2. Protein Expression Vectors

Expression vectors were constructed following the standard cloning methods. The pYAK-3 plasmid was used as a starting construct [29]. This includes the replication origin of *S. cerevisiae* 2 μm plasmid and the URA3 gene for selection. The KanMX gene from pYM14 (Scientific Research and Development GmbH, Oberursel, Germany) was cloned into pYAK-3, resulting in the pYAK-G vector. The wild-type LA-1 Gag protein expression vector (LA1-Gag-wt) was constructed by cloning the Gag coding sequence (accession no. J04692) to the pYAK-G plasmid under strong constitutive promoter TEF1. Expression vectors of truncated LA-1, LA-2 (accession no. KC677754), LA-lus (accession no. JN819511) and LA-28 Gag (accession no. KU845301) proteins were constructed by cloning partial Gag proteins coding sequences (LA1-Gag-delta and LAlus-Gag-delta – 1-1923 nt; LA2-Gag-delta and LA28-Gag-delta – 1-1932 nt) to the pYAK-G plasmid. The truncated Gag protein's coding sequences were fused to FLAG-tag, linker GSGGS and HIS-6 coding sequences. To construct the wild-type viral protein expression vectors, the coding sequences of LA-1 (LA1-GagPol), LA-lus (LAlus-GagPol), and LA-28 (LA28-GagPol) viral proteins were cloned to the pYAK-G plasmid. Correct coding sequences of all constructed vectors were confirmed by sequencing.

## 2.3. Yeast Transformation

Yeasts were transformed using the lithium acetate and polyethylene glycol method [30], with adjustments. The yeast strain was inoculated into 4 mL YPD and grown for 16–20 h at 30 °C on a shaker at 200 rpm. Five hundred microliters of resulting culture were transferred to 50 mL of fresh YPD medium and incubated at 30 °C on a shaker at 200 rpm until it reached OD<sub>600</sub> 0.7. Yeast cells were collected by 5 min centrifugation at 1000× g and washed with 2 mL of sterile water. Collected cells were resuspended in 300 μL 1xLiAc/1xTE buffer (100 mM LiAc pH 7.5, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA). For each transformation, 100 μL of competent yeast cells were mixed with 0.5–1 μg of plasmid DNA and 600 μL of 1xLiAc/1xTE/40% PEG buffer (100 mM LiAc pH 7.5, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 40% PEG 4000). The resulting mixture was incubated for 30 min at 30 °C on a shaker at 200 rpm. Before heat shock, 70 μL of DMSO was added. Heat shock was carried out by heating a sample for 15 min at 42 °C. Cells were collected by brief centrifugation of 10 s at 14,000× g, resuspended in 1 mL of YPD medium and incubated for 2 h at 30 °C on a shaker at 200 rpm to allow expression of the resistance gene. After the incubation, cells were collected by brief centrifugation and plated on YPD plates supplemented with G418 for selection.

## 2.4. Total RNA and dsRNA Extraction

Total RNA and dsRNA were extracted as described previously [20].

## 2.5. Purification of Viral Particles

Yeast strain BY4741 transformed by expression vectors of LA-1 abridged (LA1-Gag-delta) and wild-type (LA1-Gag-wt) Gag proteins were grown in SD medium overnight at 30 °C. Cells were harvested by centrifugation at 6000× g for 10 min at 4 °C, resuspended

in 0.1 part of initial volume of sterile water and pelleted by centrifugation under the same conditions. Yeast were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF), 5 mL buffer for 1 g of yeast and ground with glass beads, then centrifugated at  $12,000\times g$  for 10 min at 4 °C. The collected supernatant was loaded onto a chilled 45% sucrose cushion in centrifuge tubes and ultracentrifuged for 16 h at  $70,000\times g$  at 4 °C (Kontron TST 28.38 rotor and Sanyo MSE MS60 ultracentrifuge). The supernatant was discarded, and the pellet resuspended in 500 µL lysis buffer without PMSF for further analysis.

#### 2.6. TEM Analysis

Electron microscopy was performed using a Morgagni 268 (D) transmission electron microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA). First, 0.2 µg of protein of interest was poured on a copper grid coated with carbon. After 1 min, the grids were dried with filter paper, washed with water, and dried again using filter paper. A 2% uranyl acetate solution was applied to the grid for 2 min. The grid was dried with filter paper and additionally dried for 5 min in the air.

#### 2.7. Elimination of M1 Virus from K7 Strain

M1 virus elimination from the K7 yeast strain was performed by streaking on YPD agar plates and growing at 37 °C for two days. The individual colonies were streaked on new YPD agar plates and grown at 30 °C for two more days. For killer phenotype examination, the resulting colonies were transferred on MBA plates with an overlay of  $\alpha$ 1 K1-sensitive strain and grown at 20 °C for three days. Colonies not exhibiting the killer phenotype (with absent halos) were selected for total RNA and subsequent dsRNA purification. The elimination of the M1 virus was confirmed by analysis of dsRNA by agarose gel electrophoresis and two-step RT-PCR using primers specific for M1 coding sequence (M1-dir – 5'-GAAAAATAAAGAAATGACGAAGCC-3'; M1-rev – 5'-CCCTAGTGGCCTGTGTCAC-3').

#### 2.8. Two-Step RT-PCR on Total RNA from Strains BY4741, K7 and M437

To confirm the LA-1 and LA-lus virus elimination from BY4741, K7 and M437 strains, two-step PCR was performed. First-strand cDNA synthesis was carried out with a SensiFast cDNA Synthesis Kit (Bioline, Memphis, TN, USA), following the manufacturer's recommendations. To identify specific LA-1 or LA-lus cDNA sequences, PCR was performed with a Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). Primers used for PCR: for LA-1 sequence-specific—LA 1.F – 5'-GATGTTCTCACTACAAG-3', LA-1.R – 5'-GCGTCCATTATTCTTACTG-3'; for LA-lus sequence-specific—LA-lus.F – 5'-GATGCATAGAATCAATG-3', LA-lus.R – 5'-GTAGTGCTCTTAAAGG-3'.

#### 2.9. Densitometric Analysis

Densitometric analysis was performed to quantify the relative amount of LA and M virus dsRNA genomes. The gels of total RNA or dsRNA electrophoresis were analyzed using ImageJ software, version 1.52a (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The dsRNA amount of LA and M virus for each sample was normalized by 18S rRNA and compared to the values of control samples. For each yeast transformation, three biological replicates with three technical replicates per sample (nine in total) were used.

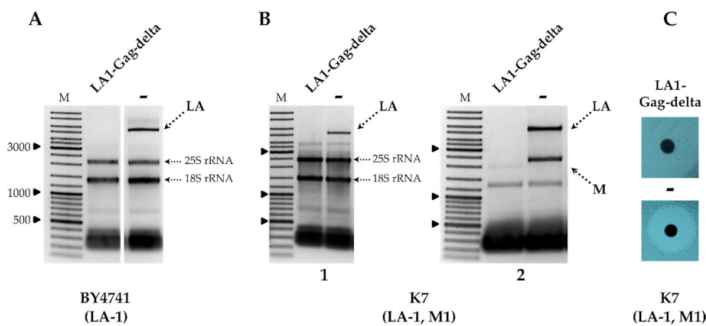
#### 2.10. Statistical Analysis

Statistical analysis was accomplished by R software, version R-3.6.2 (University of Auckland, Auckland, New Zealand). The values obtained from the densitometric analysis were checked for normality using the Shapiro–Wilk test. To examine if values between the control sample and specific transformants differed significantly, we applied Student's *t*-test. *p*-values below 0.05 were considered statistically significant (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). Box plots were drawn using R package ggplot2.

### 3. Results

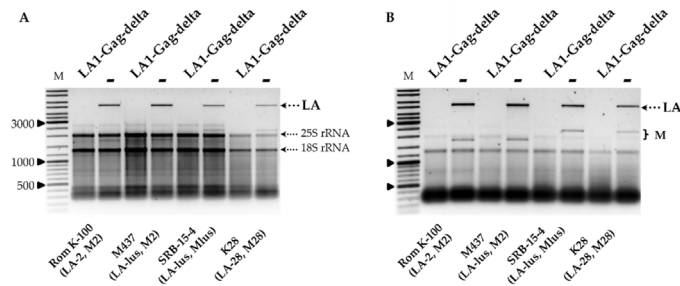
To address the compatibility of LA and M viruses, we cloned cDNAs of complete LA dsRNA genomes present in different killer strains and LA-1 dsRNA, present in laboratory strain BY4741 (Table 1). LA dsRNAs were first isolated by phenol treatment, gel-purified and used as a substrate for primer ligation, subsequent reverse transcription and cDNA amplification [19]. LA-1 capsid protein Gag from the K7 strain was selected to prepare its truncated version by replacing the 39 C-terminal amino acids with a 21-aa-long fragment including FLAG-tag, linker GSGGS and the His6 motif. The resulting LA1-Gag-delta was expressed under the control of a strong constitutive TEF1 promoter (Figure S1A). The virions' structure was verified using ultracentrifugation-based purification of capsid proteins in BY4741 cells with subsequent TEM analysis, which confirmed the production of capsids of the same size as for the LA-1 virus (Figure S1B).

Following the transformation of the BY4741 strain by plasmid encoding LA1-Gag-delta, a rapid loss of LA-1 viral dsRNA was observed using agarose gel electrophoresis analysis of total nucleic acids (Figure 1A) and confirmed using RT-PCR (Figure S2). LA-1 dsRNA remained intact in the same strain transformed by the cloning vector lacking LA1-Gag-delta CDS (Figure 1A and Figure S2). The loss of LA-1 was definitive— recovery of dsRNA is not observed after the loss of the plasmid coding for LA1-Gag-delta by growing the strain under nonselective conditions in YPD media (not shown).



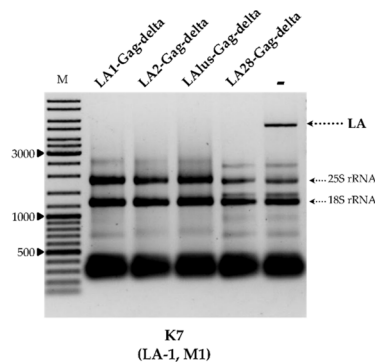
**Figure 1.** The impact of LA1-Gag-delta overexpression on the maintenance of LA and M dsRNAs. (A) Agarose gel electrophoresis of total RNA isolated from the BY4741 strain; LA1-Gag-delta is the sample of the strain transformed by truncated LA-1 Gag protein expression vector, — is the control sample. (B) Agarose gel electrophoresis of total RNA (1) and dsRNA (2) isolated from K7 strain transformants. (C) Killer phenotype assay of K7 yeast strain transformant. M column is the molecular size marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania); yeast strains with corresponding genotypes are indicated below the pictures.

Removal of LA-1 dsRNA also occurred in the K1 killer strain K7 (LA-1, M1), as demonstrated in Figure 1B, and was followed by the loss of the killer phenotype, as shown in Figure 1C. In order to address the specificity of the LA-1 exclusion, LA1-Gag-delta was introduced into the wild-type killer strains Rom K-100 (LA-2, M2), SRB-15-4 (LA-lus, Mlus), M437 (LA-lus, M2) and K28 (LA-28, M28). Electrophoretic analysis of total RNA and dsRNA fractions (Figure 2A,B) demonstrated the loss of the corresponding LA dsRNA fraction altogether with M dsRNA, indicating virtually complete clearance of all employed strains from the viral dsRNA genomes. The elimination of LA viruses from BY4741, K7 and M437 strains was verified using RT-PCR (Figure S2) and further confirmed by analysis of killer sensitivity of the resulting strains; expression of LA1-Gag-delta resulted in a loss of killing capacity for all killer strains (not shown).



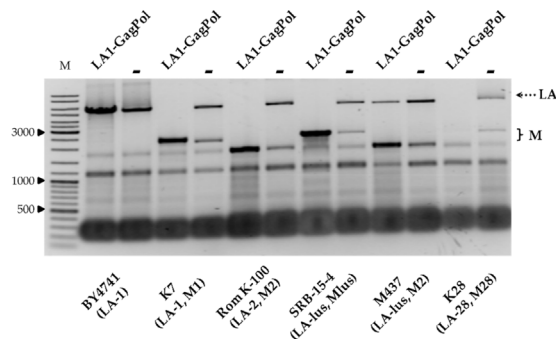
**Figure 2.** The impact of LA1-Gag-delta overexpression on the maintenance of LA and M dsRNAs in Rom K-100, SRB-15-4, M437 and K28 yeast strains. Agarose gel electrophoresis of total RNA (A) and dsRNA (B) isolated from respective yeast strain transformants; LA1-Gag-delta refers to samples transformed by truncated LA-1 Gag protein expression vector, – signifies control samples. M column is molecular size marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania); yeast strains with corresponding genotypes are indicated below the pictures.

To better understand the specificity of dsRNA exclusion, we prepared plasmids encoding the truncated capsid protein Gag originating from LA-2, LA-lus and LA-28 viruses. Given the uniform organization of known *Saccharomyces* spp. LA viruses, the most 5' CDS was employed. These constructs, and the expression vector used as a control, were introduced into strains BY4741, K7, Rom K-100, M437, SRB-15-4 and K28. The analysis of total RNA and dsRNA content confirmed the complete loss of both LA and M dsRNA fractions, corresponding to loss of the killer phenotype, in all transformed strains. Figure 3 illustrates the total RNA content of the K7 strain transformed by plasmids coding for LA1-Gag-delta, LA2-Gag-delta, LAlus-Gag-delta and LA28-Gag-delta, or an empty expression vector.



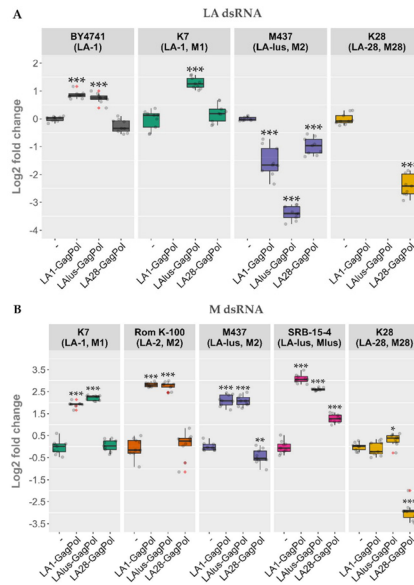
**Figure 3.** The impact of overexpression of truncated LA-1, LA-2, LA-lus and LA-28 Gag proteins on the maintenance of LA dsRNA in the K7 strain. Agarose gel electrophoresis of total RNA isolated from respective yeast transformants: LA1/LA2/LAlus/LA28-Gag-delta refers to samples transformed by truncated LA Gag protein expression vectors, – denotes the control sample. M column is molecular size marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania); yeast strain with corresponding genotype is indicated below the picture.

We next addressed the compatibility of the viral capsid proteins, encoded by the LA-1 virus from the K7 strain, with the inherent *Totiviridae* viruses from the wild-type killer strains. The vector encoding GagPol under the TEF1 promoter was used for transformation of strains BY4741, K7, Rom K-100, SRB-15-4, M437 and K28. Strains considered as controls were transformed by an empty expression vector, grown under the same conditions and processed in parallel. Notably, the amount of LA dsRNA increased in BY4741, lacking M dsRNA (Figure 4). In the killer strains, the amount of LA either diminished (as for M437) or entirely disappeared, as in the K7 and K28 strains. In contrast to LA, the amount of M dsRNA generally increased, with the exception of that from the K28 strain (Figure 4).



**Figure 4.** The impact of overexpression of LA-1 capsid proteins on the maintenance of LA and M dsRNAs in BY4741, K7, Rom K-100, SRB-15-4, M437 and K28 strains. Agarose gel electrophoresis of dsRNA isolated from respective yeast strain transformants; LA1-GagPol refers to samples transformed with LA-1 proteins expression vector, — denotes control samples. M column is molecular size marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania); yeast strains with corresponding genotypes are indicated below the pictures.

Following the same scheme, the expression plasmids bearing LA-lus and LA-28 complete coding sequences were prepared and were used to transform the BY4741 along with killer strains K7, Rom K-100, M437, SRB-15-4 and K28. LA dsRNA was quantified from the total nucleic acid preparation (Figure 5A), whereas the dsRNA fraction was used for M dsRNA quantification for a more precise analysis of dsRNA maintenance (Figure 5B). Three samples from three separate colonies (nine samples for every transformed strain) were used to obtain the nucleic acid preparations and were resolved in agarose gel. Amounts of viral dsRNA were quantified by densitometric analysis and normalized with respect to 18S rRNA. The expression of GagPols from different LA viruses in the BY4741 strain resulted in a different outcome as compared to the killer strains. The amount of LA-1 dsRNA in BY4741 was either increased (for LA1-GagPol and LA-lus-GagPol expression) or remained at the same level (LA28-GagPol) (Figure 5A). For killer strains, occasional exclusion of parental LA dsRNA was observed: K7 strain lost LA-1 following the expression of LA1-GagPol, K28 lost LA-28 following the expression of LA1-GagPol or LA-lus-GagPol. For other combinations, the trend towards diminishing the amount of the parental LA dsRNA was observed; the only exception was the K7 strain, of which the LA-1 dsRNA level was boosted 2.45-fold by the expression of LA-lus-GagPol. Of note, Rom K-100 and SRB-15-4 strains lost inherent LA completely under the expression of any of the employed GagPols—encoded by either LA-1, LA-lus or LA-28—and therefore are omitted from Figure 5A.

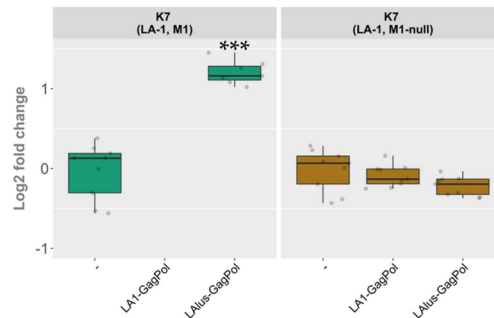


**Figure 5.** The impact of overexpression of LA-1, LA-lus, LA-28 capsid proteins on the maintenance of LA and M dsRNAs in BY4741, K7, Rom K-100, SRB-15-4, M437 and K28 strains. **(A)** Relative change in the amount of native LA virus dsRNA genome as compared to control samples (-). **(B)** Relative change in the amount of native M virus dsRNA genome as compared to control samples (-). Examined yeast strains are specified at the top, protein expression vectors used are listed below. Gray dots indicate individual samples, red dots denote outliers. Statistical significance was evaluated using Student's *t*-test. *p* values below 0.05 were considered statistically significant (\* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01, \*\*\* *p* < 0.001).

Contrary to generally diminished LA dsRNA levels, the expression of capsid proteins led to elevation of the M dsRNA level 3.8–8.5 fold (Figure 5B). LA1-GagPol and LA-lus-GagPol displayed the similar effect by boosting M dsRNA levels in K7, Rom, M437 and SRB-15-4 strains; they also had no effect in the K28 strain. In contrast, LA28-GagPol displayed only a moderate increase in the amount of the M-lus dsRNA in the SRB-15-4 strain, while it reduced the amount of the M dsRNA 7.8-fold in the parental K28 strain.

Plasmid-encoded LA1-GagPol and LA-lus-GagPol clearly differed in compatibility with the LA-1 present in the K7 strain, though both were able to maintain the M1 dsRNA at comparable rates (Figure 5, panels A and B). Therefore, we decided to address the role of the killer virus present in the K7 strain. We excluded M1 dsRNA from the K7 strain by growing the parental killer strain at 37 °C for several days in a row and selecting killing-negative colonies with LA-1 dsRNA present. The elimination of M1 dsRNA was confirmed using RT-PCR (Figure S3). The M1-cured (M1-null) strain obtained was transformed using LA1-GagPol or LA-lus-GagPol expression vectors and compared to the wild-type K7 strain transformed in parallel. Control strains were prepared by transformation with an empty expression vector. In contrast to the wild-type K7 strain, the K7 M1-null strain did not lose the LA-1 dsRNA in the presence of LA1-GagPol expressed in trans (Figure 6 and Figure S3). Moreover, in the K7 M1-null strain the level of LA-1 dsRNA did not increase upon the expression of LA-lus-GagPol, in sharp contrast to a 2.45-fold increase seen in the wild-type

K7 strain. Strikingly, the expression of this construct in the K7 M1-null strain had virtually the same effect as the expression of LA1-GagPol or the presence of the empty expression vector (Figure 6).



**Figure 6.** The role of M1 dsRNA in maintenance of the LA-1 virus following the overexpression of LA1-GagPol and LAUs-GagPol proteins. Relative change in the amount of LA dsRNA compared to control samples is depicted (-). Examined yeast strains are specified at the top; protein expression vectors are listed below. Gray dots correspond to individual samples. Statistical significance was evaluated using Student's *t*-test. *P* values below 0.05 were considered statistically significant (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ).

#### 4. Discussion

*Saccharomyces cerevisiae* dsRNA LA viruses comprise a group of viruses highly similar by sequence. In biocidal, or killer strains, they are responsible for maintenance of several unrelated satellite M viruses. Killer strains have been found to display a particular connection between LA and M dsRNAs, interpreted as “specificity” between the helper and satellite viruses, respectively. The determinants of such specificity remain unknown and are an object of ongoing debates. Recently, yeast exoribonuclease Xrn1 was proclaimed to undergo positive selection toward totiviruses to enable species-level specificity of antiviral defense mechanisms [31]; however, this finding was questioned by another study [32]. The idea of coevolution of *Totiviridae* LA and M viruses is based on the observation that pair members are functionally linked [18]. Meanwhile, the advances in virus discovery and particularly the use of high throughput sequencing have continued to uncover the range of new entries in the *Totiviridae* family [32,33]. The full landscape of diversity of the LA and M pairs is yet to be discovered. Analysis of individual pair members provides evidence that the former paradigm “one LA–one M satellite” is no longer valid [17,20]. At the same time, previously established and well-grounded coupling of virus pairs indicates the cellular mechanisms capable of ensuring certain viruses’ survival and outcompeting others, if provided in trans [17,18].

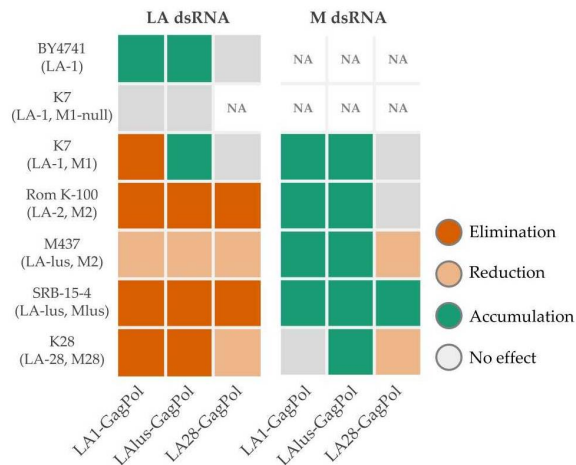
It is technically challenging to estimate the functional compatibility of the *Totiviridae* viruses in vivo. We chose to establish a straightforward and manageable plasmid-based system, where inherent viruses would be challenged by in trans expressed viral proteins of any available origin, whether it was the same or a related virus. This approach allowed us to exclude the impact of external cellular factors resulting from cytoplasm fusion, a classic method used to explore the viral compatibility [34,35], and also to take control of the dose of supplied proteins. For the first time, all entries in the current LA virus list identified in *S. cerevisiae* were addressed in order to uncover specificity determinants within the complete range of corresponding LA and M virus pairs. Representatives of genes from all previously known *S. cerevisiae* LA viruses were cloned under the strong constitutive TEF1 promoter, sequenced and expressed. We started by preparing a truncated version of the LA-1 virus capsid protein Gag from the well-described *S. cerevisiae* K7 strain. Previous research

reported by [36,37] uncovered the importance of the length of the deletion in the C terminus. Capsid proteins were shown to serve as an elimination factor for the inherent LA-1 virus when truncated by at least 77 amino acids [36]. The circumstances of the virus elimination, however, remained unclear. We observed the exclusion effect of LA-1 Gag, lacking the 39 C-terminal amino acids replaced by a multifunctional 21-aa fragment, and employed it to address the compatibility with other LA family viruses. The expression of this protein in a range of K1, K2, Klus type killer strains and *Saccharomyces paradoxus* K28 resulted in the exclusion of inherent LA and M viruses. Importantly, the same result was observed when similarly engineered Gags originating from LA-2, LA-lus and LA-28 viruses were used. The loss of LA dsRNA was definite, pointing to immediate and irreversible action since no recovery of LA dsRNA was observed after the loss of plasmids and the subsequent cultivation of resulting strain. When GAL1 or weaker ADH1 promoters were used to express the LA1-Gag-delta, various attenuation levels instead of exclusion of LA-1 dsRNA were observed (not shown). TEM investigation of strains expressing Gag-delta (under the control of the TEF1 promoter) confirmed the presence of viral particles resembling those formed by endogenous LA-1. Therefore, dsRNA virus exclusion by the Gag-delta protein appears to be universal and complete under saturating amounts of Gag-delta, presenting a convenient tool to prepare the dsRNA-free *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains under the nonmutagenic conditions [20]. The presence of a generic mechanism(s) of *Totiviridae* maintenance, approached by the involved system in a nonspecific fashion, is an obvious interpretation of the observed phenomenon. One apparent possibility for LA exclusion is the ablation of cellular proteins required for viral dsRNA transcription and/or replication by nonfunctional VLP structures formed by a plasmid-borne Gag-delta [36], along with removal of other compounds vital for virus maintenance. Further research on the host factors involved in this process is currently underway.

To investigate the compatibility of inherent dsRNA viruses with heterologous virions, we expressed the full-length GagPol ORFs encoded by LA-1, LA-lus and LA-28 viruses. As established for the LA-1 virus, ribosomal frameshift frequency ensures translation of ~98% of Gag and the remaining ~2% of the fusion GagPol protein [38]. This system allows investigation of the impact of heterologous native virions, providing the transcription and replication-competent environment for both LA and M viruses, addressed in both laboratory and wild-type strains. We observed the general trend for incompatibility of heterologous virions toward inherent LA dsRNA and the opposite—supporting—effect for a M dsRNA (Figure 7). The effects of GagPols from LA-1 and LA-lus on the maintenance of inherent *Totiviridae* viruses were essentially overlapping; notable exceptions are the accumulation of LA-1 dsRNA in the K7 strain, transformed by the LA-lus-GagPol expressing plasmid, and the minute change in the amount of M28 dsRNA in the K28 strain, transformed by the LA1-GagPol plasmid. In this context, LA28-GagPol triggers no effect on the presence of LA-1 dsRNA in the K7 strain and the reduction in the LA-28 dsRNA amount in the K28 strain. In strains transformed by the LA28-GagPol plasmid, the accumulation of M dsRNA is found in the SRB-15-4 strain only, with no effect on K7 and Rom K-100 strains and a reduction in the amount observed in M437 and K28 strains. Here, we likely encounter specificity-driven virus cross-fitting. As demonstrated, LA-lus dsRNA present in the M437 strain is generally more resilient to exclusion by any of the GagPols expressed in this strain, including its own LA-lus-GagPol. We attribute this effect to the “hybrid” combination of LA-lus and M2 dsRNA in the M437 strain, making virus relations shifted from the general fitting context. The differing sensitivity of LA-1 dsRNA in the K7 strain toward LA-1 and LA-lus GagPols expressed in trans attracted our attention and was explored further, see below for discussion. Although the maintenance of LA-28 dsRNA in the K28 strain generally follows an exclusion trend (except in case of LA28-GagPol overexpression), the amount of M28 dsRNA is either affected insignificantly (LA1 and LA-lus GagPol overexpression) or reduced (LA28-GagPol overexpression). We attribute the difference in M28 dsRNA maintenance to species origin—K28 was found to be *Saccharomyces paradoxus*, not the *S. cerevisiae* [20,32]. Therefore, GagPols originating



from different viruses appear to display particular specificity in excluding LA viruses and maintaining M viruses. This observation needs to be further verified by the analysis of new *Saccharomyces* killer systems, identified by next-generation sequencing [32,33].



**Figure 7.** Summary of the LA and M dsRNA amount alterations determined by overexpression of LA-1, LA-lus and LA-28 GagPols. Examined yeast strains specified at the left side of the panel, protein expression vectors listed below.

Prompted by the different outcomes of LA-1 and LA-lus GagPols in maintaining the inherent LA-1 dsRNA in the K7 strain, we addressed the role of the M1 killer virus. We prepared an M1-null strain using an established technique involving the cultivation of killer strain K7 at an elevated temperature (+37 °C) and observed the distinct role for M1 dsRNA. In the K7 M1-null strain, the expression of LA-1 and LA-lus GagPols results in essentially the same level of LA-1 dsRNA as in the control strain. In the presence of M1 dsRNA, LA-1 GagPol expels the original virus, while LA-lus GagPol boosts its synthesis 2.45-fold; the M1 dsRNA amount is boosted by 3.8 and 4.65-fold, respectively. The different maintaining capability of the K1 killer phenotype by LA-lus compared to LA-1 was demonstrated previously by [17]; the former is lost if both are combined in one cell. This out-competition was attributed to the relevance of native cellular content [17]; other mechanisms might be inferred as well. In particular, the expression of the plasmid-borne LA-1 GagPol is independent of the inherent LA machinery; therefore, M dsRNA maintenance becomes uncoupled from LA virus-provided capsids. Given the high level of heterogeneous GagPol expressed under the strong TEF1 promoter in the context of the high copy number 2-micron-based plasmid, competition for cellular resources between the inherent virus and an additional replication-competent structure might be significant, resulting in the rapid loss of selective pressure-free counterpart LA-1 dsRNA. Lack of LA-1 dsRNA exclusion in the K7 strain expressing the LA-lus GagPol suggests the presence of nonoverlapping host factor(s), critical for the maintenance of inherent LA virus, and precise specificity in factor selection, allowing the coexistence of both the LA-1 virus and LA-lus GagPol-originated capsids in the same cell. Our data contradicts certain observation of LA-1 and LA-lus incompatibility, as published before [17]. However, the involved strains and expression systems, particularly those for external GagPols, are markedly different for direct comparison. Of note, the stable coexistence of LA-1 and L-BC dsRNA in BY4741 strain and others is well documented [23,39].

We have observed the elevated level of the M1 dsRNA in both LA1-GagPol- and LA-lus-GagPol- expressing K7 strains. The loss of LA-1 dsRNA occurs only in the presence of M1 dsRNA; thus, the preference to replicate one substrate over another should be based on inherent features of sequence or structure. In particular, all killer viruses identified so far possess a polyA stretch, not found in the LA viruses, and constitute a possible selectivity factor, obviously present in plasmid-originated Gag and GagPol mRNAs. Of note is also an elevated level of both LA-1 and M1 dsRNAs in strain with an external LA-lus GagPol. Here we likely encounter a complicated interplay of specificity and availability aspects of host factors, involved in the dsRNA replication machinery. The ability of M1 dsRNA to restrict the copy number of the LA-1 virus has been documented [10]. Even if a lowered amount of LA dsRNA constitutes a price that the host cell pays to acquire the killer phenotype, it is not inevitable—as shown in the case of LA-lus GagPol overexpression in the K7 strain. The alleviation of the LA dsRNA amount determined by the presence of M dsRNA in a cell might result in the clearance of LA, once M gets over-replicated—the exact situation observed for most killer strains featuring heterogeneous virions. Further research is needed to define the relevant cellular factors and to understand the interactions between the helper LA and the satellite M viruses in the native environment. We suggest the presence of mechanisms, ensuring a balance between particular dsRNA replicating structures in the context of availability and specificity of host factors involved in the maintenance of totiviruses in yeast cells.

In summary, we established a plasmid-based system to challenge the inherent yeast dsRNA viruses using viral proteins provided in trans. The exclusion of the viruses by a truncated capsid protein was found to be complete and nonspecific within the tested LA range, pointing to the generic mechanisms of *Totiviridae* maintenance in yeasts. Indications of specificity in both the exclusion of LA viruses and the maintenance of M viruses by heterologous virions were observed. The concurrent role of M1 dsRNA in the maintenance of LA-1 suggests selfish behavior with a yet-unknown mechanism, possessing a precise specificity of action.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/2/236/s1>, Figure S1: Virions extracted from BY4741 (LA-1) strain, transformed by LA-1 wild-type (LA1-Gag-wt) and truncated (LA1-Gag-delta) Gag protein expression vectors in comparison to endogenous LA-1 virions. Figure S2: RT-PCR analysis of total RNA isolated from BY4741, K7 and M437 yeast strains. Figure S3: RT-PCR analysis of total RNA isolated from K7 yeast strains.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.S.; methodology, S.S., A.K. and L.A.; investigation, L.A. and P.M.; validation, S.S. and E.S.; writing—original draft preparation, S.S.; writing—review and editing, E.S., L.A. and A.K.; funding acquisition, S.S. and E.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Nash, A.K.; Auchtung, T.A.; Wong, M.C.; Smith, D.P.; Gesell, J.R.; Ross, M.C.; Stewart, C.J.; Metcalf, G.A.; Muzny, D.M.; Gibbs, R.A.; et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* **2017**, *5*, 153. [CrossRef] [PubMed]
- Sokol, H.; Leducq, V.; Aschard, H.; Pham, H.-P.; Jegou, S.; Landman, C.; Cohen, D.; Liguori, G.; Bourrier, A.; Nion-Larmurier, I.; et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* **2017**, *66*, 1039–1048. [CrossRef]
- Hensing, M.C.; Rouwenhorst, R.J.; Heijnen, J.J.; Van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1995**, *67*, 261–279. [CrossRef]
- Belda, I.; Ruiz, J.; Alonso, A.; Marquina, D.; Santos, A. The Biology of *Pichia membranifaciens* Killer Toxins. *Toxins* **2017**, *9*, 112. [CrossRef] [PubMed]
- Pieczynska, M.D.; De Visser, J.A.G.M.; Korona, R. Incidence of symbiotic dsRNA “killer” viruses in wild and domesticated yeast. *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 856–859. [CrossRef] [PubMed]
- Nakayashiki, T.; Kurtzman, C.P.; Edsles, H.K.; Wickner, R.B. Yeast prions [URE3] and [PSI<sup>+</sup>] are diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10575–10580. [CrossRef] [PubMed]
- Schmitt, M.J.; Breinig, F. Yeast viral killer toxins: Lethality and self-protection. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 212–221. [CrossRef]

8. Wickner, R.B. Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, *46*, 347–375. [[CrossRef](#)]
9. Ghabrial, S.A. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes* **1998**, *16*, 119–131. [[CrossRef](#)]
10. Ball, S.G.; Tirtiaux, C.; Wickner, R.B. Genetic Control of L-A and L-(Bc) Dsrna Copy Number in Killer Systems of SACCHAROMYCES CEREVISIAE. *Genetics* **1984**, *107*, 199–217. [[CrossRef](#)]
11. Icho, T.; Wickner, R.B. The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6716–6723. [[CrossRef](#)]
12. Fujimura, T.; Wickner, R.B. Gene overlap results in a viral protein having an RNA binding domain and a major coat protein domain. *Cell* **1988**, *55*, 663–671. [[CrossRef](#)]
13. Young, T.W.; Yagiu, M. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1978**, *44*, 59–77. [[CrossRef](#)]
14. Bussey, H. K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 2339–2343. [[CrossRef](#)]
15. Lukša, J.; Podoliankaitė, M.; Vepškaitė, I.; Strazdaitė-Zielienė, Ž.; Urbonavičius, J.; Servienė, E. Yeast  $\beta$ -1,6-glucan is a primary target for the *Saccharomyces cerevisiae* K2 toxin. *Eukaryot. Cell* **2015**, *14*, 406–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Becker, B.; Schmitt, M.J. Yeast Killer Toxin K28: Biology and Unique Strategy of Host Cell Intoxication and Killing. *Toxins* **2017**, *9*, 333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Rodríguez-Cousiño, N.; Gómez, P.; Esteban, R. L-A-lus, a new variant of the L-A totivirus found in wine yeasts with Klus killer toxin-encoding Mlus double-stranded RNA: Possible role of killer toxin-encoding satellite RNAs in the evolution of their helper viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 4661–4674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Rodríguez-Cousiño, N.; Esteban, R. Relationships and Evolution of Double-Stranded RNA Totiviruses of Yeasts Inferred from Analysis of L-A-2 and L-BC Variants in Wine Yeast Strain Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Vepškaitė-Monstavičė, I.; Lukša, J.; Konovalovas, A.; Ežerskytė, D.; Stanevičienė, R.; Strazdaitė-Zielienė, Ž.; Serva, S.; Servienė, E. *Saccharomyces paradoxus* K66 Killer System Evidences Expanded Assortment of Helper and Satellite Viruses. *Viruses* **2018**, *10*, 564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Lukša, J.; Ravoitytė, B.; Konovalovas, A.; Aitmanaitė, L.; Butenko, A.; Yurchenko, V.; Serva, S.; Servienė, E. Different Metabolic Pathways Are Involved in Response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and M Viruses. *Toxins* **2017**, *9*, 233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. McBride, R.C.; Boucher, N.; Park, D.S.; Turner, P.E.; Townsend, J.P. Yeast response to LA virus indicates coadapted global gene expression during mycoviral infection. *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 162–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Gier, S.; Simon, M.; Gasparoni, G.; Khalifa, S.; Schulz, M.H.; Schmitt, M.J.; Breinig, F. Yeast Viral Killer Toxin K1 Induces Specific Host Cell Adaptions via Intrinsic Selection Pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Brachmann, C.B.; Davies, A.; Cost, G.J.; Caputo, E.; Li, J.; Hieter, P.; Boeke, J.D. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast Chichester Engl.* **1998**, *14*, 115–132. [[CrossRef](#)]
24. Somers, J.M.; Bevan, E.A. The inheritance of the killer character in yeast. *Genet. Res.* **1969**, *13*, 71–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Melvydas, V.; Bruzauskaitė, I.; Gedminienė, G.; Šiekštelė, R. A Novel *Saccharomyces cerevisiae* Killer Strain Secreting the X Factor Related to Killer Activity and Inhibition of *S. cerevisiae* K1, K2 and K28 Killer Toxins. *Indian J. Microbiol.* **2016**, *56*, 335–343. [[CrossRef](#)]
26. Naumova, G.I.; Naumova, T.I. Comparative genetics of yeasts. XIII, Comparative study of *Saccharomycetes*-killers from different collections. *Genetika* **1973**, *9*, 140–145.
27. Pfeiffer, P.; Radler, F. Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. *Arch. Microbiol.* **1984**, *137*, 357–361. [[CrossRef](#)]
28. Citavicus, D.B.; Inge-Vechtomov, S.G. Multiple mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Production and general characteristics. *Sov. Genet.* **1972**, *8*, 71–75.
29. Konovalovas, A. *Molecular Determinants of Totiviridae Family Viruses of Saccharomyces Sensu Stricto Clade*; Vilniaus Universitetas: Vilnius, Lithuania, 2018.
30. Gietz, R.D.; Woods, R.A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **2002**, *350*, 87–96. [[CrossRef](#)]
31. Rowley, P.A.; Ho, B.; Bushong, S.; Johnson, A.; Sawyer, S.L. XRN1 Is a Species-Specific Virus Restriction Factor in Yeasts. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005890. [[CrossRef](#)]
32. Rodríguez-Cousiño, N.; Gómez, P.; Esteban, R. Variation and Distribution of L-A Helper Totiviruses in *Saccharomyces sensu stricto* Yeasts Producing Different Killer Toxins. *Toxins* **2017**, *9*, 313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ramírez, M.; Velázquez, R.; López-Piñero, A.; Naranjo, B.; Roig, F.; Llorens, C. New Insights into the Genome Organization of Yeast Killer Viruses Based on “Atypical” Killer Strains Characterized by High-Throughput Sequencing. *Toxins* **2017**, *9*, 292. [[CrossRef](#)]
34. Tallóczy, Z.; Mazar, R.; Georgopoulos, D.E.; Ramos, F.; Leibowitz, M.J. The [KIL-d] element specifically regulates viral gene expression in yeast. *Genetics* **2000**, *155*, 601–609.
35. Montanari, A.; Francisci, S.; Fazzi D’Orsi, M.; Bianchi, M.M. Strain-specific nuclear genetic background differentially affects mitochondria-related phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *MicrobiologyOpen* **2014**, *3*, 288–298. [[CrossRef](#)]

36. Yao, W.; Bruenn, J.A. Interference with replication of two double-stranded RNA viruses by production of N-terminal fragments of capsid polypeptides. *Virology* **1995**, *214*, 215–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ribas, J.C.; Wickner, R.B. The Gag domain of the Gag-Pol fusion protein directs incorporation into the L-A double-stranded RNA viral particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9306–9311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Dinman, J.D.; Icho, T.; Wickner, R.B. A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 174–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Park, C.M.; Lopinski, J.D.; Masuda, J.; Tzeng, T.H.; Bruenn, J.A. A second double-stranded RNA virus from yeast. *Virology* **1996**, *216*, 451–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## UŽRAŠAMS

# UŽRAŠAMS



Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p.: [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 15 egz.