

VILNIAUS UNIVERSITETAS

MILDA NORKIENĖ

**POLIOMOS VIRUSŲ VP1 BALTYMŲ BIOSINTEZĖS
YPATYBIŲ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* LĄSTELĖSE
TYRIMAS BEI PANAUDOJIMAS SEROLOGINIAMS
TYRIMAMS**

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2018 metai

Disertacija rengta 2011 – 2017 metais Vilniaus universitete, Biotechnologijos institute.

Mokslinė vadovė - dr. Alma Gedvilaitė (Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

TURINYS

SANTRUMPOS.....	5
ĮVADAS	8
MOKSLINIS NAUJUMAS	10
GINAMIEJI TEIGINIAI	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Poliomos virusai	13
1.1.1. Poliomos virusų viriono struktūra.....	17
1.1.2. Poliomos virusų evoliucijos modeliai	21
1.1.3. PyV infekcija ir molekulinį šaperonų poreikis	24
1.1.4. Poliomos virusų patogeniškumas.....	28
1.1.5. Žmogaus poliomos virusų serologiniai tyrimai	35
1.2. Mielių <i>Saccharomyces cerevisiae</i> raiškos sistema	39
1.3. Mielės – modelinis organizmas virusų tyrimams	41
1.3.1. Į virusus panašių dalelių sintezė mielėse	44
1.4. Mielių ląstelių flokuliacijos fenomenas.....	47
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	55
2.1 Tirpalai, mikroorganizmai, plazmidės, mitybinės terpės, reagentai.....	55
2.1.1 Buferiniai ir kiti tirpalai	55
2.2 Tyrimo metodai.....	62
2.2.1 Plazmidžių konstravimas	62
2.2.2 Polimerazinė grandininė reakcija.....	63
2.2.3 Imlųjų <i>S.cerevisiae</i> ląstelių paruošimas ir transformacija	67
2.2.4 Heterologinių virusinių baltymų, sulietų su EGFP, sintezės <i>S. cerevisiae</i> stebėjimas tėkmės citometru	68
2.2.5 Genominės DNR išskyrimas iš mielių <i>S.cerevisiae</i> ląstelių	69
2.2.6 Mielių auginimas ir heterologinių baltymų sintezės indukcija.....	69
2.2.7 Mielių ląstelių lizatų paruošimas analizei NDS-PAGE	70
2.2.8 Heterologinių baltymų išskyrimas iš mielių ląstelių ir gryninimas	70
2.2.9 Baltymų dializė	72
2.2.10 Baltymų NDS-PAGE ir poliakrilamidinio gelio dažymas.....	72
2.2.11 Į virusus panašių dalelių stebėjimas elektroniniu mikroskopu	72
2.2.12 Į virusus panašių dalelių analizė NanoSight LM10-HS aparatu.....	73

2.2.13 Imunoblotingas.....	73
2.2.14 Hemagliutinacijos inhibicijos testas	73
2.2.15 Netiesioginė imunofermentinė analizė	73
2.2.16. Konkurencinė imunofermentinė analizė	74
2.2.17 Statistinė analizė	75
2.2.18 Bioetikos komisijos leidimai.....	75
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	76
3.1. Poliomos virusų VP1 baltymų sintezės ypatybių <i>S. cerevisiae</i> ląstelėse tyrimas ir sintezės optimizavimas.....	76
3.1.1. Mielių šaperonų poreikis poliomos virusų VP1 sintezei	78
3.1.2. Mielių ląstelių flokuliacijos, sukeltos poliomos virusų VP1 raiškos, tyrimas.....	87
3.1.2.1. Genų, kurių trūkumas specifiškai pašalina VP1 baltymo sukeltą flokuliaciją, atranka	88
3.1.2.2. VP1 baltymo sekų, atsakingų už flokuliacijos indukciją, paieška.....	96
3.1.3. N galo NLS poveikis WU VP1 VPD dydžiui ir išeigai	102
3.1.4. HPy12 VP1 transliacijos iniciacijos kodono nustatymas.....	104
3.2. Naujų žmogaus poliomos virusų VP1 baltymų sintezė mielėse <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ir gryninimas.....	107
3.3. Naujų žmogaus poliomos virusų VP1 baltymų taikymas serologiniams tyrimams	110
3.3.1. Naujų žmogaus poliomos virusų VP1 baltymų kryžmės reakcijos su polikloniniais antikūnais	110
3.3.2. Naujų PyV VP1 panaudojimas hemagliutinacijos teste.....	112
3.3.3. Naujų PyV VP1 VPD panaudojimas žmogaus kraujo serumo mėginių tyrimams netiesioginės imunofermentinės analizės metodu.....	113
3.3.4. Naujų PyV VP1 VPD panaudojimas žmogaus kraujo serumo mėginių tyrimams konkurencinės imunofermentinės analizės metodu	117
4. Rezultatų aptarimas.....	124
IŠVADOS	142
Disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas.....	143
Pranešimai mokslinėse konferencijose	144
Finansinė parama	144
LITERATŪROS SĄRAŠAS	145
PADĖKA	166

SANTRUMPOS

AAV	Adeno asocijuoti virusai, nepatogeniški <i>Parvoviridae</i> šeimos nariai, gentis <i>Dependovirus</i>
Ag	Antigenas
Ak	Antikūnas; monokloninis Ak (MAk), polikloninis Ak (PAk)
ALTO	Alternatyvaus T antigeno ASR (angl. Alternative T antigen open reading frame)
angl.	Anglų kalba
ar.	Aminorūgštis, -ys
ARS	Autonomiškai besireplikuojančios sekos
ASR	Atviras skaitymo rėmelis
ATP	Adenozino trifosfatas
AVP1	Paukščių (Aves) poliomos viruso (sistemiškai vadinamo BFDPV) baltymas 1 (angl. avian polyomavirus 1),
BassPyV1	<i>Centropristis striata</i> (juodojo jūrinio ešerio) poliomos virusas 1
BFDPV	Banguotųjų papūgėlių jauniklių ligos virusas, Aves polyomavirus 1
BKPyV	BK poliomos virusas arba Žmogaus poliomos virusas 1
bp	Bazių pora
cAMP- PKA	Nuo ciklinio AMP priklausomos baltymų kinazės A reguliuojamas kelias
CDK4	Nuo ciklinų (D1) priklausoma kinazė 4
CNE1	Mielių CNE1 geno, koduojančio kalneksiną, promotorius
COMPASS	Konservatyvus baltymų kompleksas katalizuojantis H3 histonų metilinimo reakcijas
CPyV	Varnų poliomos virusas (angl. crow polyomavirus)
dNTP	Deoksiribonukleozidtrifosfatai
EDTA	Etilendiaminotetraacto rūgštis
EGFP	Sustiprinto signalo žalias fluorescuojantis baltymas
EGIS	Eukariotų genų inžinerijos skyrius (VU Biotechnologijos institutas)
EM	Elektroninė mikroskopija
ET	Endoplazminis tinklas
<i>FLO</i>	Flokulinų genas
FPyV	Kikilių poliomos virusas (angl. finch polyomavirus)
GFP	Žalios spalvos fluorescuojantis baltymas
GHPyV	Žąsų poliomos virusas (angl. goose haemorrhagic polyomavirus)
GK	Goldžio kompleksas
GRAS	Saugaus organizmo statusas (angl. generally recognized as safe)
GST	Gliutatio S-transferazė
HaPyV	Žiurkėno poliomos virusas
HBV	Hepatito B virusas
HCV	Hepatito C virusas
Hda1p	II klasės histonų deacetilazių komplekso katalitinis subvienetas
HDAC	Konservatyvus plataus veikimo profilio histonų deacetilazių kompleksas

HML/HMR	Mielių ląstelių dauginimosi tipą lemiančios sekos
HPyV	Žmogaus poliomos virusai (angl. human polyomaviruses)
HPyV12	Žmogaus poliomos virusas 12
HPyV6	Žmogaus poliomos virusas 6
HPyV7	Žmogaus poliomos virusas 7
HPyV9	Žmogaus poliomos virusas 9
HPV	Žmogaus papilomos virusai (angl. human papillomaviruses)
HSV	Herpes virusai
IFA	Imunofermentinė analizė, kitaip ELISA (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
ILBS	Imunologijos ir ląstelės biologijos skyrius (VU Biotechnologijos institutas)
JCPyV	JC poliomos virusas arba Žmogaus poliomos virusas 2
kDa	Kilodaltonas
KIPyV	Karolinska instituto poliomos virusas arba Žmogaus poliomos virusas 3
KT	Kambario temperatūra
lot.	Lotynų kalba
LPV	Afrikinės žalsvosios beždžionės poliomos virusas (angl. lymphotropic polyomavirus)
MAk	Monokloniniai antikūnai
MAPK	Mitogeno aktyvuojama baltymų kinazių Fus3/Kss1 kaskada
MCPyV	Merkelio ląstelių poliomos virusas arba Žmogaus poliomos virusas 5
MHC I	Pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas I
MLV	Pelių leukemijos virusas
MWPyV	Malavio poliomos virusas arba Žmogaus poliomos virusas 10
NAC	Heterodimerinis baltymų kompleksas (angl. Nacent polypeptide-associated complex)
NANA	N-acetilneuramino (sialo) rūgštis;
ncRNR	Nekoduojanti reguliacinė RNR
NDS	Natrio dodecilsulfatas
NDS-PAGE	Elektroforezė poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis su NDS
NJPyV	Naujojo Džersio poliomos virusas arba Žmogaus poliomos virusas 13
NLS	Nukreipimo į branduolį seka (angl. nuclear localization signal)
NNS	Nrd1-Nab3-Sen1 mielių baltymų kompleksas reguliuojantis transkripcijos efektyvumą
nt	Nukleotidai
OT	Optinis tankis
p53	Baltymas, dalyvaujantis ląstelės ciklo reguliavime
PAk	Polikloniniai antikūnai
PDI	Disulfidinių tiltelių izomerazė
PEG	Polietilenglikolis

PGR	Polimerazinė grandininė reakcija
PyV	Poliomos virusai, <i>Polyomaviridae</i> šeima
PML	Progresyvi daugiažidininė leukoencefalopatija (angl. progressive multifocal leukoencephalopathy)
PMSF	Proteazių slopiklis fenilmetansulfonilfluoridas
PP2A	Serino ir treonino fosfatazė
pRb	Retinoblastomos baltymas, kuris yra ląstelės ciklo reguliatorius
RAC	Su ribosoma susijungiantis kompleksas (angl. Ribosome Associated Complex)
RE	Restrikcijos endonukleazė
Rpd3p	Histonų deacetilazė, mielėse Rpd3S ir Rpd3L kompleksų sudėtyje reguliuojanti transkripciją
SGD	Mielių genomo duomenų bazė: http://www.yeastgenome.org/
SGTA	Mažas citozolinis pasižymintis gliutamininių tetratrikopeptidų pasikartojimais α baltymas, (angl. small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein)
SIR	Nutildytos informacijos reguliaciniai baltymai,
SN	Standartinis nuokrypis
STLPyV	Sent Luiso poliomos virusas arba Žmogaus poliomos virusas 11
SV40	Beždžionės poliomos virusas (angl. Simian vacuolating virus 40)
Swi-Snf	Nuo ATP priklausomas mielių chromatino pertvarkos kompleksas
TSPyV	Trichodysplasia spinulosa poliomos virusas arba Žmogaus poliomos virusas 8
VP1	Pagrindinis struktūrinis virusinis baltymas 1
VPD	Į virusus panašios dalelės
WUPyV	Vašingtono universiteto poliomos virusas arba Žmogaus poliomos virusas 4
ŽIV	Žmogaus imunodeficito virusas

IVADAS

Poliomos virusai (PyV) yra maži, apvalkalėlio neturintys DNR virusai, galintys infekuoti žinduolius, paukščius ir žuvis. Net dvylika naujų žmonių poliomos virusų (HPyV) atrasta per pastarąjį dešimtmetį, pritaikius didelio našumo sekoskaitos metodus. Šiuo metu žinoma keturiolika žmogaus poliomos virusų. Anksčiau atrasti HPyV yra labai paplitę ir aptinkami net nuošaliai gyvenančiose gentyse (Major ir kt., 1998). Naujų HPyV paplitimas ir poveikis žmogaus sveikatai šiuo metu intensyviai tiriami.

Galima teigti, kad HPyV yra dalis mūsų natūralios mikrobiotos. Pirminė besimptomė infekcija dažniausiai įvyksta kūdikystėje ir/ar labai ankstyvoje vaikystėje, o koinfekcija keliais skirtingais HPyV yra dažnas fenomenas (Gossai ir kt., 2016). Manoma, kad vidutiniškai apie 80 % pasaulio žmonijos populiacijos yra susidūrę su HPyV ir turi kraujo serume cirkuliuojančių IgG antikūnų (Ak) prieš įvairius HPyV. Pakitus imuninės sistemos būklei dėl ŽIV, organų transplantacijos, limfoproliferatyvinių ligų ir/ar monokloninių Ak terapijos gali pasireikšti aktyvi HPyV infekcija ir su ja susijusios patologijos. Pavyzdžiui, JCPyV sukelia progresyvią daugiažidininę leukoencefaliją, BKPyV - su poliomos virusu asocijuotą nefropatiją, MCPyV - Merkelio ląstelių karcinomas, TSPyV - *Trichodysplasia spinulosa* ligą, HPyV6 ir HPyV7 - diskeratotinę dermatozę, o KIPyV ir WUPyV siejami su kvėpavimo takų infekcijomis.

Naujų poliomos virusų infekcijai tirti kol kas nėra tinkamų ląstelių linijų, todėl kai kuriems tyrimams mielės galėtų būti puikus modelinis organizmas. Mielių ląstelės, kaip natūralios savų virusų šeimininkės, yra populiarus organizmas augalų, gyvūnų ir žmogaus virusinių baltymų sąveikų su ląstelės baltymais tyrimams. Ypač todėl, kad didžioji dalis pagrindinių ląstelių procesų, tokių kaip ląstelės viduląstelinis transportas, ciklo reguliacija, programuota ląstelės žūtis ar molekulinis šaperonų veikimas yra konservatyvūs visuose eukariotuose (Goloubinoff ir De Los Rios, 2007; Zhao, 2017).

Virusinių baltymų ir ląstelės sąveikų tyrimus pagreitina sukauptos žinios apie mielių genomą ir bioprocesus. Mielės taip pat yra puikus PyV VP1 baltymo formuojamų į virusus panašias dalelių (VPD) producentas. Poliomos virusų VP1 VPD galima naudoti įvairiems tyrimams, pvz., VPD struktūros ir sąveikos su ląstelėmis tyrimams, arba kaip antigeną (Ag) šių virusų paplitimo ir reaktyvacijos įvertinimo serologiniams tyrimams. VPD yra pigi alternatyva virusams išskirtiems iš ląstelių kultūrų, nes VPD pasižymi tokiomis pat struktūrinėmis savybėmis ir imunogeniškumu, kaip natyvūs virusai, tačiau jose nėra viruso genetinės medžiagos, jos yra neinfektyvios, ir darbui nereikia specialių saugumo reikalavimų.

Darbo tikslas

Atlikti poliomos virusų VP1 baltymų biosintezės optimizavimo ir ypatybių *S. cerevisiae* ląstelėse tyrimą bei išgrynintas žmogaus poliomos virusų VP1 VPD panaudoti serologiniams tyrimams.

Darbo uždaviniai

1. Nustatyti mielių šaperonų poreikį poliomos virusų VP1 baltymų biosintezės efektyvumui;
2. Nustatyti poliomos virusų VP1 baltymų biosintezės sukeltos mielių flokuliacijos priežastis;
3. Susintetinti mielių *S.cerevisiae* ląstelėse ir išgryninti trylikos žmogaus poliomos virusų kapsidės VP1 baltymus bei ištirti jų formuojamų VPD savybes;
4. Panaudoti žmogaus poliomos virusų VP1 baltymus serologiniams tyrimams.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Optimizuojant žmogaus poliomos virusų VP1 baltymų biosintezės efektyvumą mielėse pirmą kartą buvo nuosekliai ištirtas mielių šaperonų poreikis jų biosintezėi. Šiame tyrime pirmą kartą buvo pademonstruota Hsp90 šaperonų svarba PyV VP1 sėkmingai biosintezėi (Valaviciute ir kt., 2016). Tai patvirtino ir vėlesni Hornikova su kolegomis darbai, kuriuose nustatyta, kad į kapsidės struktūrą nesusijungę PyV VP1 baltymai dalyvaujant Hsp90 šaperonams sąveikauja su mikrovamzdeliais bei sukelia α -tubulino acetilinimą (Hornikova ir kt., 2017). Šie rezultatai suteikia viltį, kad Hsp90 šaperonai galėtų būti svarbus taikyns gydant nuo PyV sukeltų komplikacijų organizmo imunosupresijos sąlygomis, ypač nuo JCV sukeltos progresyvios daugiažidininės leukoencefalijos, kuri iki šiol imunosupresuotuose ligoniuose yra nepagydoma. Šis tyrimas taip pat atskleidė, kad Ssz1 ir Zuo1 šaperonų, formuojančių su ribosomomis susijungiantį kompleksą (RAC), veikimas buvo nepalankus PyV VP1 ir kitų virusinių baltymų biosintezėi mielėse, o jų genų pašalinimas ženkliai padidino jų raišką. Aptiktas RAC komplekso ryšys su virusinių baltymų sinteze galėtų padėti geresniam jo funkcijų baltymų biosintezės procese supratimui.

Darbe buvo tyrinėjamos kai kurių PyV rekombinantinių VP1 baltymų biosintezės sukeltos mielių ląstelių flokuliacijos priežastys ir pirmą kartą parodyta, kad dėl APyV, MCPyV, MWPyV, STLPyV ir BVPyV VP1 baltymų biosintezės tiesiogiai ar netiesiogiai apribojamas Cyc8 baltymo dalyvavimas Cyc8-Tup1 komplekso, kuris represuoja *FLO1* geno raišką, susidaryme. Dėl *FLO1* geno raiškos indukcijos mielių ląstelės ima flokuliuoti. Buvo parodyta, kad APyV VP1 baltymo sukeliama flokuliacijai svarbi ne tik jo seka, bet ir erdvinė struktūra ir/ar lokalizacija, nes sustiprinus į branduolį nukreipiančią VP1 baltymo signalinę seką, flokuliacija nebebuvo indukuojama. Kadangi flokuliacija yra mielių ląstelių atsakas į stresą, o Cyc8 ortologai stuburinių ląstelėse koduoja lizino demetilazes, galima daryti prielaidą, kad kai kurių PyV

VP1 baltymų sintezės sukeliama mielių ląstelių flokuliacija gali būti susijusi su šių baltymų dalyvavimu virusų patogenezėje. Panašus MPyV VP1 baltymo sintezės sukeltas poveikis buvo parodytas žinduolių ląstelėse, kai į VPD neįjungtas VP1 baltymas jungėsi su mikrovamzdeliais ir to pakako ląstelių ciklo sustabdymui G2/M fazėje (Hornikova ir kt., 2017).

Tiriant žmogaus poliomos viruso 12 (HPy12) VP1 baltymo raišką mielėse buvo patikslinta šio baltymo transliacijos pradžios pozicija. HPyV12 VP1 baltymo biosintezė nuo antrojo metionino kodono labai pagerino tiek jo išėigą, tiek ir VPD formavimosi efektyvumą. Šio tyrimo rezultatai (paskelbti Norkiene ir kt., 2015) buvo panaudoti 10-ojo Tarptautinio virusų taksonomijos komiteto ataskaitoje, apibūdinant *Polyomaviridae* šeimos HPyV12 VP1 baltymo galimą dydį (Moens ir kt., 2017).

Darbo metu net vienuolikos skirtingų žmogaus PyV VP1 VPD buvo pirmą kartą susintetintos ir išgrynintos iš mielių ląstelių, o trijų virusų (STLPyV, HPyV12 ir NJPyV) VP1 baltymai iki tol nebuvo susintetinti jokioje kitoje raiškos sistemoje. Visų naujųjų PyV VP1 VPD buvo panaudotos atliekant hemagliutinacijos testą su jūrų kiaulytės bei sveiko žmogaus donoro kraujo eritrocitais ir pirmą kartą buvo parodyta, kad antikūnų prieš MCPyV, HPyV9, HPyV10, HPyV12, bet ne prieš WUPyV, KIPyV, HPyV6, HPyV7, STLPyV ir NJPyV VP1 VPD paieška galėtų būti atliekama naudojant eritrocitų hemagliutinacijos testą.

Panaudojant iš mielių ląstelių išgrynintas HPyV VP1 formuojamas VPD, buvo sukurtas imunofermentinės analizės (IFA) metodas Ak prieš HPyV VP1 nustatymui žmogaus kraujo serume. Šiuo metu rinkoje nėra komercinių serologinių testų, galinčių nustatyti Ak prieš žmogaus PyV. Lietuvoje poliomos virusų serologinių ir epidemiologinių tyrimų taip pat nebuvo atlikta. Šio darbo metu buvo išanalizuoti 627 sveikų Lietuvos gyventojų kraujo serumai IFA naudojant 13 PyV VP1 VPD. Šie serologiniai tyrimai atskleidė, kad Lietuvoje žmogaus poliomos virusai paplitę plačiai: 19-67 % sveikų asmenų kraujo serumų mėginiuose nustatyti anti-HPyV VP1 antikūnai. Greta serologinių ir epidemiologinių tyrimų pirmą kartą buvo atlikta žmogaus kraujo

serumo mėginių konkurencinė IFA panaudojant 13 HPyV VP1 VPD. Ji parodė, kad kai kurių naujų PyV netiesioninės IFA teigiami rezultatai gali būti klaidingai teigiami dėl kryžminio antikūnų reaktyvumo, kurį nulemia didelė PyV gausa ir VP1 baltymų, formuojančių viruso kapsidę, sekų panašumas.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Naujų žmogaus poliomos virusų VP1 baltymai efektyviai formuoja VPD mielių raiškos sistemoje;
2. Rekombinantinių PyV VP1 baltymų VPD biosintezei mielėse yra svarbūs Hsp90, Hsp70 ir Hsp40 šaperonai;
3. Dėl kai kurių PyV VP1 baltymų sintezės mielių ląstelėse pradeda trūkti Cyc8 baltymo, todėl įsijungia flokulino Flo1 sintezė atsakinga už mielių flokuliaciją;
4. HPyV12 VP1 baltymo biosintezė ir VPD susirinkimas efektyvesni nuo antrojo pradžios metionino kodono;
5. Rekombinantinių HPyV VP1 baltymų formuojamos VPD tinka serologiniams tyrimams;
6. Daugumoje tirtų žmogaus kraujo serumo mėginių aptinkami IgG klasės antikūnai prieš įvairius HPyV.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Poliomos virusai

Poliomos virusai (PyV) paprastai nesukelia aktyvios infekcijos ar patologijų savo šeimininkams esant sveikai imuninei sistemai. PyV yra maži (40-45 nm skersmens), neturintys apvalkalėlio apie 5 kb dydžio dvigrandinės žiedinės DNR virusai (Moens ir kt., 2017). Jie priklauso vienai *Polyomaviridae* šeimai, kuri patenka į I-ąją virusų grupę pagal D. Baltimoro virusų klasifikaciją (ICTV 7th Report, 1999). Iki 2011 metų visi *Polyomaviridae* šeimos virusai buvo priskiriami vienai *Polyomavirus* genčiai. Per pastarąjį dešimtmetį buvo atrasta ypač daug naujų PyV, todėl atsirado poreikis klasifikaciją keisti ir 2011 m. *Polyomaviridae* šeimos virusai buvo perskirstyti į tris gentis: dvi žinduolių - *Orthopolyomavirus* ir *Wukipolyomavirus*, bei vieną paukščių – *Avipolyomavirus*. Žinduolių poliomos virusai buvo skirstomi remiantis nukleotidinių sekų panašumais tarp genčiai priskiriamų rūšių, *Wukipolyomavirus* genties atskaitos tašku pasirinktas žmogaus KI poliomos virusas (angl. Karolinska Institute polyomavirus), o *Orthopolyomavirus* gentis sudaryta remiantis SV40 (angl. Simian virus 40) poliomos viruso seka (Johnė ir kt., 2011).

Tarptautinis virusų taksonomijos komitetas 2015 m. pasiūlė patobulintą klasifikaciją. Šiuo metu yra išskiriamos keturios *Polyomaviridae* šeimos gentys: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* ir *Deltapolyomavirus*, joms iš viso priskiriama jau daugiau nei 78 PyV rūšių. Atnaujinta klasifikacija remiasi keliais pagrindiniais principais. Pirmiausia, klasifikuojamo poliomos viruso geno seka turi būti žinoma, publikuota recenzuojamame žurnale ir viešai prieinama duomenų bazėse. Antra, viruso geno struktūra turi atitikti PyV būdingą struktūrą, tai yra dvigrandinės DNR genomas turi turėti ankstyvąjį ir vėlyvąjį regionus, koduojančius T antigenus ir struktūrinius viruso baltymus. Šie regionai turi būti atskirti nekoduojančiomis sekomis. Trečia, turi būti žinomas tai PyV rūšiai būdingas šeimininkas. Ketvirta, skirtumas tarp PyV didžiojo T antigeno (LTag) sekų turi būti didesnis nei 15 %. Jam esant mažesniai, PyV

gali būti priskirti tos pačios rūšies skirtingiems variantams, bet ne naujai rūšiai (Calvignac-Spencer ir kt., 2016). Naujoji taksonominė sistema pabrėžia artimą filogenetinę ryšį tik tarp viruso LTA_g baltymų, dėl jų mažo variabilumo laiko atžvilgiu. Bet jau diskutuojama apie patogesnę sistemą (Buck ir kt., 2016), kurioje būtų atsižvelgiama į abiejų pagrindinių viruso genų produktų (LTA_g ir VP1) kilmę pvz.: WUPyV Ortho-LTA_g/Wuki-VP1. Tokia sistema pagreitintų klinikinių diagnostinių tyrimų rezultatų susiejimą su konkrečia PyV rūšimi, tiriant LTA_g ar VP1 imunohistochemiškai (naudojant anti-LTA_g ar anti-VP1 antikūnus) ir/ar PGR metodu. Pavyzdžiui, *Gammapolyomavirus* genčiai priklausančių visų septynių narių VP1 ir VP2 baltymai labai panašūs į *Betapolyomavirus* VP1 ir VP2 baltymus, todėl serologiniai testai šių baltymų pagrindu genties identifikavimui netinkami. Panašiu principu jau yra klasifikuojami gripo virusai (pagal hemagliutinino ir neuroaminidazės genus).

Poliomos virusai būdingiausi žinduoliams: daugiausiai PyV rūšių rasta šikšnosparnių (23), žmonių (13 ir viena dar nepatvirtinta, kaip HPyV14 rūšis; Gheit ir kt., 2017) (1.1 lentelė), beždžionių (13), žmogbeždžionių (10), graužikų (6) (Nainys ir kt., 2015) organizmuose. Dar septynios poliomos virusų rūšys buvo rastos kitų žinduolių, pavyzdžiui, meškėnų (2; Geoghegan ir kt., 2017), alpakų (1; Dela Cruz ir kt., 2017), jūrinių ūdrų (1; Siqueira ir kt., 2017) organizmuose.

Pirmasis aptiktas poliomos virusas – pelių poliomos virusas (MPyV, angl. murine polyomavirus), buvo aprašytas ir pradėtas tyrinėti penktajame praėjusio amžiaus dešimtmetyje (Knipe ir Howley, 2007), dabar priskiriamas gausiausiai *Alphapolyomavirus* genčiai. Anglų mokslininkas L. Gross dirbdamas su pelių leukemijos virusu (MLV, angl. murine leukemia virus), pastebėjo, jog atlikus MLV pasažą pelėse, kai kuriems užkrėstiems gyvūnams išsivystė seilių liaukų augliai, bet ne leukemija. Vėliau mokslininkas išskyrė minėtos patologijos sukėlėją ir parodė, kad nuo MLV jis skiriasi sedimentacijos konstanta, atsparumu kaitinimui ir dydžiu (išskiriamas filtruojant kitokiomis sąlygomis nei MLV) (Gross ir kt., 1958). Gross išskirtas infekcinis agentas buvo pavadintas poliomos virusu (poly, graikiškai reiškia

daug, oma – auglys; Stewart ir kt., 1958), dėl šio viruso savybės pelių jaunikliams indukuoti daugybinių auglių susidarymą. Potencialiai MPyV gali infekuoti daugiau nei 30 skirtingų ląstelių tipų naujagimėse pelėse (Dawe ir kt., 1987), viruso replikacija yra galima kepenyse, blužnyje, inkstuose, plaučiuose, kauluose (Demengeot ir kt., 1990). Inokuliuojant MPyV sveikas suaugusias peles, viruso replikacija pasiekia maksimumą per 1-2 savaites kauluose, širdyje ir limfiniuose mazguose, bet viruso infekcija visiškai pašalinama per du mėnesius (Berke ir Dalianis, 1993). Imunodeficitinėse pelėse MPyV infekcija tampa sisteminė ir, priklausomai nuo imunodeficito lygio, gali būti mirtina (Berke ir kt., 1998).

Pirmasis atrastas primatų PyV atstovas, dabar priskiriamas *Betapolyomavirus* genčiai - SV40 (angl. Simian virus 40). SV40 buvo išskirtas iš rezus beždžionės inkstų ląstelių kultūros, naudotos poliomiolito vakcinos „Salk“ gamybai (Sweet ir Hilleman, 1960). Šis atradimas sulaukė daugybės atgarsių, paaiškėjus, kad virusas pasižymi onkogeninėmis savybėmis, ir yra atsparus formaldehidui, naudotam poliovirusui inaktyvuoti, ruošiant vakciną (Knipe ir Howley, 2007). Detalesni tyrimai leido identifikuoti beždžionės inkstų ląstelių kultūrose virusą SV40, sukeltą auglius žiurkėnams (Eddy ir kt., 1962). 10-30 % visų poliomiolito vakcinų JAV buvo su SV40 viruso priemaišomis (Sweet ir Hilleman, 1960), o jomis 1955-1963 metais paskiepyti 98 milijonai JAV gyventojų (Shah ir Nathanson, 1976). Nors SV40 DNR sekos buvo rastos kelių žmogaus auglių tipų - ependimomos, smegenų gyslinio audinio, mezoteliomos, osteosarkomos ir sarkomos mėginiuose (Carbone ir kt., 1997; Dang-Tan ir kt., 2004; Bouvard ir kt., 2012), tačiau žmogui nėra patvirtintas realus kancerogeniškas SV40 poliomos viruso poveikis.

Žiurkėno poliomos virusas (HaPyV, angl. hamster polyomavirus) buvo identifikuotas, norint išsiaiškinti, kas sukelia spontaniškus žiurkėnų plaukų folikulų epitelio augimus. Virusas randamas diferencijuotuose audinio sluoksniuose, todėl primena papilomos virusus. Tačiau dėl genomo organizacijos ir DNR sekų panašumų virusas priskiriamas PyV (Knipe ir Howley, 2007). Vėliau HaPyV buvo susietas su agresyvių B-ląstelių limfomų protrūkiu Sirinių

auksinių žiurkėnų (lot. *Mesocricetus auratus*) GASH:Sal kolonijoje, pasižyminčioje spontaninėmis genetinėmis patologijomis. Beveik 16 % Sirinių žiurkėnų (iš 975 tikrintų) išsivystė progresuojantys limfiniai augliai, taip pat pasireiškė letargija, anoreksija, akivaizdus pilvo didėjimas, progresuojant ligai, gyvūnų išgyvenamumas siekė 1-2 savaites. Grauzikų limfomų audiniuose imunohistochemiškai patvirtintas HaPyV kapsidžių formavimasis, o tikro laiko PGR analizė pavirtino HaPyV VP1 geno sintezę. Visuose analizuojamuose Sirinių žiurkėnų kraujo serumuose aptikti anti-VP1 HaPyV specifiniai Ak, šie antikūnai nustatyti ir kontrolinių kitos rūšies žiurkėnų iš to paties veisimosi arealo kraujo serumo mėginiuose. Limfomų auglių audiniuose HaPyV genomai pasižymėjo iškritomis nekoduojančiame regione ir šalia esančiose sekose, koduojančiose kapsidės VP2 baltymą (Munoz ir kt., 2013).

Septynios PyV rūšys indentifikuotos ir paukščiuose: Adele pingvinuose, plėšriosiose medšarkėse, banguotose papūgėlėse, kanarėlėse, varnose, kikiliuose ir žąsyse (Calvignac-Spencer ir kt., 2016). Žinomiausias paukščių poliomos virusas (APyV) formaliai vadinamas banguotųjų papūgėlių jaunikių ligos virusu (BFDP) sukelia ūmią užkrečiamą banguotųjų papūgėlių ligą, gali infekuoti ir kitus ganėtinais atitolusius papūginių, sakalinių, geninių, žvirblinių bei vištinių būrių atstovus (Lafferty ir kt., 1999; Johne ir kt., 1998). APyV infekcija sukelia suaugusams paukščiams gausų poodinį kraujavimą, viduriavimą bei žaibišką žūtį. Kai kuriais atvejais liga tęsiasi ilgiau, paukščiai tampa jautūs bakterinėms ir grybelinėms infekcijoms, deformuojasi jų plunksnos (Literak ir kt., 2006). Toks šeimininko rūšies keitimo modelis yra kol kas išskirtinai būdingas APyV (Buck ir kt., 2016). Duomenys apie jo plitimą ar paplitimą yra labai menki, nėra aišku, ar panašiai APyV plinta ir tarp laisvėje gyvenančių paukščių. Pagal serologinius duomenis antikūnai prieš žąsų PyV aptikti 43 % sveikų žąsų populiacijos kraujo serumuose (Zielonka ir kt., 2006). Šie tyrimai leidžia teigti, jog ir paukščiams PyV sukelia besimtomės infekcijas ir gali būti perduodamas tiesiogiai kontaktuojant. Nėra aiškus APyV plitimo po aktyvios infekcijos mechanizmas, bet papūgų užsikrėtusių

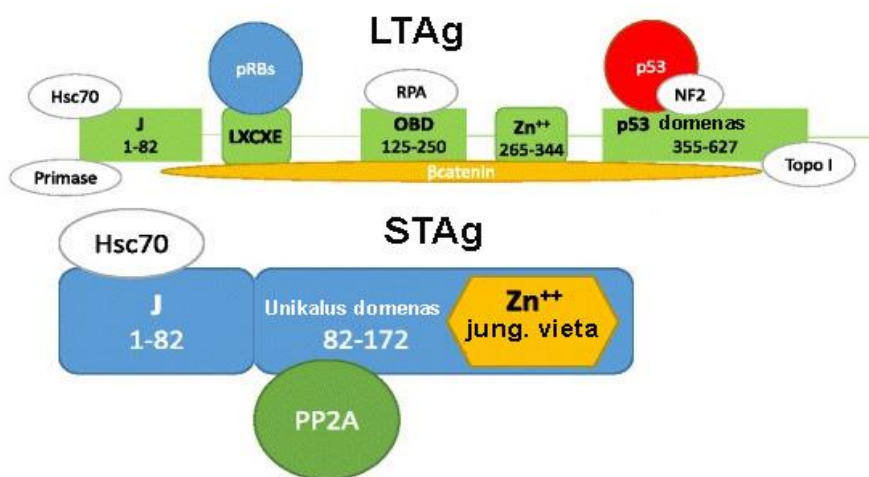
banguotųjų papūgėlių liga kraujyje aptinkami APyV virionai patvirtina aktyvią viremiją (Phalen ir kt., 2000).

2015 metais buvo surastas pirmasis PyV žuvyse, konkrečiai juodajame jūrų ešeryje (lot. *Centropristis striata*) (Peretti ir kt., 2015). Vėliau PyV buvo rasta ir kitose žuvų rūšyse: 2016 metais - auksaspalvio sparo (lot. *Sparus aurata*), sergančio žuvų limfocistine liga, kurią sukelia LCDV (angl. lymphocystis disease virus) virusas, mėginiuose (Lopez-Bueno ir kt., 2016), taip pat *Trematomus pennellii*, *Rhynchobatus djiddensis* žuvų audiniuose (Buck ir kt., 2016). Po genomų ir LTA_g koduojančių sekų filogenetinės analizės tik BassPyV1 (*Centropristis striata* poliomos virusas 1) buvo priskirtas naujai rūšiai (Calvignac-Spencer ir kt., 2016). Likę minėti žuvų PyV evoliuciškai yra nutolę nuo esamų keturių PyV genčių, bet gali būti, kad nepatvirtintos PyV rūšys ateityje sudarys penktąją PyV gentį (Moens ir kt., 2017).

1.1.1. Poliomos virusų viriono struktūra

Subrendę PyV virionai yra 40-45 nm skersmens ir sudaryti iš 88 % baltymų ir 12 % DNR. Vienas virionas turi tik vieną žiedinės dvigrandės DNR genomo kopiją. Subrendusio viriono genomas supakuotas lyg minichromosoma su ląstelės - šeimininkės H2A, H2B, H3 ir H4 histonais. Vidutinis poliomos virusų genomas yra 5000 bp dydžio, bet dydis gali skirtis priklausomai nuo rūšies, pavyzdžiui, jaučio poliomos viruso genomas 4697 bp, o didžiausias juodojo jūrinio ešerio (BassPyV1) genomas yra 7369 bp dydžio. Genomą sudaro du atskirai transkribuojami regionai: anktyvasis ir vėlyvasis, pagal transkripcijos eiliškumą infekcijos metu. Juos atskiria nekoduojantis regionas, kuriame yra ankstyvojo ir vėlyvojo regionų DNR replikacijos pradžios sekos, promotoriai ir transkripcijos stiprikliai. Nekoduojamame regione (NR) aptinkama daugiausiai mutacijų (Gosert ir kt., 2008). Žmogaus atskirų tipų PyV genomo sekos ilgis individualiai gali skirtis nuo 5,3 % MWPyV atveju (Siebrasse ir kt., 2012) iki 0,55 % BKPyV atveju (Chen ir kt., 2004). Nuo ankstyvojo regiono transkribuojama viena pirminė informacinė

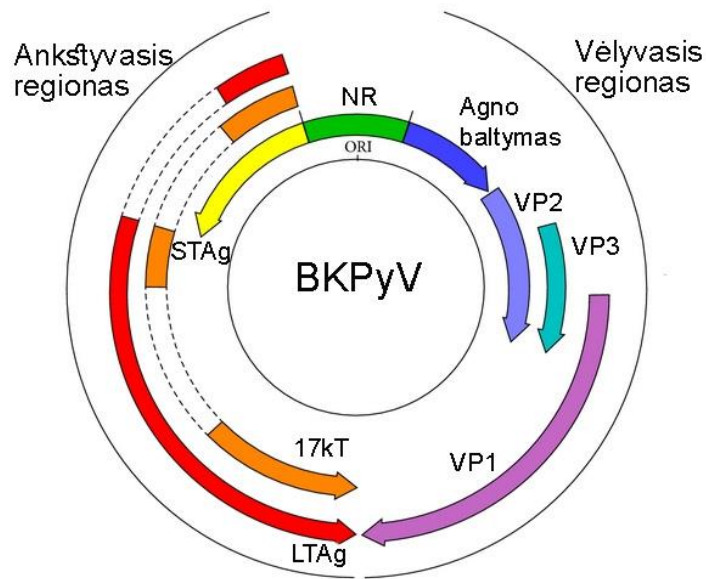
RNR, iš kurios alternatyviaus splaisingo būdu suformuojami keli transkriptai. Šių transkriptų produktai - reguliaciniai LTA_g ir STA_g baltymai (didysis ir mažasis T antigenai) - yra pagrindiniai visų PyV virusinės DNR replikacijos reguliatoriai (1.1 pav). LTA_g yra ankstyvosios viruso genų raiškos perjungiklis, jį vėlyvąją, jo informacinė RNR papildomai reguliuojama viruso specifinės mikro RNR. LTA_g buvo ne veltui pasirinktas kaip pagrindinis PyV klasifikavimo baltymas, nes jis reguliuoja infekuotos ląstelės proliferaciją, uždegiminiuosius procesus bei žūtį. LTA_g N-gale esantis LXCXE motyvas gali jungtis su baltymų kišenių (angl. pocket protein) šeimos nariais: pRb, p107 ir p130 ir taip keisti ląstelės ciklo fazę (Andrei ir kt., 2015). LTA_g taip pat sąveikauja ir su navikų supresoriaus baltymu p53 (Lilyestrom ir kt., 2006), neleisdamas jam sukelti apoptozės atsiradus DNR pažeidimams (An ir kt., 2012). Mažasis T antigenas (STA_g) taip pat turi J domeną, kuris kartu su STA_g C-galiniu regionu gali sąveikauti su serino/treonino fosfataze (PP2A). SV40 Py virusu infekuotose ląstelėse PP2A slopinimas lemia auglių formavimąsi (Chen ir kt., 2007).



1.1 pav. Didžiojo ir mažojo PyV T antigenų struktūrinės schemas. Šviesiai žalia spalva pavaizduoti LTA_g domenai, šviesiai mėlyna – STA_g domenai. Apskritimai žymi ląstelės šeiminių baltymus galinčius jungtis su atitinkamu antigeno domenu (pagal Delbue ir kt., 2017).

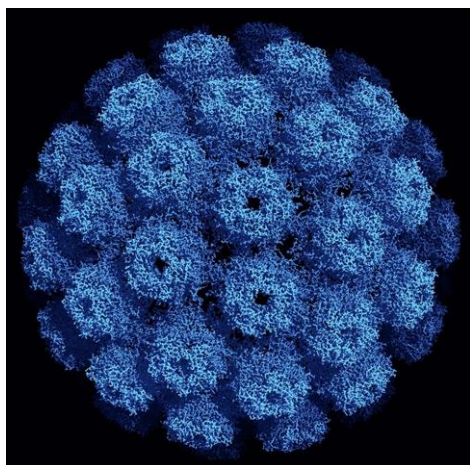
Kai kurie PyV gali turėti papildomus ankstyvuosius baltymus, pavyzdžiui, 17kT, 21kT, 57kT antigenus, vidurinį T antigeną (MT) arba alternatyvų T antigeną - ALTO baltymą. ALTO baltymas nėra susijęs su viruso replikacija, evoliuciškai labai artimas MPyV viduriniajam T antigenui, dalyvaujančiam ląstelės šeiminkės transformacijoje (Cheng ir kt., 2009). 1.2 paveiksle ankstyvojo regiono koduojami baltymai vaizduojami kairiajame pusrutulyje, o vėlyvieji dešiniajame.

Vėlyvojo regiono informacinė RNR transkribuojama nuo komplementarios DNR grandinės priešinga kryptimi nei ankstyvasis regionas. VP1 ir VP2 struktūriniai baltymai sintetunami nuo skirtingų informacinių RNR dėl alternatyvaus splaisingo. Kai kurie PyV, turintys VP3 baltymą, jį transliuoja nuo VP2 informacinės RNR, tik nuo kito transliacijos pradžios kodono (Imperiale ir Major, 2013). SV40, žmogaus KI, WU, MC PyV turi ir 15 kDa dydžio VP4 baltymą, užkoduotą toje pačioje VP2/VP3 informacinėje RNR. Teigiama, kad jis neformuoja kapsidės, o yra skirtas ląstelės lizei (Dalianis ir kt., 2009; Daniels ir kt., 2007). SV40, žmogaus BK ir JC poliomos virusai ties VP1 pradžios kodonu turi mažą atvirą skaitymo rėmelį, kuris koduoja agno baltymą (Saribas ir kt., 2016). Agno baltymas yra reguliacinis baltymas, dalyvaujantis transkripcijoje, ląstelės ciklo reguliacijoje, viruso DNR replikacijoje ir reparacijoje bei virionų brendime. JCPyV agno baltymas gali formuoti viruso poras (Suzuki ir kt., 2010), bet dar nėra aišku ar agno poros geba integruotis ląstelės membranoje (Saribas ir kt., 2016). Kitų žinduolių PyV taip pat turi į agno panašų baltymą (Ehlers ir Moens, 2017). Paukščių PyV VP4 užkoduotas papildomame skaitymo rėmelyje VP2 baltymą koduojančioje informacinėje RNR (Johne ir Muller, 2007). Tačiau šis VP4 nėra analogiškas SV40 VP4 ar žinduolių agno baltymui (nors kartais vadinamas agno baltymu 1a) (Johne ir kt., 2011) ir galimai dalyvauja genomo ir kapsidės pakavime bei apoptozėje (Shen ir kt., 2011). Paukščių PyV koduoja ir agno baltymą 1b (VP4 delta), agnobaltymą 2a ir 2b. Agno baltymai 1a/1b ir 2a/2b dar neapibūdinti hidrofobiniai baltymai, todėl neaišku, ar atlieka kažkokią funkciją, ar tiesiog yra alternatyvaus splaisingo produktai (Johne ir kt., 2011).



1.2 pav. BKPyV genomo organizacijos schema. Kairiajame pusrutulyje pavaizduoti ankstyvuosius reguliacinius LTAg (raudona), STAg (geltona) ir 17kT (oranžine spalva) baltymus koduojantys ASR, dešiniajame pusrutulyje pažymėti vėlyvuosius baltymus koduojantys VP1 (violetine), VP2 (melsva), VP3 (šviesiai mėlyna) ir Agno (mėlyna spalva) baltymus koduojantys ASR. Žalia spava pavaizduotas nekoduojantis regionas (NR) (pagal Gascun ir Carr, 2013).

Didysis struktūrinis VP1 baltymas sudaro 75 % viso viriono baltymų. Be VP1 baltymo daugumos žinduolių PyV kapsidę sudaro ir VP2 bei VP3 mažieji struktūriniai baltymai, o paukščių PyV kapsidėje randamas ir unikalus VP4 baltymas. PyV virionai neturi apvalkalėlio, jų kapsidės pasižymi T=7 dešinės pusės ikosahedrine simetrija ir yra sudarytos iš 72 pentamerinių kapsomerų (1.3 pav). Kiekvienas pentameras sudarytas iš penkių VP1 molekulių. Kapsomerai tarpusavyje jungiasi per VP1 C-galą, o jų kontaktai papildomai stabilizuojami kalcio jonų bei disulfidinių tiltelių tarp pentamerų. Kiekvieno pentamero vidinėje dalyje plaukų segtuko principu jungiasi po vieną VP2 ar VP3 baltymą. Paukščių PyV VP4 baltymas yra įsiterpęs tarp VP1 ir viriono genomo. VP1 N-galas jungiasi su supakuota DNR, bet VP2 ir VP3 baltymai taip pat gali jungtis su virusiniu genomu (Hurdiss ir kt., 2016).



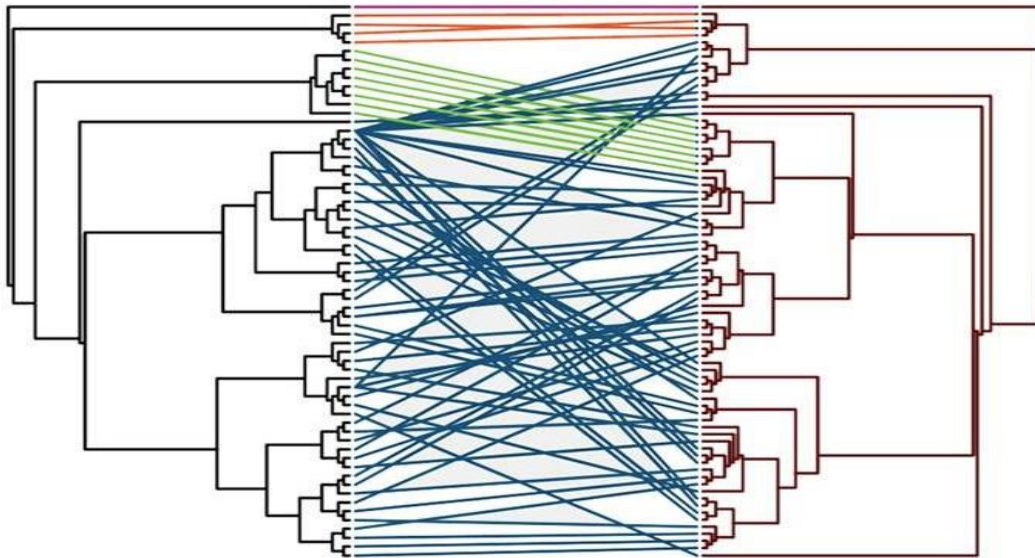
1.3 pav. SV40 virusinės dalelės trijų dimensijų struktūrinis modelis. VP1 baltymo formuojami pentamerai jungiasi tarpusavyje per VP1 molekulės C-galą, vaizduojamos virusinės dalelės skersmuo yra apie 500 angstromų (Å) arba 50 nm, 3,1 Å rezoliucija gauta naudojant rentgeno difrakcijos metodą (RCSB baltymų duomenų bazė: <https://www.rcsb.org>; Moens ir kt., 2017).

Cezio chlorido tankio gradientė infektyvūs virionai randami $1,34 \text{ g/cm}^3$ tankio frakcijoje, o tuščios kapsidės VPD - $1,29 \text{ g/cm}^3$ tankio frakcijoje. Virionai yra stabilūs apie vieną valandą 50°C temperatūroje, bet šiomis sąlygomis nestabilūs esant 1M MgCl_2 . Kadangi PyV neturi apvalkalėlio, jie atsparūs lipidų tirpikliams (Imperiale ir Major, 2013). Savarankiškai VP1 baltymas formuoja VPD, kurių dydis gali būti nuo 20 nm iki 60 nm. Rekombinantiniai VP1 baltymai formuodami VPD gali supakuoti dvigrandes 5 - 9,4 kb DNR molekules, tačiau panaudoja mažesnę kiekį histonų nei natyvus virionas (Fang ir kt., 2012; Hurdiss ir kt., 2016).

1.1.2. Poliomos virusų evoliucijos modeliai

Didelis žmogaus PyV paplitimas visuose geografiniuose regionuose rodo, kad jie atsiskyrė kartu su žmogaus rasėmis prieš 50000 - 100000 metų ir kilo iš Afrikos su moderniuoju *Homo sapiens* (Sharp ir kt., 2011). Toks sąlyginai trumpas laikotarpis, pasireiškiantis lėta evoliucija, yra būdingas DNR virusams, replikuojamiems polimerazės su klaidų ištaisymo aktyvumu (Hatwell ir Sharp, 2000). Virusų ir jų šeimininko sąveika yra svarbi viruso evoliucijai. Bioinformatiniais metodais ieškant panašių į žuvų PyV sekų duomenų bazėse, buvo atrastos į poliomos virusus panašios sekos artropodų (skorpionų ir vorų) sekoskaitos duomenyse. Šios sekos yra dalinės, integruotos į šeimininko genomą, nepasižymi tipine PyV genomo organizacija, todėl neatitinka PyV rūšinių kriterijų. Tačiau minėti tyrimai praplėtė ir papildė PyV

evoliucionavimo teorijas. Pagal artropodų archajinių PyV sekų duomenis koevoliucija vyksta jau mažiausiai pusę milijardo metų (Buck ir kt., 2016). Plačios apimties filogenetiniai tyrimai teigia, kad PyV arba PyV pirmtakai palaipsniui evoliucionavo kartu su savo infekuojamomis, ar infekuotomis senovėje, gyvūnų rūšimis (koevoliucijos teorija) (Sharp ir kt., 2011). Be kodivergencijos, kaip esminio evoliucinio variklio (Buck ir kt., 2016), poliomos virusų įvairovė buvo nulemta ir viruso DNR linijinių duplikacijų bei šeimininko keitimo procesų (Madinda ir al., 2016). PyV molekulinė evoliucija buvo gana lėta, 10^{-8} vienos genomo vietos pokyčių per metus (Buck ir kt., 2016; Madinda ir kt., 2016). Linijinės duplikacijos lėmė žmogaus PyV įvairovę (1.1 lentelė) bei 8 kol kas žinomų šimpanzių PyV rūšių atsiradimą. Galiausiai anksčiau atsiskyrusių PyV ankstyvuosius ir vėlyvuosius regionus sumaišė rekombinacija, kaip ir PyV virusus ar jų fragmentus su kitų virusų šeimų atstovų fragmentais. Naujaisiais duomenimis, antrasis hipotetinis modelis - divergencijos keičiant šeimininką - tinkamas ir dvigrandinės DNR virusams (Geoghegan ir kt., 2017). PyV atveju divergencija keičiant šeimininką paremta panašiu PyV sekų šikšnosparniuose ir didžiųjų beždžionių genomuose duomenimis. Taip pat nereikia pamiršti ir APyV gebėjimo infekuoti gana platų paukščių rūšių spektrą, t.y., keisti šeimininką, ir APyV labai didelio genomo panašumo į žąsų PyV, sukelti paukščiams hemoraginę karštinę. Filogenetiniai viruso ir jo šeimininko medžiai nėra vienodi, bet juos susiejus atsispindi viruso ir jo šeimininko evoliuciniai ryšiai ir sinchroniška divergencija. *Polyomaviridae* šeimos virusų ir jų šeimininkų žinomų filogenetinių istorijų jungtinėje schemoje 1.4 pav spalvotomis linijomis sujungti PyV ir jų šeimininkų filogenetiniai medžiai. Linijų spalva žymi šeimininko taksonominę klasę. Kuo stipresnė viruso ir šeimininko bendra divergencija, tuo spalvotoji linija yra horizontalesnė, o linijos įstrižumas vaizduoja PyV perėjimą į kitą šeimininką (1.4 pav). Schemos autoriai mano, kad viruso ir šeimininko filogenetinių medžių topologijų skirtumai atsiranda dėl tarprūšinio viruso perėjimo, kuris yra būdingas ir *Polyomaviridae* šeimai (Geoghegan ir kt., 2017).



1.4 pav. *Polyomaviridae* šeimos virusų ir jų šeimininkų filogenezių jungtinė schema. Linijos, jungiančios šeimininko filogenetinį medį (kairėje, juoda spalva) su viruso filogenetiniu medžiu (dešinėje, ruda spalva), yra pažymėtos pagal šeimininko tipą: tamsiai mėlyna spalva – žinduoliai, žalia spalva – paukščiai, oranžinė – žuvis, viena viršutinė rožinė juostelė – bestuburiai. Filogenetinė PyV analizė atlikta lyginant VP1 genetinį regioną. Pagal Geoghegan ir kt., 2017.

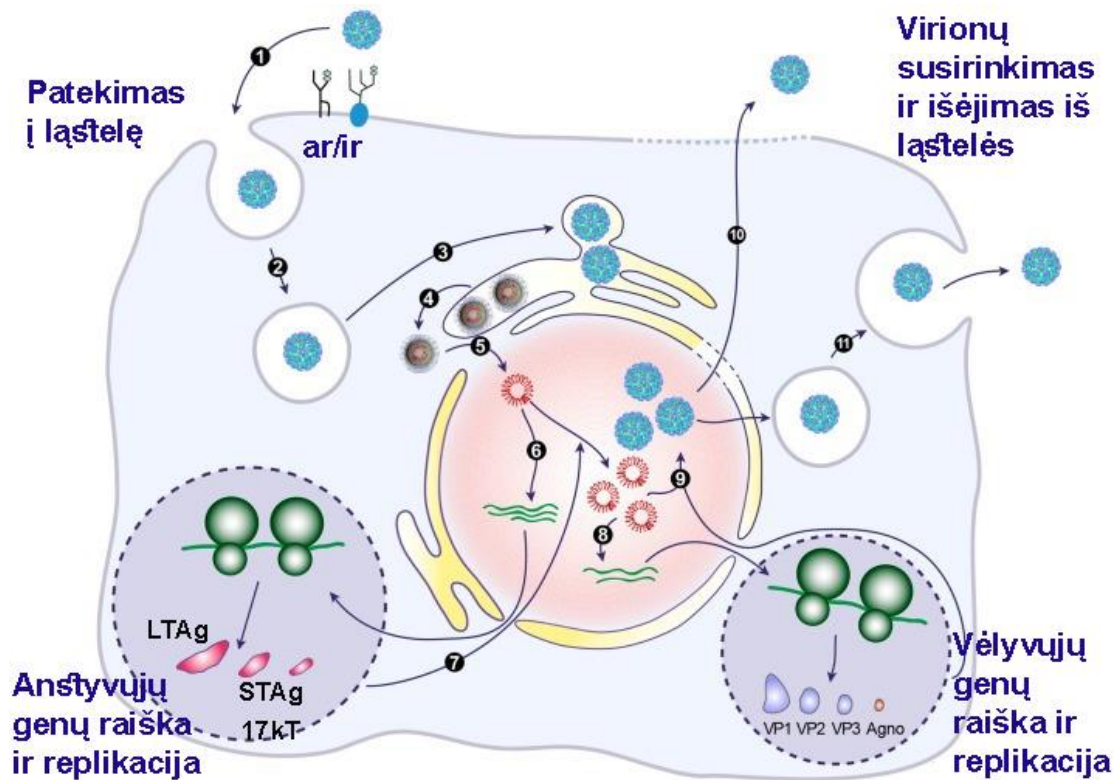
Teigiama, kad APyV (BFDP) infekcijos iš paukščių galėjo retkarčiais pereiti ir žmogui, prisidedant prie bendros zoonozės (Jones ir kt., 2008). Šias įžvalgas sustiprina gausus žinduolių PyV rūšių skaičius (Madinda ir al., 2016), kaip galimų zoonozinių patogenų šaltinis (ankščiau minėtos šikšnosparnių, šimpanzių, afrikinių didžiųjų beždžionių, graužikų PyV). Šiuo metu divergencijos keičiant šeimininką modelis gali būti tinkamas paukščių PyV, bet nenustačius tarpinių rūšių protėvių ir/ar nepatvirtinus zoonozės giminingumo su žmogaus PyV, žinduolių PyV evoliucijai aiškinti pateikiamas trečiasis modelis. Hipotetinis PyV divergencijos šeimininke modelis teigia, kad archainiai PyV virusai nukrypo vienas nuo kito greičiau, nei evoliucionavo šeimininko organizmas (naujų porūšių formavimasis). Tai lėmė kelių panašių žinduolių poliomos virusų aptikimą viename šeimininke bei galimą PyV rūšies homologų specifiškumo atsišakojimą, t.y., perėjimą kitiems šeimininkams. Pavyzdžiui, du nepriklausomuose organizmuose aptikti skirtingų pelėnų rūšių

PyV (Nainys ir kt., 2015), kurie tarpusavyje skiriasi 20 %, atsiskyrę prieš 10 milijonų metų. Jų artimiausi dabar žinomi giminaičiai yra žmogaus KI ir WU PyV. Panašumas tarp pelėnų ir žmogaus KI ir WU PyV siekia 50 %. Kadangi primatai ir graužikai atsiskyrė prieš 90 milijonų metų (Hedges ir kt., 2015), pagal divergencijos šeimininke modelį, būtų galima įtarti, jog pelėnų PyV pradinis šeimininkas nebuvo graužikas (Buck ir kt., 2016).

Sparčiai didėjant identifikuojamų *Polyomaviridae* šeimos rūšių skaičiui, filogenetiniai duomenys tikslinami. Labai svarbi yra pradinio PyV šeimininko rūšis, kurioje PyV buvo aptiktas, tai atsispindi ir dabartinėje PyV rūšių taksonomijoje. Viena pagrindinių problemų, susijusi su plačiu PyV paplitimu, yra ta, kad atrastas teoriškai naujas PyV gali būti tiesiog aplinkos tarša, o ne tiriamojo organizmo infekcija. Kadangi PyV filogenetiniai medžiai tampa tankesni ir tikslesni, tikėtina, kad ateityje pavyks išsiaiškinti, kurie archajinės genties PyV nerekombinavę infekavo žmogų. Pagal didžiojo T antigeno palyginius, šiuo metu atrodo, kad Australijos sterbliniai gyvūnai būtų perspektyvi gyvūnų grupė ieškoti archajiškesnių poliomos virusų (Buck ir kt., 2016). Taip pat kol kas nėra modelinio organizmo tirti PyV ir šeimininko ląstelių sąveikoms, todėl svarbios ir papildomų naujų PyV rūšių laukinėje pelėje bei mažuose laboratoriniuose gyvūnuose paieškos. Tokie tyrimai įneštų daugiau aiškumo į šiuo metu ganėtinai panašius PyV teorinius evoliucinius modelius.

1.1.3. PyV infekcija ir molekulinį šaperonų poreikis

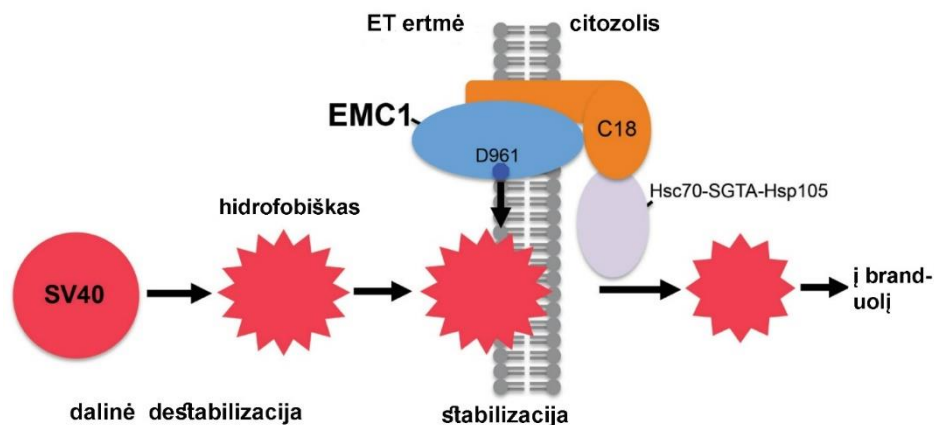
Molekuliniai šaperonai yra pagrindiniai ląstelės baltyminių tinklų komponentai. Šaperonų sudėtingų tarpusavio ir partnerių sąveikų tinklas vadinamas šaperoma, jis užtikrina ląstelės homeostazę. Virusai yra prisitaikę pasinaudoti ląstelės šeimininkės šaperoma. Ne išimtis ir *Polyomaviridae* šeimos nariai.



1.5 pav. Poliomos virusų vystymosi ląstelėje schema. Infekcija prasideda PyV jungiantis su ląstelės pavirčiuje esančiais gangliozidų receptoriais (GT1b ar GD1b) ir/arba N-glikozilintais baltymais turinčiais $\alpha(2,3)$ -sialinės rūgšties liekanų (1). Aktyvuojama endocitozė (2) ir PyV nušėami į ET (3), kuriame kapsidė dalinai suardoma. ET kokybės kontrolės baltymai pažiūsta dalinai suardytą kapsidę kaip neteisingai susivyniojusį baltymą ir virusas pernešamas į citoplazmą (4). Citoplazmoje esant žemai kalcio jonų koncentracijai viruso kapsidė dar labiau suyra ir atidengiami VP2/3 baltymai. Importinas $\alpha/\beta 1$ atpažįsta VP2/3 baltymų paviršiuje esančias NLS ir viruso genomą pernešamas į branduolį (5). Branduolyje persitvarkius viruso DNR prasideda ankstyvojo rajono genų raiška (6). Susintetinti ankstyvieji baltymai pernešami į branduolį ir inicijuoja virusinės DNR replikaciją (7), tuomet vyksta vėlyvųjų genų raiška (8). Po biosintezės struktūriniai baltymai transportuojami į branduolį ir susirenka į kapsidės supakuojant virusinę DNR (9). Virionai palieka ląstelę lizės metu (10), bet dalis virionų gali išeiti iš ląstelės sekretuojamų baltymų pūslelėmis (11). Pagal Helle ir kt., 2017.

Poliomos virusui prisijungus prie ląstelės paviršiuje esančių gangliozidų ir su jais asocijuotų koreceptorų yra aktyvuojama endocitozė. Nors PyV pasižymi skirtingais endocitozės ir citoplazminio transporto keliais, tačiau visi poliomos virusai yra nešami į ET (1.5 pav). Čia viruso kapsidė yra dalinai suardoma. Pentamerus tarpusavyje laikantys disulfidiniai ryšiai yra izomerizuojami ET šaperono disulfido izomerazės ERp29 arba nutraukiami disulfido oksidoreduktazės ERp57 (Schelhaas ir kt., 2007). Dėl izomerazių veikimo išlaisvėjus viriono pentamerų VP1 C-galui pakinta kapsidės

architektūra, tampa pasiekiami hidrofobiniai VP2, VP3 viruso baltymai (Magnuson ir kt., 2005). Kuomet kapsidė pasiekia ET plazminę membraną, jai integruojantis į lipidų dvisluoksnį hidrofobiniai viriono VP2, VP3 baltymai sąveikauja su membraniniu baltymų kompleksu (EMC), vadinamu EMC1 (1.6 pav). EMC1 kartu su membraniniu J baltymu C18, ne tik padeda virusui pereiti per membraną į citozolį, bet ir veikia kaip molekuliniai šaperonai - apsaugo virusą nuo ankstyvo išsiardymo (Bagchi ir kt., 2016). Taip PyV pasiekia ląstelės citozolį vis dar kapsidės pavidalu. Teigiama, kad šiai translokacijai yra svarbus viruso VP3 baltymas (Inoue ir Tsai, 2011). Citozolyje Hsp70-SGTA-Hsp105 molekulinis šaperonų kompleksas dalyvauja membranos pertvarkyme po kapsidės perėjimo, patraukia virusą nuo membranos, šiame procese taip pat dalyvauja DNAJ C18, C12, C14 J-baltymai (Walczak ir kt., 2014). Hsp105 yra esminis šaperonas PyV infekcijai, jis gali keisti kapsidės architektūrą (Ravindran ir kt., 2015). Kiti tyrimai teigia, kad Hsp70 šaperono sąveika su viruso kapside reguliuojama SGTA yra būtina viruso infekcijai, nes ląstelėse nesintetinančiose Hsp70 baltymo PyV kapsidės užstringa ET. PyV gabenimo į branduolį metu nuvelkami struktūriniai baltymai. Yra duomenų, kad kartu keliauja SGTA, nes jis yra aptinkamas ir branduolyje, nors neturi NLS (Dupzyk ir kt., 2017). Branduolyje vyksta transkripcija, viruso DNR replikacija (1.5 pav) (Nakanishi ir kt., 1996). PyV replikacijos metu taip pat yra reikalinga Hsp70 šaperonų pagalba - DNR sintezės fermentų taisyklingam veikimui užtikrinti (Sullivan ir Pipas, 2002). Visi virusai nepaisant jų sudėtingumo naudojami ląstelės šeiminingos baltymų sintezės sistema (Walsh ir kt., 2013), taip pat ir citozolinių baltymų *de novo* lankstyme dalyvaujančiais šaperonais. Eukariotai turi dvi kartu veikiančias skirtingas šaperonų ir košaperonų sistemas: su ribosoma susijungiantį kompleksą RAC ir heterodimerinį kompleksą NAC.



1.6 pav. Poliomos viruso (SV40) transporto iš ir į citozolį modelis (Pagal Bagchi ir kt., 2016).

Visi žinduolių PyV koduojami LTA_g, STA_g, 17kT antigenai iš esmės patys yra viruso koduojami molekuliniai šaperonų J baltymai, galintys stimuliuoti Hsp70 šaperonų ATP-azinių aktyvumą ir skatinti bei stabilizuoti Hsp70 šaperonų sąveikas su substratu. PyV T antigenų J domenai yra konservatyvūs. Pavyzdžiui, molekuliniiais metodais keičiant baltymų J domenus, nustatyta, kad SV40, JCPyV, BKPyV T antigenų J domenas pilnai kompensuoja *E. coli* DnaJ košaperono funkcinį veikimą, svarbų λ fago sintezei (Kelley ir Georgopoulos, 1997). Tas pats PyV J domenas sukeistas su mielių Ydj1p šaperono J domenu buvo pakankamas Ydj1p šaperono funkcionalumui (Sullivan ir Pipas, 2002). T antigenų J domenai yra svarbūs Py viruso atliekamuose transformaciniuose procesuose. LTA_g J domenas inicijuodamas Hsc70 šaperono ATP hidrolizę indukuoja pRb konformacijos pokytį ir pRb-E2F baltymų komplekso išardymą (Andrei ir kt., 2015).

Viruso kapsidės formuojasi branduolyje. VP1, VP2 bei VP3 struktūriniai baltymai yra sintetiniai ląstelės citoplazmoje ir turi būti transportuojami į branduolį (1.5 pav). Visi šie baltymai turi NLS sekas, tačiau be VP1 baltymo VP2 ir VP3 struktūriniai baltymai kaupiasi citoplazmoje dėl neefektyvaus transporto. Šie pastebėjimai leidžia manyti, jog į branduolį visi trys baltymai yra pernešami kaip vienas kompleksas. Greičiausiai VP2 ir VP3 baltymų NLS yra reikalinga viruso infekcijos pradžioje jam patenkant į

branduolį, o VP1 NLS seka yra panaudojama kapsidės formavimo metu. Branduolyje formuojasi pentamerai ir padauginta virusinė DNR yra pakuojama į kapsides. Hsp70 šaperonų šeimos nariai dalyvauja ir virusinių struktūrinių baltymų išlankstyme, ir yra būtini kapsidės susirinkimui (Mayer ir kt., 2005; Bundy ir Swartz, 2011). Pavyzdžiui, bakterijų DnaK šaperonas (Hsp70 analogas) yra svarbus JCPyV VPD produkcijai, tirpumui, teisingam VPD sulankstymui ir biologiniam aktyvumui (Saccardo ir kt., 2014). Kadangi viruso infekcija dažniausiai yra susijusi su J baltymo ir Hsp70 šaperono sąveika, kuriant vaistus prieš PyV infekciją, ieškomi preparatai slopinantys PyV T antigenų J domenu ATP-azini aktyvumą (Manos-Turvey ir kt., 2016). Seniai žinoma, kad Hsp70-J baltymų sistemos neveikia po vieną, bet substratai keliauja nuo vienos šaperonų sistemos prie kitos (Balchin ir kt., 2016). Baltymų sulankstymo ir perlankstymo keliuose Hsp70 sąveikauja su dalinai sulankstytais baltymais ir perneša juos kitoms šaperonų sistemoms.

Poliomos virusų išėjimo iš ląstelės mechanizmas priklauso nuo viruso ir infekuojamų ląstelių tipo. Kai kurie tyrimai atskleidžia, jog virusas suardo ląstelę. Parodyta, jog JCPyV sukelia centinės nervų sistemos ląstelių žūtį, nepriklausomą nuo apoptozės mechanizmų. Vyksta ląstelių nekrozė, virusas išplinta po organizmą (Seth ir kt., 2004). Antra vertus yra duomenų, kad virusas gali palikti ląstelę pasinaudodamas sekretinėmis pūslelėmis (1.5 pav) (Clayson ir kt., 1989).

1.1.4. Poliomos virusų patogeniškumas

Žmonių PyV infekcijos sukeltos ligos (1.1 lentelė) dažniausiai pasireiškia sutrikus imuninės sistemos pusiausvyrai.

1.1 lentelė. Žmogaus poliomos virusai (HPyV), jų atradimo eiliškumas ir sąsajos su patologijomis (Pagal Calvignac-Spencer ir kt., 2016).

Rūšis	Gentis	Viruso pavadinimas	Trumpinimas	Atradimo metai	Siejamos ligos
HPyV1	Beta	BK poliomos virusas	BKPyV	1971	Su poliomos virusu susieta nefropatija
HPyV2	Beta	JC poliomos virusas	JCPyV	1971	PML
HPyV3	Beta	Karolinkos instituto poliomos virusas	KIPyV	2007	Kvėpavimo takų infekcijos (?)
HPyV4	Beta	Vašingtono universiteto poliomos virusas	WUPyV	2007	Kvėpavimo takų infekcijos (?)
HPyV5	Alpha	Merkelio ląstelių poliomos virusas	MCPyV	2008	Merkelio ląstelių karcinoma
HPyV6	Delta	Žmogaus poliomos 6 virusas	HPyV6	2010	Diskeratotinė dermatozė
HPyV7	Delta	Žmogaus poliomos 7 virusas	HPyV7	2010	Diskeratotinė dermatozė
HPyV8	Alpha	Trichodysplasia spinulosa poliomos virusas	TSPyV	2010	Trichodysplasia spinulosa
HPyV9	Alpha	Žmogaus poliomos 9 virusas	HPyV9	2011	Nežinoma
HPyV10	Delta	Malavio poliomos virusas	MWPyV	2012	Nežinoma
HPyV11	Delta	Sent Luiso poliomos virusas	STLPyV	2013	Nežinoma
HPyV12	Alpha	Žmogaus poliomos 12 virusas	HPyV12	2013	Nežinoma
HPyV13	Alpha	Naujojo Džersio poliomos virusas	NJPyV	2014	Nežinoma
HPyV14	?	Lyon IARC poliomos virusas (Gheit ir kt., 2017)	LIPyV	2017	Nežinoma

BKPyV gali sukelti nefropatiją pacientams po inkstų transplantacijos, kuri siejama su hemoraginiu cistitu (Hirsch, 2005). Taip pat BKPyV gali sukelti encefalitą ir meningitą esant supresuotam imunitetui (Chittick ir kt., 2013). JCPyV sukelia progresyvią multilokalinę leukoencefalopatiją (PML), JCPyV infekuoja oligodendrocitus, astrocitus ir lemia jų demielinizaciją (Gheuens ir kt., 2013). Net 5 % AIDS ligonių pasireiškia PML, kaip komplikacija (Johns ir kt., 2011). Nuo 20 % iki 50 % PML pacientų mirtingumo laikotarpis yra trys mėnesiai (Brew ir kt., 2010). Įdomu, kad BKPyV ir JCPyV koduoja VP4 baltymą, kuris panašus į SV40 VP4 baltymą siejamą su ląstelės lize (Daniels ir kt., 2007) ir SV40 rezus beždžionėms sukelia į PML panašią ligą. Nors yra ieškoma BKPyV sąsajų su prostatos vėžiu (Keller ir kt., 2015) ir inkstų karcinoma (Kenan ir kt., 2017), JCPyV su gaubtinės žarnos vėžiu (Ramamoorthy ir kt., 2011), o HPyV7 DNR ir LTA_g sintezė aptikta čiobreliaukės epitelio augliuose (Rennspiess ir kt., 2015), bet kol kas, patvirtintas tik MCPyV kancerogeniškumas (Toptan ir kt., 2016). MCPyV sukelia retą bet agresyvią odos vėžio formą – Merkelio ląstelių karcinomą. Nuo 1986 m. iki 2001m. Amerikoje pagal turimus 9 valstijų ligų registrų duomenis 1124 karcinomų atvejų yra susieti su MCPyV, t.y., 0,15 - 0,44 atvejų iš 100000. Per analizuotą laikotarpį sergamumas augo 8 % per metus. Daugiausiai Merkelio karcinomos atvejų nustatyta virš 70 metų amžiaus pacientų grupėje (Hodgson, 2005). MCPyV koduoja ALTO baltymą, siejamą su žmogaus ląstelių signalinių kelių manipuliacijomis ir vėžio vystymusi (Carter ir kt., 2013). Be to, MCPyV STA_g indukuoja centrosomos daugkartinį dvigubėjimą, aneuploidiją, chromosomų nestabilumą ir mikrobranduolio formavimąsi (Kwun ir kt., 2017). Panašiai meškėno PyV gali transformuoti ląstelę šeimininkę ir taip sukelti piktybinius meškėno smegenų auglius (Dela Cruz ir kt., 2013). Vis dėlto tai laikoma išimtinė savybe tarp žinduolių PyV, nes apie 80 % Merkelio ląstelių karcinomų augliuose randamas integruotas MCPyV genomai (Feng ir kt., 2008), dažniausiai tik LTA_g ir ST antigenus koduojančios sekos (DeCaprio, 2017). Analizuojant MCPyV geno sekas, išskirtas iš Merkelio karcinomų ląstelių, LTA_g pasižymėjo mutacija geno

pabaigoje, kuri neaptikama MCPyV genomų sekose išskirtose iš sveikų audinių. Ši LTA_g mutacija neįtakoja supresorinių LTA_g savybių, bet panaikina viruso DNR replikacijos galimybę, nes MCPyV nėra keliaujantis virusas ir antriniu būdu neužkrėčia kitų ląstelių (Shuda ir kt., 2008). Merkelio metastazuojančios karcinomos ląstelių linijos LoKe tyrimai atskleidė, kad sutrumpinto LTA_g tikslas yra slopinti Rb baltymo veiklą (Hesbacher ir kt., 2016). Lėtinei viruso infekcijai palaikyti pasitelkiamos ląstelės SCF E3 ubikvitino ligazės, kurios fosforilindamos evoliuciškai konservatyvias LTA_g baltymo vietas reguliuoja jo degradaciją ir užtikrina pastovaus lygio palaikymą (Kwun ir kt., 2017). Pademonstruota, kad MCPyV STA_g gali jungtis su baltymų fosfatazės PP2A B suvienetu, taip slopindamas jos veikimą (Kwun ir kt., 2015). Šios fosfatazės slopinimas lemia MAP kinazės signalinio kelio pokyčius ir ląstelės proliferaciją (Chen ir kt., 2007). Reikia pabrėžti, kad Merkelio karcinomos ląstelėse nustatoma nemažai papildomų somatinių mutacijų, kurioms kooperuojantis su viruso koduojamų antigenų poveikiu ir pasireiškia šio viruso kancerogeniškumas (DeCaprio ir kt., 2017).

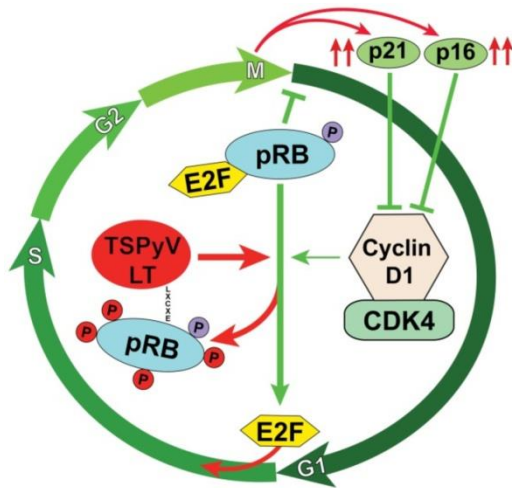
Pateikiama tvirtų įrodymų, kad WU poliomos virusas susijęs su kvėpavimo takų (plaučių ir trachėjos audinių) infekcija, pasireiškusia pacientei po kaulų čiulpų persodinimo operacijos (Siebrasse ir kt., 2016). KIPyV identifikuotas pilnai nustačius genomo seką sveiko žmogaus nosies audiniuose ir, taip pat kaip WUPyV, potencialiai susietas su ūmia kvėpavimo takų infekcija (Dehority ir kt., 2016). Atrastas naujas žiurkių poliomos virusas (RatPyV2), pasižymintis dideliu VP1 panašumu į WU ir KI PyV VP1, sustiprina įžvalgas apie galimą su WU ir KI PyV susijusį patogeniškumą (Rigatti ir kt., 2016). RatPyV2 buvo išskirtas iš žiurkių su sunkiu T ląstelių imunodeficitu, susijusiu su X chromosoma, seilių liaukų, naudojant žmonių poliomos virusų antikūnų imunohistocheminį testą (P-PIT). RatPyV2 buvo aptiktas įvairiuose seilių liaukų infekcija sergančių žiurkių organuose: plaučių bronchiolėse, trachėjoje, sėkliniame latake, prostatoje, kiaušintakiuose. Kadangi RatPyV2 pasižymi dideliu panašumu į WUPyV ir sukelia panašius

klinikinius simptomus, gali būti, kad ir WUPyV galėtų panašiai paveikti imunosupresuotą infekuoto paciento organizmą (Siebrasse ir kt., 2016).

2015 m. HPyV7 taip pat buvo susietas su klinikiniais simptomais - epidermio hiperplazija pasireiškiančia po imunosupresinės terapijos (Ho ir kt., 2015). Vėliau nustatyta ir HPyV6 sąsaja su dermatologinėmis ligomis. HPyV6 buvo aptiktas dviejų vyrų, kenčiančių nuo niežtinčių, gausių bėrimų, mėginiuose. Įdomu, kad vienas iš pacientų tyrimo metu nebuvo imunosupresuotas. HPyV6 ir HPyV7 sukeltus odos pakitimus buvo pasiūlyta apibūdinti kaip diskeratotinę dermatozę (Nguyen ir kt., 2016).

TSPyV sukelia *Trichodysplasia spinulosa* - retą odos ligą, pasireiškiančią organizmo imunosupresijos sąlygomis (van der Meijden ir kt., 2010). Būdingi požymiai - keratino išaugos, papilės, neproporcingai padidėję plaukų folikuliniai mazgeliai ypač veido srityje bei odos sustorėjimas (Matthews ir kt., 2011). Kadangi šie požymiai nustatomi gana jauniems imunosupresuotiems individams, siūloma, kad *Trichodysplasia spinulosa* pasireiškia esant šio viruso pirminei infekcijai (van der Meijden ir kt., 2017). TSPyV koduojami LTA_g galimai pakeičia keratino ląstelių ciklą ir taip lemia jų netvarkingą dalinimąsi (Kazem ir kt., 2014). TSPyV LTA_g baltymas per LXCXE motyvą turi galimybę jungtis prie pRb-E2F komplekso ir išlaisvinti E2F transkripcijos faktorių, atsakingą už ląstelės ciklo baltymų raišką. Žinomas labai panašus mechanizmas, kuomet žmogaus papilomos viruso HPV16 onkogeninis baltymas E7 jungiasi su pRb ir jį suardydamas netiesiogiai kontroliuoja ląstelės ciklo perjungimą (Malanchi ir kt., 2004). Tikslus TSPyV patogeninis mechanizmas nėra išaiškintas. *Trichodysplasia spinulosa* ligos paveiktose plaukų folikulų šerdies ląstelėse imunohistocheminiu metodu buvo aptiktas gausus fosforilinto pRb baltymo kiekis ir su LTA_g sinteze susijęs padidėjęs p16^{ink4a} ir p21^{waf} ląstelės ciklo reguliacinių baltymų kiekis (Kazem ir kt., 2014). 1.7 paveiksle pateikiama TSPyV LTA_g baltymo sintezės poveikio ląstelės ciklui hipotetinė schema. Retinoblastomos šeimos baltymai (pRb, p107, p103) reguliuoja ląstelės DNR sintezę ir perėjimą iš G1 į S ciklo fazę. TSPyV viruso LTA_g prisijugimo įtakotas padidėjęs pRb fosforilinimas

išlaisvina E2F baltymą, kuris aktyvina ląstelės ciklo baltymų p16^{ink4a} ir p21^{waf} sintezę. Pastarieji baltymai slopina ciklino-D1/CDK4 komplekso veikimą ir taip ląstelė praranda mechanizmą stabdyti savo ciklą G1 fazėje. Esant gausniam keratino ląstelių kiekiui TSPyV virusas gali efektyviau daugintis. TSPyV LTA_g ir p53 baltymo sąveika dar nebuvo nustatyta.



1.7 pav. TSPyV didžiojo antigeno (LTA_g) sintezės įtakojamas hipotetinis ląstelės ciklo reguliacijos scenarijus. Pagal Kazem ir kt., 2014.

Naujausiais duomenimis, analizuojant TSPyV genomų sekas, kurios buvo išskirtos iš 13 Trichodysplasia spinulosa pacientų kraujo (ši imtis sudaro 40 % visų pasaulyje aprašytų atvejų), nustatytos įvairios variacijos. Be pokyčių nekoduojančiame regione nustatytos variacijos ir keturiose kitose TSPyV geno vietose, įskaitant konservatyvų 5 atvirą skaitymo rėmelį (ASR5), jo persidengimo vietoje su ASR2. Trys iš keturių nesinoniminių pakaitų buvo C/T antrojoje kodono pozicijoje konservatyvioje ASR5 vietoje, pasikeičiant Val į Ala koduojamame ALTO baltyme ir vidutiniame T antigene (MT) (Kazem ir kt., 2016). Analogiškas kodonų perjunginėjimas vyksta ir graužikų PyV (MPyV ir HaPyV) vidutiniame T antigene (MT), kuris atsakingas už ląstelės transformacijos procesus (Cheng ir kt., 2009). Šis ASR5 yra filogenetiškai susietas su kitais geno regionais, lėmusiais jų divergenciją, daugumoje *Ortho* genties PyV (Carter ir kt., 2013; Lauber ir kt., 2015). Tai rodo, kad vyksta savotiška vidurūšinė evoliucija šeimininko organizme, svarbi viruso adaptacijai ir patologijai.

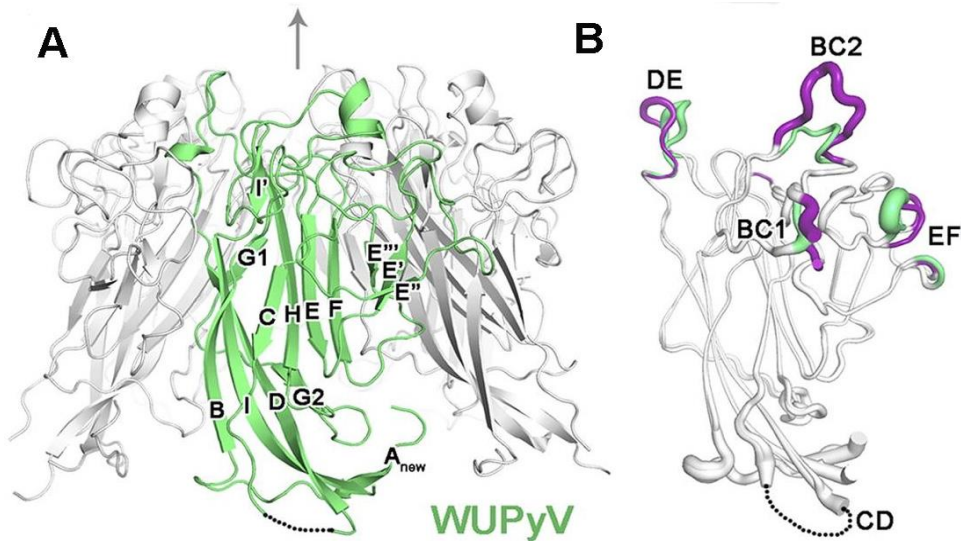
Paukščių PyV (APyV) gali replikuotis įvairiuose organuose ir tuo skiriasi nuo žinduolių PyV (Johne ir kt., 2011). APyV (BFDPV) sukelia paukščiams vidinį kraujavimą, silpnumą ir žūtį, bet natūraliomis sąlygomis nėra viena paukščių PyV infekcija nesukelia auglių. Vis dėlto paukščių PyV nėra praradę transformacinių savybių: APyV (BFDPV) *in vitro* sąlygomis geba transformuoti žiurkėno embriono ląsteles (Lehn ir Muller, 1986).

Sutrikęs ląstelinis imuninis atsakas ir sumažėjęs B ląstelių imuninis aktyvumas gali paskatinti PyV infekciją, kaip yra pademonstruota tiriant BK ir JC poliomos virusus (Wiedinger ir kt., 2014). Gossai ir kolegų tyrime HPyV9 paplitimas koreliuoja su rūkymu, kaip imunosupresiniu veiksmu (CD4+ T ir B proliferuojančiųjų ląstelių mažesnis skaičius) arba rūkančiojo organizmo kvėpavimo trakto struktūriniai pakitimai yra palankesni PyV infekcijai. Taip pat teigiama, kad PyV infekcijos yra susijusios su limfocitų sąstato pokyčiais. Asmenys, turintys anti-BKPyV ar anti-HPyV9 Ak, turi mažiau CD8+ T ląstelių, bet daugiau B ląstelių. Vis dėlto šie skirtumai yra nedideli ir tirtoje Amerikos populiacijoje aukšti anti-BKPyV, anti-JCPyV ir anti-HPyV9 titrai statistiškai patikimai nekoreliavo su imuninių ląstelių sąstato pokyčiais (Gossai ir kt., 2016). Kitame tyrime, kuriame dalyvavo žmonės sergantys progresuojančia multifokaline leukoencefalopatija, anti-JCPyV specifinis T ląstelių (CD8+) atsakas koreliavo su pacientų išgyvenamumu (Khanna ir kt., 2009). T ląstelių aktyvaciją slopinantys imunosupresuojantys vaistai, skiriami po transplantacijų, yra siejami su PyV sukelta nefropatija. Trusch su kolegomis nustatė aukštesnį anti-HPyV9 Ak kiekį pacientų po hemopoetinių kamieninių ląstelių transplantacijos kraujo serumuose lyginant su sveikų asmenų kraujo serumais, bet tai gali būti susiję ir su Ak pernaša transplantacijos metu (Trusch ir kt., 2012). Naujų HPyV *in situ* hibridizacijos ar patologiškų organų biopsijų imunohistochemijos tyrimai turėtų ateityje suskirstyti HPyV į galimai patogeniškus ir tiesiog nežalingus žmogaus palydovus.

1.1.5. Žmogaus poliomos virusų serologiniai tyrimai

PyV su šeimininko organizmu susiję simbiotiniais ryšiais, tačiau nėra aišku, koku būdu pasireiškia nauda abiem partneriams. Poliomos virusų paplitimo tyrimams seniausiai naudojamas serologinis metodas – hemagliutinacijos inhibicija. Jis buvo naudotas iki 2003 m. Ak prieš JCPyV ir BKPyV nustatymui žmogaus kraujo serume. Šis metodas remiasi kraujo serume esančių anti-JCPyV ar anti-BKPyV specifinių Ak prisijungimu prie viruso pagrindinio kapsidės baltymo, ir dėl to nebevykstančia šių virusų sukeliama eritrocitų hemagliutinacija. Šiuo metu žmogaus PyV paplitimo tyrimams naudojama imunofermentinė analizė (IFA). IFA analizė yra jautresnis metodas, nei hemagliutinacijos testas. Daugiausia anti-HPyV antikūnų nustatymui naudojamas VP1 baltymas, nes LTA_g pasižymi labai žemu imunogeniškumu (Bodaghi ir kt., 2009), nors jo sintezė vyksta ir ankstyvosios ir vėlyvosios viruso genų raiškos metu. Gali būti, LTA_g, kaip reguliacinis virusinis baltymas yra nepasiekiamas imuninei sistemai ir dėl šios savybės nėra tinkamas PyV serologinio aktyvumo nustatymui. Agno baltymas taip pat yra silpnas antigeninis žymeklis (Leuenberger ir kt., 2007), be to jį sintetina ne visi žmogaus PyV. Pagrindinis PyV baltymas, prieš kurį susiformuoja imuninis atsakas - išorinis kapsidę formuojantis VP1 (Imperiale ir Major, 2007). Mažieji kapsidės baltymai VP2 ir VP3, dėl savo lokalizacijos viriono vidinėje dalyje, nėra antikūnų pasiekiami taip efektyviai (Norkin ir kt., 2002). Kristalografinė WUPyV ir KIPyV VP1 baltymų analizė (Neu ir kt., 2011) atskleidė, kad šių žmogaus PyV pentamerų struktūrai būdingos β -grandinės jungiančios, baltymo išorę sudarančios pagrindinės keturios kilpos (1.8 pav B). Pentamerų paviršius, sudarantis viriono išorinį paviršių, susideda iš ilgos variabiliausios BC kilpos, kuri skirstoma į BC1 ir BC2 dalis, pasuktas priešingomis kryptimis. Pentamerų šonuose yra EF kilpos, kurių dalys formuoja mažas trigrandines β -klostes. Kiekvieno VP1 monomero BC1, BC2, DE ir HI paviršiaus kilpos besijungdamos su β -klostėmis ir α -spiralėmis suformuoja iš esmės visą viriono paviršių (1.8 pav B). Šių kilpų variacijos yra atsakingos už virulentiškumą, antigeniškumą, jos sąveikauja su ląstelės

receptoriais (Stehle ir Harrison, 1997; Neu ir kt., 2008). VP1 baltymo sekoje buvo nustatyta grupė mutacijų, kurios įtakoja viruso patogeniškumą (Dugan ir kt., 2007) ir išgyvenamumą kamieninėse kepenų ląstelėse (Tremolada ir kt., 2010).



1.8 pav. WUPyV VP1 pentamero (A) ir monomero (B) kristalinių struktūrų schemas. β -klostės sužymėtos iš eilės raidėmis pagal SV40 struktūrą. WUPyV VP1 schemoje (A) žalia spalva paryškintas monomeras, tarp dviejų šoninių pilkų monomerų. Pilka rodyklė nurodo simetrijos ašį. Atskiro monomero schemoje (B) variabilios kilpos pažymėtos violetine spalva (pagal Neu ir kt., 2011)

IFA atliekama naudojant VP1 baltymą, kaip antigeną, pentamerų arba VPD pavidalu (Moens ir kt., 2013). Pademonstruota, kad naudojant VPD, kaip padengiantį antigeną, IFA yra jautresnė ir specifiškesnė, nei monomerų ar pentamerų forma (Bodaghi ir kt., 2009; Sroller ir kt., 2015).

Antikūnų prieš HPyV paplitimo suaugusių žmonių kraujo serumo mėginiuose įvairiose šalyse duomenys apibendrinti 1.2 lentelėje. Vidutiniškai apie 80 % pasaulio žmonijos populiacijos yra susidūrę su HPyV ir turi kraujo serumuose cirkuliuojančių IgG antikūnų prieš įvairius HPyV tipus. Akivaizdžiai išsiskiria antikūnų prieš HPyV12 sąlyginai nedidelis bendras paplitimas. Šis virusas nuo kitų HPyV skiriasi ir tuo, kad jo LTA_g neturi LXCXE motyvo, kuris reikalingas nuo retinoblastomos baltymo priklausomam

vėžinės transformacijos aktyvumui pasireikšti. HPyV12 atradėjų manymu, šis virusas galimai nėra patogeniškas (Korup ir kt., 2013).

1.2 lentelė. Antikūnų prieš žmogaus poliomos virusų VP1 baltymą paplitimas sveikų suaugusiųjų žmonių kraujo serumo mėginiuose.

Virusas	Seroteigiamas aktyvumas	Naudota literatūra
HPyV1 (BKPyV)	55-90 %	Kean ir kt., 2009; Lundstig ir Dillner, 2006; Moens ir kt., 2013
HPyV2 (JCPyV)	44-90 %	
HPyV3 (KIPyV)	55-91 %	Gossai ir kt., 2016; Kean ir kt., 2009; Neske ir kt., 2010; Nguyen ir kt., 2009
HPyV4 (WUPyV)	69-98 %	
HPyV5 (MCPyV)	58-96 %	Gossai ir kt., 2016; Kean ir kt., 2009; Nicol ir kt., 2013; Pastrana ir kt., 2009, van der Meijden ir kt., 2013; Zhang ir kt., 2014
HPyV6	67-98 %	Ehlers ir Wieland, 2013; Gossai ir kt., 2016; Nicol ir kt., 2013; Schowalter ir kt., 2010; van der Meijden ir kt., 2013, Sroller ir kt., 2015
HPyV7	35-86 %	
HPyV8 (TSPyV)	70-84 %	Gossai ir kt., 2016; Nicol ir kt., 2013; Pedergnana ir kt., 2017; van der Meijden ir kt., 2013; 2011; Sroller ir kt., 2015
HPyV9	20-70 %	Ehlers ir Wieland 2013; Gossai ir kt., 2016; Nicol ir kt., 2013; 2012; Trusch ir kt., 2012; van der Meijden ir kt., 2013; Sroller ir kt., 2015
HPyV10 (MWPyV)	42-99 %	Berrios ir kt., 2015; Gossai ir kt., 2016, Nicol ir kt., 2014
HPyV11 (STLPyV)	68-70 %	Lim ir kt., 2014
HPyV12	23-33 %	Ehlers ir Wieland 2013; Korup ir kt., 2013
HPyV13 (NJPyV)	-	-
HPyV14	-	-

Taip pat stebimas mažesnis anti-HPyV9 Ak paplitimas (1.2 lentelė). Kol kas nėra publikuotų duomenų apie antikūnų prieš neseniai identifikuotus HPyV13 ir HPyV14 nustatymą kraujo serume.

Bendra tendencija, kurią rodo žmogaus PyV serologiniai tyrimai – ankstyva pirminė infekcija ir su amžiumi didėjantis seroteigiamų mėginių skaičius (Kean ir kt., 2009; Chen ir kt., 2011; Viscidi ir kt., 2011; Nicol ir kt., 2013; 2014; Gossai ir kt., 2016). Žmogaus PyV koinfekcija keliais viruso tipais taip pat yra dažnas atvejis (Gossai ir kt., 2016). Įvairių tyrimų grupių duomenimis skiriasi anti-HPyV Ak kryžminis aktyvumas, antigenu naudojant VP1 baltymą (Viscidi ir Clayman, 2006; Moens ir kt., 2013). Kryžmiškai reaguojantys antikūnai nustatomi prieš HPyV6 ir HPyV7 (Nicol ir kt., 2013), IFA antigenu naudojant ir VPD išgrynintas iš vabzdžių ląstelių, ir paraleliai naudojant VP1 su GST inkaru išgrynintas iš bakterijų ląstelių (Sroller ir kt., 2015). Kryžminis reaktyvumas pademonstruotas tarp BKPyV ir JCPyV (sekos identiškios 69 %), ir KIPyV ir WUPyV (sekos identiškios 66 %) (Moens ir kt., 2013). Artimas ar. sekų panašumas ypač pagrindinėse paviršinėse kilpose, gali lemti kryžminių Ak susiformavimą. Evoliucijos mechanizmų palaikomos žmogaus PyV paviršinių kilpų domenų ar. sekų variacijos, įvairesni imunologiniai epitopai, suteikia sąlygas PyV koinfekcijoms (Carter ir kt., 2003). Serologiniai duomenys gali būti iškraipomi ir dėl Ak kryžminio aktyvumo prieš dar nežinomus PyV. Pavyzdžiui prieš 30 metų kelios tyrimų grupės nustatė jog 30 % žmonių kraujo serumų turi Ak prieš beždžionės poliomos virusą LPV (Brade ir kt., 1981; Takemoto ir Segawa, 1983; Kean ir kt., 2009). O dabar parodyta, kad šią anti-LPV seroteigiamą reakciją lemia žmogaus kraujo serume cirkuliuojantys anti-HPyV9 Ak (Trusch ir kt., 2012), nes genetiškai bei serologiškai LPV ir HPyV9 yra panašūs virusai, jų VP1 baltymo ar. sekos panašios 84 % (Moens ir kt., 2013). Taigi, Ak prieš naujus ne žmogaus PyV aptikimas žmogaus kraujo serume vertinamas gana atsargiai. Teigiama, jog žmogus gali turėti daugiau žmogaus PyV, artimų šimpanzių PyV, nes analizuojant žmonių kraujo serumus IFA metodu, naudojant šimpanzių PyV VP1 antigenus, nustatytas dažnas teigiamas serologinis

signalas, nors tarp šimpanzių PyV VP1 ir HPyV VP1 kryžminis aktyvumas nenustatytas (Scuda ir kt., 2013).

1.2. Mielių *Saccharomyces cerevisiae* raiškos sistema

Prieš 6-8 tūkstančius metų senovės civilizacijos pritaikė mieles fermentuotų, raugintų produktų gamyboje. *S.cerevisiae* labiausiai išanalizuota ir išnaudota mielių rūšis (iš 700), kurios genomą sudaro 16 chromosomų, apie 5700 baltymus koduojančių genų ir kuri priklauso vienaląsčių grybų - askomicetų grupei. *S.cerevisiae* mielės buvo pirmasis eukariotinis organizmas, kurio pilna genomo seka buvo nustatyta (Goffeau ir kt., 1996). Visi mielių genomo projekto duomenys nuolat pildomi ir yra prieinami internetinėse duomenų bazėse (Eukariotų promotorių, SGD). Tad *S.cerevisiae* ne veltui yra vadinama eukariotine *Escherichia coli*.

Pirmosios žmogui naudoti patvirtintos vakcinos prieš hepatito B ir papilomos virusą yra produkuojamos mielių ląstelėse (De Wilde ir kt., 1985; Shouval ir kt., 2003; Bryan, 2007). Šiuo metu rinkoje yra net 12 mielėse gaminamų komercinių profilaktinių vakcinų, patvirtintų naudoti žmogui (Bill, 2015), taip pat yra kuriama nauja oralinės imunizacijos strategija. Jos esmė - vientisa terapinė mielių vakcina, kuri išnaudoja mielių ląstelės sienelės β -glikanų (β -D-gliukozės polisacharidų) adjuvantines savybes ir viduląstelių heterologinių antigenų raiškos (King ir kt., 2016), ar net eksponavimo ląstelės paviršiuje galimybes (Upadhyaya ir Manjunath, 2009). Klinikiniuose tyrimuose naudojamos ir įvairios priešvėžinės terapinės mielių vakcinos su augliui specifiniais antigenais (membraniniais onkobaltymais, diferenciacijos, augimo faktoriais) sukelia specifinį stiprų ląstelinį imuninį atsaką, ir sėkmingai derinamos su chemoterapija (Ardiani ir kt., 2010; Roohvand ir kt., 2017). Reikia paminėti, kad penktadalis šiuo metu komerciškai prieinamų biofarmacinių preparatų produkuojama mielių ląstelėse, didžioji dalis *S.cerevisiae* ląstelėse (Nielsen ir kt., 2013). Esminiai *S.cerevisiae*, kaip raiškos sistemos, plusai yra (1) įvairūs episominių, integruojamų, reguliuojamo kopijų

skaičiaus vektorių pasirinkimas, (2) plati auktrofinių mutantinių kamienų paletė, (3) indukuojami, supresuojami, konstitutyvūs promotoriai, (4) greitas augimas, gerai išnagrinėta fermentacija ir tolimesnės procedūros, (5) aukšta baltymų sintezės išeiga, (6) galimybė produkuoti etanolį arba jį skaidyti, (7) eukariotams būdingi potransliaciniai mechanizmai, (8) saugumas (GRAS statusas), endotoksinų nebuvimas (Roohvand ir kt., 2017). O pagrindinis minusas – glikozilinimo procesų skirtumai nuo aukštesniųjų eukariotų. Pirmieji N-glikozilinimo etapai mielėse vyksta panašiai kaip aukštesniuose eukariotuose (Choi ir kt., 2003), bet Goldžio komplekse (GK) vyksta daugiamanozinis glikozilinimas. Tinkamai humanizuojant mielių glikozilinimo kelius išsiplėstų ne tik žmonių glikobaltymų produkcijos galimybės, bet galimai pagerėtų sekrecija baltymų, kurių aktyvumui glikozilinimas nėra esminis funkcinis faktorius. Tuo tikslu sparčiai tobulinami *S.cerevisiae* mielių kamienai, kurių GK mielėms būdingas O-manozilinimas keičiamas žmogaus ląstelėms būdingu sudėtingesniu O- ir N-glikoziliniu (Abe ir kt., 2016). Sintetinės biologijos darbai norint modifikuoti mielių raiškos sistemas atliekami kryptingai perkeliant genus pasižyminčius naujomis funkcijomis ir/arba pašalinant nenorimus genus. Pavyzdžiui, heterologinių baltymų, kurie jautrūs proteazių veikimui, sintezei sukurti *S.cerevisiae* kamienai be atitinkamų proteazių (Cho ir kt., 2010). Padidinti rekombinantinių baltymų gryninimo išeigą bandoma ir kuriant sekrecinius mielių mutantus. Pirmasis genas, kurio iškrita lėmė padidintos sekrecijos fenotipą, buvo *S.cerevisiae* *PMR1* genas (Smith ir kt., 1985). *PMR1p* baltymas yra GA Ca^{2+} ir Mn^{2+} jonų kanalo dalis, jo indėlis dvejopas, nes Ca^{2+} svarbus baltymų rūšiavimui, o Mn^{2+} - glikozilimui. Tobulinant mielių sekrecinį kelią svarbus dėmesys tenka ir šaperonų ir jų košaperonų perprodukavimui. Pavyzdžiui, *S.cerevisiae* *KAR2* geno raiškos sustiprinimas, kai produkto BiP šaperono padaugėjo dešimteriopai, padidino sekretuojamo jaučio prochimozino kiekį 20 kartų. Bandymai dar labiau padidinti BiP šaperono kiekį davė neigiamus rezultatus (Harmsen ir kt., 1996), parodydami ląstelės-šeimininkės atsako į modifikacijas svarbą. Kartais dėl heterologinių baltymų savybių ar nepakankamo kurio nors fermento ląstelėje

šeimininkėje kiekio tam tikra jo sintezės stadija smarkiai sulėtina visos sintezės greitį ir heterologinio baltymo išėigas ir sukuriama "butelio kaklelio" efektas (Idiris ir kt., 2010). Didelio našumo technologijų panaudojimas, ląstelės šeimininkės transkriptomo analizė (Bonander ir kt., 2005; 2009), proteomikos, metabolomikos duomenų bazės, *S.cerevisiae* neesminių genų mutantų ir yTHC kolekcijų panaudojimas leido pagreitinti mielių mutacijų, pagerinančių norimų baltymų sintezę, paieškas.

1.3. Mielės – modelinis organizmas virusų tyrimams

S.cerevisiae ląstelė yra modelinė sistema augalų, gyvūnų ir žmogaus virusų tyrimams. Visų pirma dėl to, kad mielių ląstelė prisitaikiusi prie savų virusų: dvigrandės RNR ir teigiamos viengrandės RNR virusų ir retrotranspozoninių elementų (El-Sherbeini ir Bostian, 1987). Efektyvių antivirusinių strategijų kūrimui, viruso ir šeimininko sąveikų prigimties supratimas vaidina labai svarbų vaidmenį. Replikacijos ir transkripcijos tyrimai mielių ląstelėse prasidėjo nuo augalų Bromo mozaikos viruso (BMV) (Janda ir Ahlquist, 1993). Mielėse virusų replikacijos eksperimentai yra paprastesni, greitesni, todėl šis įrankis buvo pritaikytas kitų augalų RNR virusų replikacijos tyrimams, pavyzdžiui, gvazdikų itališkosios žieduotosios dėmėtligės viruso (Pantaleo ir kt., 2003), pomidorų krūminių išaugų viruso (Panavas ir Nagy, 2003), orchidėjos *Cymbidium* dėmėtligės viruso (Rubino ir kt., 2007), *Tombusvirus* (Panavas ir kt., 2005) arba žinduolių RNR virusų, t.y., avių viruso (angl. Flock House virus) (Price ir kt., 1996), HCV (Masek ir kt., 2007). Mielėse repikuoja virusai, kurių genomą sudaro teigiama viengrandė arba dvigrandė RNR grandinė. Teigiama viengrandė RNR tarnauja kaip informacinė RNR viruso baltymų transliacijai ir kaip matrica replikacijai. Abiejų šių procesų sklandžiai veiklai ir suderinamumui yra būtina ląstelės šeimininkės reguliacinių baltymų pagalba. Išanalizavus daugelio teigiamos RNR grandinės genomo virusų sintezę mielių ląstelėje nustatyti bendri virusų pasidauginimo bruožai. Virusų replikacijai yra būtina nuo RNR priklausma viruso RNR polimerazė, kuriai sintetinti panaudojamos mielių vektorinės

sistemos. Virusų RNR su autentiškais virusui galais gali būti tiesiogiai transfekuojama į ląstelę arba mielės ląstelėje transkribuojama nuo plazmidinės DNR. Replikacijos efektyvumas tikrinamas Northern blotingo pagalba, arba matuojant reporterinio geno, esančio viruso RNR sekoje, sintezės efektyvumą. Labai pasiteisina kelių mielių vektorių sistemos, nes suteikia galimybę keisti ir kontroliuoti pagalbinių virusų ar kitų baltymų sintezę atsižvelgiant į viruso gyvenimo ciklą. Ieškant antivirusinių taikinių sėkmingai pritaikomos mielių mutantų kolekcijos, atsirenkant mielių genų iškritas, kurios slopina tikrinamo viruso baltymo pavyzdžiui, polimerazės ar helikazės sintezės sukeliama pokytį viruso RNR replikacijai (Galao ir kt., 2007).

Mielių ląstelėse replikacijos tyrimai sėkmingai atlikti ir virusų, kurių genetinė medžiaga yra DNR, pavyzdžiui, Indiškojo pupelių geltonosios mozaikos virusų (Raghavan ir kt., 2004), žmogaus papilomos virusų (HPV) (Angeletti ir kt., 2002), jaučių papilomos virusų (Zhao ir Frazer, 2002) bei adeno asocijuotų virusų (AAV). AAV infekcijos ciklo biologija nuosekliai išstudijuota mielių ląstelėse dėl šių virusų genų pernašos vektorių galimo pritaikymo genų terapijoje. Nustatyti ląstelės šeiminkės faktorius įtakojančius viruso išgyvenimo efektyvumą aukštesniųjų eukariotų ląstelėse yra nelengva užduotis. *S.cerevisiae*, kaip paprasta eukariotinė ląstelė yra puiki modelinė platforma tirti AAV biologiją ir AAV vektorių produkciją. Cervelli su kolegomis pademonstravo mielėse pilnos viengrandės AAV DNR formavimosi galimybes iš dvigrandės plazmidinės DNR, naudojant ITR sekų apsuptą *URA3* geną, kurio sintezė priklausė nuo Rep baltymų. Šiuo tyrimu buvo paneigtas AAV episominės DNR formavimosi replikacijai vykstant nuo DNR plaukų segtuko struktūros modelis, parodyta, kad Rep68 baltymas jungiasi prie ITR sekų ir perkerpa vieną plazmidinės DNR grandinę, kuri ir inicijuoja replikaciją. Replikacijos metu dalinai viengrandė DNR suformuoja segtuko struktūrą, kurią gali išlaisvinti Rep baltymas kirpdamas antrą ITR seką. Šiuo kirpimu paskatinamas grandinės pakeitimas, perkirptoji grandinė tampa matricine ir tuomet replikacijos šakutė juda per vektoriaus DNR kol vėl pasiekia ITR seką. Galutiniam variante susiformuoja dviejų tipų viengrandės

DNR turinčios tik po vieną pilno ilgio ITR. Teigiama, jog AAV gali koreguoti ITR sekų skaičių, formuojantis DNR rankenos struktūrai kuomet viengrandė pilna ITR seka apverčiama ir gali inicijuoti antrosios atitaisymą. *In vitro*, nors ir nesiformuojant segtuko stuktūrai, ITR tarnauja kaip ląstelinis replikacijos inicijatorius (Cervelli ir kt., 2011). Taigi, mielių pritaikymas leidžia studijuoti viruso produkcijos ląstelinius procesus, apeinant tikslinės genų terapijos apribojimus.

AAV kapsidžių formavimuisi mielių ląstelėse užteko AAV2 Cap geno raiškos ir VP1 sintezės kontroliuojamos *GALI* promotoriaus (Backovic ir kt., 2012). Naujausiais tyrimais buvo gauta šešių AAV2 baltymų (VP1, VP2, VP3, AAP, Rep78 ir Rep52) sėkminga bendra sintezė plazmidėje su GFP žymeniu apsuptu ITR sekų. Išsiaiškinta, kad AAV2 kapsidžių formavimasis priklausė nuo viruso stuktūrinių baltymų ir AAP baltymo sintezės, replikacija ir virionų susipakavimas įtakojamas ITR viruso sekų ir viengrandinės AAV DNR formavimosi mielių branduolyje. Susiformavę AAV virionai buvo išlaikę infektyvumą HEK293 ląstelėse (Barajas ir kt., 2017).

Žmogaus papildomos virusų (HPV) ir jaučių papildomos virusų (Zhao ir Frazer, 2002) pilno ilgio genomai episominėse plazmidėse savarankiškai replikuojami *S.cerevisiae* ląstelėse. Tam papildomai nereikia nė vieno virusinio geno, užtenka HPV genome esančių savarankiškai replikacijai reikalingų elementų, tokių kaip į centromerą panašios sekos ir A/T turtingi klasteriai, būdingi žinduolių genomui. Mielų ląstelės replikacijos pradžios atpažinimo kompleksas atpažįsta atitinkamas sekas papildomos viruso genome, o replikacijos baltymai funkciškai kompensuoja virusinio E1 baltymo (DNR helikazės) aktyvumą (Angeletti ir kt., 2002).

Kadangi mielių retrotraspozonų ir retrovirusų integracija yra panašus procesas, molekuliniai mielių Ty elementų tyrimai suteikė žinių apie retrovirusų ŽIV ir MLV atvirkštinę transkripciją (Rausch ir kt., 2017). ŽIV viruso baltymų tyrimai mielių ląstelėse prisidėjo ir prie šio viruso vystymosi ciklo supratimo. Vpr baltymo, esminio ŽIV-1 patogenezėje (ląstelės G2 fazės indukcijoje), dalyvaujančio CD4+ T ląstelių aktyvumo slopinime, pirminiai

tyrimai atlikti mielėse ir papildyti žinduolių ląstelių tyrimais (Zhao ir Elder, 2005). Taip pat *S.cerevisiae* ląstelėse buvo pademonstruotas ŽIV viruso proteazės PR slopinamas ląstelių augimas ir inicijuojama lizė dėl parandamo plazminės membranos integralumo (Blanco ir kt., 2003). Vėliau buvo patvirtinta ŽIV-1 PR baltymo sukeliama žmogaus CD4+ T ląstelių nekrozė (Ventoso ir kt., 2005). Galiausiai Rev baltymo vaidmuo ŽIV viruso replikacijoje, inicijuojant pradinės viruso informacinės RNR pernašą į citoplazmą, buvo pirmą kartą ištirtas *S.cerevisiae* ląstelėse (Stutz ir Rosbash, 1994). Gautieji rezultatai parodė splaisosomos konservatyvumą tarp žinduolių ir mielių ląstelių. Be to, virusinių baltymų funkcinė analizė praplėtė ir mielių viduląstelinį procesų žinias, pavyzdžiui, toliau nagrinėjant Rev įtakojamą eksportą buvo indentifikuotas *S.cerevisiae* mažas branduolio porą formuojantis baltymas - Rip1p ir jo sąveikas reguliuojantis partneris - Crm1p (Stutz ir kt., 1997).

1.3.1. Į virusus panašių dalelių sintezė mielėse

Daugelio virusų rekombinantiniai struktūriniai baltymai pasižymi savybe, iškart po biosintezės, spontaniškai suformuoti multimerines taisyklingas, virusines kapsides primenančias struktūras, vadinamas į virusus panašiomis dalelėmis (VPD). Pagrindinis VPD sintezės mielėse privalumas yra tas, kad VPD produkcijai tinka mielėse atliekamos potransliacinės modifikacijos, struktūrinių baltymų lankstymo kokybės kontrolė (Brodsky ir Skach, 2011), todėl pasiekama pakankama išėiga ir VPD kokybė. Tačiau yra duomenų, jog mielių atsakas į stresą dažnai didelio tankio kultūrose lemia netaisyklingą baltymų sulankstymą bei sumažėjusį transliacijos efektyvumą (Bonander ir kt., 2009; Bill, 2015). Svarbus veiksnys, nuo kurio priklauso VPD išėiga, yra mielių atsako į stresą kontrolė, kuri gali nulemti rekombinantinio baltymo tirpumą.

Iki šiol 35 skirtingų tipų (iš 16 virusų šeimų) VPD yra sėkmingai produkuotos mielėse, didžioji dalis *S.cerevisiae*, antroje vietoje *Pichia pastoris* (Kim ir kt., 2017).

Virusų neturinčių išorinio apvalkalėlio VPD iš viduląstelinės erdvės gryninamos mechaniškai ar fermentų pagalba ardant mielių sienelę, kuri susideda iš manozilintų baltymų, β -D-gliukozės polisacharidų (β 1,3- β 1,6 glikanų) ir chitino (Lipke ir Ovalle, 1998). Suprantama, mielėse negali būti atkartotas virusų, turinčių apvalkalėlį, pumpuravimasis, bet mielės atlieka visas likusias virusų su apvalkalėliu sintezės stadijas (Biemans ir kt., 1992). Pademonstruota, kad yra įmanoma praplėsti ir turinčiųjų apvalkalėlį virusų VPD sintezės mielėse galimybes. Retroviruso ŽIV-1 Gag baltymo VPD pumpuravo panaudojant *S.cerevisiae* sferoplastų technologiją. Pumpuravusių VPD morfologija buvo normali ir jos pilnai buvo apdengtos plazmine membrana (Sakuragi ir kt., 2002).

VPD galima produkuoti sekrecijos būdu nenaudojant sferoplastų, kuomet ET, GK, endosomų ar net branduolio apvalkalėlio membranos tarnauja kaip viruso pumpuravimo platforma (Welsch ir kt., 2007). Daugiausia VPD sekrecijos eksperimentų aprašyta *Pichia pastoris* mielėse, dėl jų savybės efektyviau sekretuoti heterologinius baltymus. Deja, *P. pastoris* sekretuojant sudėtingesnės struktūros baltymus susiduriama su jų degradacija (Ahmad ir kt., 2014). Mielių *P.pastoris* kamienai tobulinami stiprinant proteazių inhibitorių sintezę ląstelėse. Anot autorių, *P.pastoris* mielėse VPD degradacija iš dalies buvo pašalinta kombinuojant triušio hemoraginio viruso VP1 geno sintezę su proteazių inhibitorių genų raiška, naudojant proteazių inhibitorius auginimo terpėse ir fermentacijos metu (Fernandez ir kt., 2015). HBV sekrecija *P.pastoris* mielėse buvo neefektyvi dėl šio viruso apvalkalėlio paviršiaus antigeno baltymo savybių ir nepagerėjo net pritaikius eukariotams būdingus sekrecijos signalus ar keičiant promotorius (Vassileva ir kt., 2001). HBV paviršiaus antigeno baltymas sekrecijos metu sąveikauja su mielės viduląstelinių membranų lipidais (ypač rūgštiniais fosfolipidais), ir taip nukenčia HBV konformacinis vientisumas, antigeniškumas (Kushnir ir kt., 2012), nors tokios pasekmės nepastebėtos žinduolių ląstelėse. Noroviruso pagrindinio struktūrinio baltymo VP1 sekrecija *P.pastoris* mielėse tapo efektyvesnė VP1 suliejus su α -faktorius signalu (Tome-Amat ir kt., 2014).

Nors dedama nemažai pastangų ieškant VPD sekrecijos mielėse pagerinimo būdų, bet pagal literatūros duomenis, vos kelių tipų VPD gryninamos iš mielių ląstelių jas sekretuojant (Kim ir kt., 2016).

Iš 35 skirtingų tipų VPD susintetintų mielėse, 14 jų kapsomerai sudaryti iš kelių struktūrinių virusinių baltymų – daugiasluoksnės arba mozaikinės VPD (Kim ir kt., 2016). Mozaikinių VPD formavimasis pademonstruotas virusų su apvalkalėliu ir be apvalkalėlio. Mielėse parvovirusų VP2 ir VP1 sintezė buvo efektyvesnė, nei vieno VP2 baltymo (kurio pilnai užtenka VPD formavimuisi). Be to VP2 tirpumas padidėjo kuomet abiejų struktūrinių baltymų genų raiška buvo reguliuojama skirtingų promotorių. Mozaikinių VPD pranašumas yra galimas efektyvesnis imuninis atsakas. Pavyzdžiui, imunizuojant peles parvovirusų abiejų struktūrinių baltymų VPD sukėlė stipresnę neutralizuojančių antikūnų atsaką, nei tik VP2 VPD (Chandramouli ir kt., 2013). Įdomu, kad kelių struktūrinių baltymų raiškai ir jų tirpumui įtakos turi skirtingų promotorių balansas bei plazmidžių strategija. Pavyzdžiui, rotaviruso VPD, sudarytą iš VP2, VP6 ir VP7 baltymų, viduląstelinei sintezei *S.cerevisiae* ląstelėse labiau pasiteisino bendra raiškos plazmidė, nei trys atskiros. Trys plazmidės labiau apkrauna mielės metabolizmą ir visų pirma sulėtėja jų augimas. Autoriai teigia, kad labai svarbu kontroliuoti VP6 ir VP7 baltymų sintezės santykį norint gauti autentiškas rotaviruso daugiasluoksnės VPD (Rodriguez-Limas ir kt., 2011).

Nera iki galo aišku, ar mielių viduląstelinėje erdmėje viruso struktūriniai baltymai pilnai susirenka į VPD. EM eksperimentai patvirtina, kad HCV VPD gausiai susiformuoja po baltymų transliacijos mielių *P.pastoris* citoplazmoje (Falcon ir kt., 1999), o *S.cerevisiae* ląstelėse paukščių PyV VP1 baltymo VPD sferinių struktūrų formavimasis pademonstruotas EM ir imunohistochemiškai 24 val. po baltymo indukcijos (Zielonka ir kt., 2012). Tačiau *P.pastoris* ląstelėse nebuvo aptikta labai hidrofobinio HBV paviršiaus antigeno baltymo formuojamų VPD (Lunsdorf ir kt., 2011), o Zahid su kolegomis nustatė, jog HBV antigeno baltymas palapsniui suformuoja simetriškas VPD keičiant joninę jėgą chromatografinio VPD gryninimo metu (Zahid ir kt., 2015). Šiuo

metu turimi duomenys rodo, kad mielėse yra visos sąlygas VPD formavimuisi, bet galiausiai tai priklauso nuo struktūrinių virusinių baltymų savybių.

1.4. Mielių ląstelių flokuliacijos fenomenas

Mielių flokuliacija apibūdinama kaip nelytinio tipo, homotipinis (vieno tipo ląstelių), grįžtamas ir multivalentinis agregacijos procesas, dėl kurio mielių ląstelės sudaro greita sedimentacija pasižyminčią multiląstelinę masę (net milijonai ląstelių viename gniutule) (Stratford, 1992). Lotyniškas žodis *floccus* reiškia vilnos pluoštą. Ląstelių sienelių paviršių sąveikos yra sudėtingas procesas, įtakojamas genetinių ir epigenetinių reguliacinių mechanizmų. Visų pirma, mielių sienelėje turi būti eksponuojami adheziniai membraniniai baltymai, kurie yra esminiai prisitvirtinant prie biotinių ir abiotinių paviršių (Bruckner ir Mosch, 2012). Flokuliacijos lektinų genai vadinami flokulinais (*FLO*). Mielių flokulinų genai sudaro neįprastą, funkciškai tarpusavyje susijusių šeimos narių tinklą, kurie, esant įvairioms aplinkos sąlygoms, gali vienas kitą pakeisti. *FLO* genų šeimos nariai (*FLO1*, *FLO2*, *FLO4*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10*) yra telomerinėje arba subtelomerinėje (*FLO11*) mielių chromosomų dalyje (Guo ir kt., 2000). Ši gana izoliuota aplinka yra saugi vieta dažnai rekombinacijai ir chromatino modeliavimo fermentų veikimui, pavyzdžiui, Sir baltymams. Geriausiai žinomas *FLO1* genas, buvo aprašytas ir klonuotas dviejų grupių (Teunissen ir kt., 1993; Watari ir kt., 1994). *FLO1* yra dominantinis genas lokalizuotas 24 kb nuo I chromosomos galo (Teunissen ir kt., 1993), šio geno viduryje esantys simetriški tvarkingi pasikartojantys domenai lemia naujų alelių formavimąsi, rekombinacijos dažnis yra 10^{-5} per vieną generaciją (Verstrepen ir Klis., 2006). *FLO2* ir *FLO4* genai yra *FLO1* geno aleliniai variantai. *FLO5*, *FLO9* ir *FLO10* genų produktai yra taip pat labai homologiški Flo1p (ar. sekos identiškos 96 %, 94 % ir 58 % atitinkamai) (Teunissen ir Steensma, 1995). Flo8p yra *FLO1*, *FLO10* ir *FLO11* genų transkripcijos veiksnys (Halme ir kt., 2004). Flo11p atsakingas už mielių ląstelių prisitaikymą prie azoto ar gliukozės nepritekliaus, būtinas diploidinių

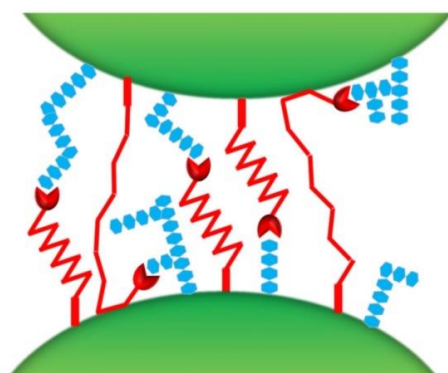
mielių pseudofilių formavimui (filamentų) ir haplodinei invazinio augimo adhezijai. Flo10p ir Flo11p baltymai labai svarbūs mielių lytiniam dauginimuisi (Guo ir kt., 2000).

Flokulinams būdinga bendra struktūra: N-galinėje srityje yra signalinė seka, atsakinga už manozės atpažinimą, centrinis domenas, turtingas serino ir treonino ar., svarbus šių baltymų transportui į membraną, o C-galinėje srityje glikozilfosfatidilinizitolio inkaras, baltymo įtvirtinimui ląstelės plazminėje membranoje. Savo funkcijomis, sandara ir veikimo mechanizmu *S.cerevisiae* flokuliniai yra homologiški patologinių mielių *Candida albicans* Als adhezinams (El-Kirat-Chate ir kt., 2015), kurie užtikrina efektyvų tvirtinimąsi prie žinduolių audinių.

Flokuliacija yra suskirstyta į skirtingus fenotipus pagal jautrumą cukrui. *FLO1* geno raiška lemia Flo1 flokuliacijos fenotipą. Flo1 fenotipo mielių ląstelių flokuliacija yra pastovi, stabili gana plačiame pH intervale, specifiskai inhibuojama manozės arba jos junginių. NewFlo flokuliacijos fenotipas labiausiai paplitęs alaus pramonėje naudojamų mielių kamienų kolekcijose. NewFlo mielių flokuliacija yra nepastovi, grįžtamai inhibuojama manozės, maltozės, gliukozės ir sacharozės (bet niekad galaktozės). NewFlo kamienai jautresni katijonams, žemam pH, proteinazei K. Manoma, kad NewFlo fenotipas susiformavo įvykus *FLO1* geno iškritai. Dar yra aprašyti du papildomi flokuliacijos fenotipai: vienas, kuris nejautrus manozei, ir jo flokuliacija nėra inhibuojama jokių cukrų, ir kitas fenotipas, kurio flokuliacija įvyksta tik esant terpėje gana aukšai etanolio koncentracijai (Teunissen ir Steensma, 1995). Pastarųjų mechanizmai nėra iki galo suprasti, bet kiekvienas fenotipas pasižymi savybe atpažinti tik savo fenotipo agregacinius faktorius.

Flokuliuojančių mielių ląstelių paviršiuje esantys flokuliniai sąveikauja su angliavandenių alfa-manozių liekanomis (1.9 pav), o kalcio jonai padeda lektinams suformuoti jų teisingą konformaciją (Singh ir kt., 2011). Atominės jėgos mikroskopijos eksperimentais buvo išnagrinėta flokulinių mechanika flokuliacijos metu. Vienos manozės molekulės ir Flo1p flokulino sąveikos jėgos tyrimai patvirtino silpną lektino specifinį nuo kalcio jonų priklausomą

prisijungimą. Papildoma stipri flokulino hidrofobinių pasikartojimų konformacijų mechanikos įtakojama jėga labai prisideda prie ląstelių adhezijos stiprumo ir ilgalaikiškumo (El-Kirat-Chate ir kt., 2015). Tokia stipri flokulino ir manozės sąveika leidžia kompensuoti mielių ląstelių sienelių neigiamų krūvių stūmos jėgas dėl sienelės baltymų karboksilinių grupių jonizacijos, fosfodiesterinių grupių ir fosforilintų manozių liekanų. Net suardžius mielių ląsteles karščio šoku ar atskyrus sienelės nuo ląstelių turinio, flokuliaciją lemianti sienelių adhezija išlieka. Flokuliacijos panaudojimas pramonėje sumažina arba visai panaikina ląstelių atskyrimo nuo terpės kaštus. Tačiau flokulinių heterogeniškumas ir jų epigenetinė reguliacija reikalauja, kad tyrimai būtų atliekami su kiekvienu laboratoriniu ar pramoniniu mielių kamieniu atskirai.



1.9 pav. Flokuliuojančių mielių ląstelių paviršių sukibimo modelis. Mielių sienelėje eksponuojami flokulinai (raudona spalva) nekovalentiškai sąveikauja su kitos mielių sienelės baltymų manozės liekanomis (mėlyna spalva) (El-Kirat-Chatel ir kt., 2015).

Laboratoriniuose mielių kamieniuose normaliomis augimo sąlygomis *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* ir *FLO10* genai yra dažniausiai epigenetiškai nutildyti (Halme ir kt., 2004). Flokuliacijos procesas apibūdinamas kaip socialinis mielių ląstelių elgesys streso sąlygose, lemiantis didesnę ląstelių kultūros išgyvenamumą (Herker ir kt., 2004). Aplinkos veiksniai galintys sukelti flokuliaciją yra šie: anglies ir/ar azoto trūkumas, didesnė nei 1 % etanolio koncentracija, nepakankama aeracija, cukrūs, terpės pH, temperatūra virš 52 °C, feromonai ir t.t. (Claro ir kt., 2007).

Epigenetinė reguliacija pasireiškia dažniausiai kovalentiškai modifikuojant DNR histonus arba globaliai, veikiant vadinamiesiems *cis*-regulatoriniams veiksniams. Mielėse *S.cerevisiae* telomeros regionas, kartu su mielių HML/HMR dauginimosi tipų sekomis bei sekomis koduojančiomis ribosominę DNR yra užtildyti. Šis nutildymo procesas nepriklauso nuo genų esančių tame domene, priklauso tik nuo chromatino struktūros. Represuoti regionai dažniausia yra hipoacetilinti (Perrod ir Gasser, 2003). Subtelomerinio ir telomerinio regiono nutildymą *S.cerevisiae* reguliuoja sudėtingi baltymų kompleksai, kurių sudėtyje yra Set1 metilazė, dažnai vadinami COMPASS. COMPASS kartu su histonų deacetilaze (Hda1) bei acetiltransferaze (Gcn5) represuoja *FLO* genų raišką kartu su telomeriniu regionu. Esant defektyviai COMPASS metilinimo sistemai padidėja *FLO1*, *FLO5* ir *FLO9* genų transkriptų, prasideda manozės inhibuojama flokuliacija (Dietvorst ir Brandt, 2010).

Nutildytos informacijos regulatorinių baltymų (SIR) kompleksai, kurių sudėtyje yra histonus modifikuojančių Sir2, Sir3 ir Sir4 baltymų, taip pat slopina transkripciją telomerozė (Gasser ir Cockell, 2001). Sir baltymai geba jungtis su telomerų DNR per specifines sekas pasižyminčias $(TG_{1-3})_n$ nukleotidų pasikartojimais. Susiformavus pilnam SIR kompleksui slopinimas jau nėra specifinis, jis sklinda išilgai nukleosomų, labai panašiu procesu, kaip formuojantis aukštesniųjų eukariotų heterochromatinui. Šis nutildymas sustoja tik pritrūkus Sir baltymų, arba esant ant DNR elementams suformuojantiems barjerą (Kueng ir kt., 2013). Mielės yra diploidinis organizmas, o abiejų DNR grandžių epigenetinis nutildymas yra autonomiškas procesas (Xu ir kt., 2006).

FLO1 promotorius reguliuojamas Cyc8-Tup1 represorių komplekso, kuris yra labai plataus veikimo profilio, dalyvauja gliukozės, krakmolo, deguonies metabolizmo, osmotinio streso, DNR pažaidų, mielių lytinio dauginimosi, mejozės bei sporuliacijos genų transkripcijos reguliavime (Malave ir Dent, 2006). Optimaliomis mielių ląstelei augimo sąlygomis Cyc8-Tup1 yra prisijungęs prie *FLO1* promotoriaus, pritraukia histonų deacetilazes Rpd3p ir Hda1p ir taip inhibuoja histonų acetilinimą. Tik atsijungus Cyc8-

Tup1 kompleksui yra įmanomas specifinių acetilazių Swi-Snf prisijungimas, chromatinio pertvarkymas bei *FLO1* transkripcija. Toks dinamiškas priešingo veikimo Cyc8-Tup1 ir Swi-Snf kompleksų perjungimas demonstruoja flokuliacijos fenotipo svarbą ir greitį prisitaikant prie aplinkos sąlygų (Fleming ir kt., 2014). *FLO1* reguliuojamas ne vien epigenetiškai, bet taip pat priklauso nuo pasikartojimų (apie 100 nt dydžio) esančių geno sekoje. *FLO1* raiška priklauso nuo terpės pH, temperatūros, manozės koncentracijos. Eksperimentiškai mažinant pasikartojimų skaičių *FLO1* gene, kinta flokuliacijos laipsnis ir ląstelių jautrumas stresui (Smukalla ir kt., 2008). Dažna rekombinacija dėl pasikartojančių *FLO* geno sekų taip pat lemia flokulinų sintezės variacijas (Verstrepen ir Klis., 2006).

FLO11 geno aktyvumas priklauso nuo dauginimosi tipo. *S.cerevisiae* ląstelėse yra dvi *FLO11* genų kopijos. Jų veikimas nepriklausomai įjungiamas ir išjungiamas. Flo11 baltymas išsiskiria iš flokulinų šeimos nes yra atsakingas ne tik už ląstelių-ląstelių adheziją flokuliuojant, bet ir ląstelės adheziją prie įvairių paviršių (biofilmų formavimesi). Dėl šios savybės Flo11p yra labiausiai išanalizuotas flokulinas. Flo11p suteikiama galimybė prikibti prie paviršiaus įdomi tuo, kad natūralioje mielių populiacijoje gali būti ir adhezinių ir lengvai nuplaunamų nuo paviršiaus ląstelių. Flo11p kiekis yra sumažinamas ląstelei labai greitai dauginantis, kad lengvai atsiskirtų dukterinės ląstelės. Žinomi du *FLO11* genų epigenetiniai transkripcinės kontrolės būdai: pirmasis, kuomet dvi nekoduojančios RNR gali uždengti *FLO11* geno promotorių, ir antrasis priklausomas nuo HDAC komplekso. *FLO11* geno aktyvatorius Flo8p ir represorius Sfl1p konkuruoja tarpusavyje. Sfl1p garantuoja stabilų nutildymą kartu su HDAC komplekso histonų deacetilaze Hda1. Tačiau jei Rpd3L pakeičia chromatiną kondensaciją *FLO11* promotoriuje ir taip prisijungia Flo8p, jis stimuliuoja ncRNR *PWR1* (Watsono RNR 1) gamybą. Ši stadija yra labai imli greitam *FLO11* įjungimui. Bet imlioji stadija turi ir greito perjungimo mechanizmą, jei *PWR1* ncRNR interferuoja su kita ilgesne ncRNR *ICR1* (angl. Interfering Crick RNA 1). *ICR1* transkribuojama pasroviui *FLO11* geno kryptimi, kartu su promotoriaus šerdiniu regionu, blokuodama

transkripcijos faktorių ir chromatiną permodeliuojančių fermentų prisijungimą (Tuck ir Tollervey, 2012). Reguliacija ncRNR yra specifiškesnė ir greitesnė nei reguliacija transkripcijos veiksnių pagalba, ypač kai prie 3,4 kb ilgio *FLO11* promotoriaus gali prisijungti virš 20 skirtingų transkripcijos veiksnių.

Trans-regulatorinių veiksnių įtakojamas geno veiklos kitimas dažniausiai yra susijęs su promotoriumi. *FLO11* raiška įjungiamo mitogeno aktyvuojamos baltymų kinazių Fus3/Kss1 kaskados (MAPK), reguliuojamos membraninio baltymo Cdc42. Tai konservatyvus visuose eukariotuose signalinis kelias, mielėse atsakingas už haploidinių ląstelių lytinį dauginimąsi, kuomet eksponuojami feromonų receptoriai. Trūkstant maistinių medžiagų MAPK signalinio kelio reguliuojama flokulino 11 sintezė prisideda prie ląstelių įaugimo į substratą (Karunanithi ir kt., 2012). *FLO10* geno transkripcija priklauso nuo MAPK signalinio kelio per jo signalinį komponentą Ste12 (Bester ir kt., 2006). Transkripcijos veiksniai Ste12 ir Tec1 reguliuoja ir *FLO11* promotoriaus aktyvumą, Tec1 atsakingas už filamentų augimą (Bardwell ir kt., 1998).

Mss11 transkripcijos veiksnys reguliuoja *FLO1*, *FLO10*, *FLO11* ir kitų genų (pvz.: *TIR*), koduojančių ląstelės sienelės baltymus, raišką. Padidėjus Flo11p ar Mss11p sintezės lygiui, indukuojama *NCA3* geno raiška, kurio produktas reguliuoja mitochondrijų ATP sintazės veiklą. Transkripcijos veiksnys Mss11 veikia kartu su Flo8p, kuris yra nuo ciklinio AMP priklausomos baltymų kinazės A (cAMP-PKA) reguliuojamo kelio, įjungiamo gliukozės, azoto trūkumo, narys (Bester ir kt., 2006). Trūkstant terpėje azoto ar gliukozės *FLO11* genų raiška yra aktyvinama taip pat cAMP-PKA signaliniu keliu. Dideli kiekiai Flo11p įjungia *AQY2* geno raišką, nuo šio geno produkto vandens kanalo sienelėje priklauso ląstelės tolerancija šalčiui. Labai trūkstant gliukozės, azoto ar aminorūgščių haploidinėse mielėse aktyvinamas Snf1 baltymų kinazės kelias, kuris atsakingas už glikogeno kaupimą ir didina mitochondrijų kiekį (Aun ir kt., 2013).

FLO1, *FLO5*, *FLO9* ir *FLO10* genų raišką specifiškai reguliuoja branduolio 1 superšeimos helikazės Sen1p, priklausančios NNS kompleksui

(Singh ir kt., 2015). NNS kompleksas susidedantis iš Nrd1-Nab3-Sen1 baltymų reguliuoja transkripcijos efektyvumą skatindamas išankstinę terminaciją ir transkripto degradaciją. Yra pademonstruota, kad panašiai NNS kompleksas sąveikaudamas su RNR polimeraze II koreguoja gliukanų sintazės *FKS2* raišką transkripcijos lygyje, o temperatūrinio šoko metu ar pakilus etanolio koncentracijai ir dėl to išaugus gliukanų poreikiui *S.cerevisiae* plazminėje membranoje NNS veikimą sustabdo MAPK kinazės (Kim ir Levin, 2012). Normalioms sąlygoms NNS kompleksas ir jo partneriai - branduolio ribonukleazės Rnt1/Rrp6p degraduoja *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* ir *FLO10* genų informacinę RNR (Singh ir kt., 2015). Prie *FLO* genų transkripcijos reguliacijos reikėtų paminėti ir *S.cerevisiae* topoizomerazės THO kompleksą. THO komplekso baltymai elongacijos metu išlanksto *FLO* genų informacinę RNR, kad jos nesudarytų inhibuojančių transkripciją hibridinių stuktūrų dėl pasikartojančių sekų (Voynov ir kt., 2006).

Trūkstant aminorūgščių, mielės sugeba stimuliuoti adhezinę ypatybę keisdamos Flo11p transliacijos efektyvumą. Ribosomos subvieneto 40S komponentas - Rps26 ribosominis baltymas reguliuoja *FLO11* geno mRNR efektyvią transliaciją (Strittmatter ir kt., 2006). Vėlesni mechanizmai susiję su RNR tiesiogiai specifiškai prisijungiančiais baltymais, tokiais kaip Khd1, kuris gali slopinti *FLO11* mRNR transliaciją tiesiogiai prisijungdamas prie *FLO11* mRNR pasikartojančių sekų. Šis procesas sukuria *FLO11* geno raiškos skirtumus tarp motininės ir dukterinės ląstelių, todėl formuojasi asimetriški filamentai (Wolf ir kt., 2010). Galiausiai, *FLO11* geno raiška reguliuojama ir potransliaciniame lygyje. Kex2 serino proteazė rasta ląstelėse, kurios pradeda eliminuoti ir sekretuoti Flo11p (Karunanithi ir kt., 2010). Ar adhezinų šalinimas susijęs su aplinkos pokyčiais, ar tai signalas aplinkinėms ląstelėms, dar nėra aišku. Analizuojant įvairių kamienų *FLO11* genų sekas, stebimi pokyčiai už adheziją atsakingame domene. Skirtingais adhezijos domenais padengus magnetinius rutuliukus, nustatyta, kad vyksta adhezija su homologinėmis ląstelėmis. Kamienui specifiniai flokulinių struktūrinių

skirtumai gali būti mielių ląstelių bendruomenės ir/ar evoliucijos lemiamas veiksnys (Barua ir kt., 2016).

Nepaisant *FLO* genų ir daugelio kitų genų bendros reguliacijos mechanizmų, analizuojant *FLO* genų ar jų transkripcijos veiksnių mutantus ar padidintą raišką nėra stebimas poveikis kitiems nuo šių baltymų priklausomiems mielių ląstelės fenotipams. Tai leidžia teigti, kad įvairialypė *FLO* genų reguliacija, kontroliuojama persidengiančių kelių, atsakinga už įvairių procesų pusiausvyros palaikymą, ne vien tik baltymų eksponavimą ląstelės sienelėje. Genų veikimo kontrolė per epigenetinį nutildymą ir tradicinį geno veiklos aktyvavimą suteikia flokuliacijos fenotipo valdymui lankstumo.

Šiame disertaciniame darbe yra tyrinėjamos PyV VP1 baltymų biosintezės mielių *S.cerevisiae* raiškos sistemoje ypatybės bei galimas PyV VP1 patogeniškumas mielių ląstelėms - sukeliantis flokuliaciją. Taip pat HPyV VP1 formuojamos VPD sėkmingai pritaikytos serologinei analizei, specifinių antikūnų detekcijai žmonių kraujo serumo mėginiuose.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Tirpalai, mikroorganizmai, plazmidės, mitybinės terpės, reagentai

2.1.1 Buferiniai ir kiti tirpalai

Ruošiant tirpalus nurodyti reagentai tirpinami distiliuotame vandenyje, jei šiame darbe pateiktose metodikose nenurodyta kitaip.

2.1.1.1 Tirpalai DNR skyrimui

NaOH-NDS tirpalas: 1 % NDS ir 0,1 M NaOH.

NaAc (pH 4,8): 3 M natrio acetatas, pH 4,8.

NaAc (pH 5,2): 3 M natrio acetatas, pH 5,2.

NH₄Ac tirpalas: 7,5 M amonio acetatas.

RNRazės A tirpalas: ruošiamas 10 mg/mL jaučio kasos ribonukleazės A tirpalas, 10 min. pavardamas vandens vonioje ir laikomas -20°C temperatūroje.

PEG: 3,3 M NaCl, 27 % PEG×6000.

Fenolio – chloroformo mišinys (pH 7.5-8): lygiais tūriais sumaišyti fenolis (prisitintas 50mM Tris-HCl) ir chloroformas.

Genominės *S.cerevisiae* DNR skyrimo lizuojantis buferis (pH 8): 4 % N-lauroilsarkozino natrio druska (Na sarkozilatas), 200 mM EDTA.

Genominės *S.cerevisiae* DNR skyrimo sorbitolio tirpalas (pH 8): 1,2M sorbitolio, 10mM, Tris-HCl, 1mM EDTA.

2.1.1.2 Tirpalai DNR elektroforezei

TAE buferinis tirpalas (pH 8,3): 0,04 M Tris acetato, 0,2 mM EDTA, pH 8,3.

Agarozė: 0,8-2 % agarozės TAE buferiniame tirpale.

Etidžio bromido tirpalas: 10 mg/mL etidžio bromido tirpalas.

DNR dažas: Thermo Fisher Scientific 6× DNA Loading Dye.

2.1.1.3 Tirpalai fermentinėms reakcijoms

Visi naudoti fermentinių reakcijų tirpalai buvo pagaminti „Thermo

Fisher Scientific Baltics“ (Lietuva), procedūros atliekamos pagal gamintojo rekomendacijas. Polimerazinėms grandininėms reakcijoms naudoti 2.2.2 skyrelyje nurodyti reagentai. DNR hidrolizei restrikcijos endonukleazėmis naudota penkių standartinių buferinių tirpalų sistema (B+, G+, O+, R+, Tango) ir FastDigest buferinis tirpalas. DNR susiuvimui naudota T4 DNR ligazė bei gamintojo pridedami buferiniai tirpalai. DNR 5'-galinių fosfatų pašalinimui, naudotas *E.coli* šarminių fosfatazių mišinio rinkinys (FastAP).

2.1.1.4 Tirpalai bakterijų *E.coli* ir mielių *S. cerevisiae* imliųjų ląstelių paruošimui

CaCl₂ tirpalas: ruošiamas 100 mM CaCl₂ tirpalas, autoklavuojamas ir laikomas +4 °C temperatūroje. Prieš naudojimą atšaldomas ledo vonioje.

CaCl₂ su gliceroliu tirpalas: ruošiamas 100 mM CaCl₂ tirpalas, sumaišomas 4:1 santykiu su gliceroliu. Laikomas +4 °C temperatūroje. Prieš naudojimą atšaldomas ledo vonioje.

TE buferinis tirpalas: ruošiamas 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) ir 0,1 mM EDTA tirpalas, autoklavuojamas.

TE-LiCl: ruošiamas 0,1 M LiCl tirpalas TE buferiniame tirpale, autoklavuojamas.

TE-PEG: ruošiamas 50 % (w/v) PEG4000 tirpalas TE buferiniame tirpale, autoklavuojamas.

2.1.1.5 Tirpalai baltymų skyrimui iš mielių ląstelių ir jų gryninimui

Ardymo buferinis tirpalas (DB150/450): 10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 150/450 mM NaCl, 0,01 % Triton-X-100, 1mM CaCl₂, 0.25 M L-Arg tirpalas. Prieš vartojimą įdedama PMSF tirpalo iki 0,2 mM koncentracijos.

PMSF tirpalas: 20 mM PMSF tirpalas izopropanolyje, laikomas -20°C temperatūroje.

Amonio sulfato tirpalas: 10mM Tris-HCl (pH 7), 150 mM NaCl, 0,2 mM CaCl₂, 40 % (NH₄)₂SO₄ tirpalas.

Sacharozės tirpalai gradientui suformuoti: 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % sacharozės tirpalai ardymo buferiniame tirpale (DB 150/450).

Cezio chlorido tirpalai gradientui suformuoti: 1,38; 1,35; 1,32; 1,29; 1,26 g/mL CsCl tirpalai buferiniame tirpale (DB150).

PBS tirpalas: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 4,3 mM Na₂HPO₄ tirpalas.

2.1.1.6 Tirpalai baltymų elektroforezei poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis

Akrlamido/bisakrlamido tirpalas: 40 % (w/v) akrilamido, 0,8 % N,N'-metilenbisakrlamido tirpalas.

4× koncentruojančio gelio buferinis tirpalas: 0,5 M Tris-HCl tirpalas (pH 6,8).

4× frakcionuojančio gelio buferinis tirpalas: 1,5 M Tris-HCl tirpalas (pH 8,8).

Amonio persulfato tirpalas: 10 % (NH₄)₂S₂O₈ tirpalas.

NDS tirpalas: 10 % NDS tirpalas.

Koncentruojantis gelis: 3,2 % akrilamido/bisakrlamido tirpalo, 1,25M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % amonio persulfato tirpalo, 0,1 % NDS, 0,001 % TEMED (N, N, N', N'- tetrametilendiamino).

Frakcionuojantis gelis: 12 % akrilamido/N,N'-metilenbisakrlamido 40:0,8, 0,375M Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % NDS, 0,1 % amonio persulfato, 0,001 % TEMED.

Baltymų mėginių dažo buferinis tirpalas: 0,5M Tris-HCl (pH 6,8), 20 % (w/v) glicerolio, 4 % (w/v) NDS, 0,001 % (w/v) bromfenolio mėlio, 10 % (v/v) merkaptoetanolio.

Tris-glicino/NDS elektroforezės buferinis tirpalas (pH 8,3): 25 mM Tris, 0,2 M glicino, 0,1 % NDS tirpalas.

Coomassie brilantinio mėlio dažymo tirpalas: 50 % (v/v) etanolio, 0,25 % (v/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 % (v/v) acto rūgšties tirpalas.

Gelių plovimo tirpalas: 5 % (v/v) acto rūgšties ir 5 % (v/v) izopropanolio tirpalas.

Gelių fiksavimo tirpalas: 50 % (v/v) etanolio, 10 % (v/v) acto rūgšties tirpalas.

2.1.1.7 Tirpalai imunoblotingui

Pernešimo buferis: 150mM glicino, 25mM Tris, 10 % etanolio tirpalas.

TBS (pH 7,5): 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl tirpalas.

TBST (pH 7,5): 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 0,1 % Tween-20 tirpalas.

2.1.1.8 Tirpalai imunofermentinei analizei

Padengimo buferinis tirpalas: 15 mM Na₂CO₃ ir 35 mM NaHCO₃ tirpalas, pH 9,5.

Plovimo buferinis tirpalas: 10 mM TRIS, 0.3 M NaCl, 0.1 % Tween-20 tirpalas, pH 7,2.

Reakcijos su TMB stabdymo tirpalas: 10 % H₂SO₄ tirpalas.

2.1.1.9 Molekulinės masės standartai

DNR fragmentų agarozės gelyje standartas: GeneRuler™ DNA Ladder Mix #SM0331.

Baltymų molekulinio svorio standartai: PageRuler™ Prestained Protein Ladder #SM0671 arba Unstained Protein Molecular Weight Ladder #SM0431.

2.1.2 Bakterijų ir mielių kamienai

Plazmidžių konstravimui ir padauginimui naudoti bakterijų kamienai:

Escherichia coli DH5α F⁻gyrA96 (NaI^r) *recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* (r_k-m_k⁺) *glnV44 deoR Δ(lacZYA-argF)U169* [φ 80dΔ(*lacZ*)M15] (EGIS kolekcija);

Escherichia coli GM119 F⁻dam-3 dcm-6 lacY1 galK2 galT22 tsx-78 glnV44 metB1 thi[?] fhuA[?] mtl[?] (EGIS kolekcija).

E.coli ląstelės augintos +37°C temperatūros purtyklėje arba termostate.

Naudoti *Saccharomyces cerevisiae* mielių kamienai:

Saccharomyces cerevisiae BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ*), BY4741 *MATa* kamienų su mielių genų iškritomis ir mielių YTHC kolekcijos (Thermo Fisher Scientific, Huntsville, JAV);

Saccharomyces cerevisiae AH22-214 (*a, his4 leu2*) (EGIS kolekcija);
Saccharomyces cerevisiae AH22-214 Δ pep4 (*a, his4 leu2*) (EGIS kolekcija)
Saccharomyces cerevisiae BY4741 Δ ssa1/ssa2 (*MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ ssa1 Δ 0 ssa2 Δ 0*) (EGIS kolekcija);
Saccharomyces cerevisiae BY4741 Δ ssa3/ssa4 (*MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ ssa3 Δ 0 ssa4 Δ 0*) (EGIS kolekcija);
Saccharomyces cerevisiae BY4741 Δ zuo1 (*MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ zuo1 Δ 0*) (Thermo Fisher Scientific, Huntsville, JAV).
S.cerevisiae ląstelės augintos +30°C temperatūros purtyklėje arba termostate.

2.1.3 Plazmidės

pJET1.2/blunt klonavimo vektorius #K1231 (Thermo Fisher Scientific Baltics);

pFX7 mielių raiškos vektorius, turintis *GAL10-PYK1* promotorių, sudarytą iš UDP-galaktozės epimerazės geno UAS sekos (atsakingos už transkripcijos indukciją) ir piruvatkinazės geno promotoriaus (EGIS kolekcija);

pFGG3 – *S.cerevisiae* mieliu raiškos vektorius, turintis galaktoze indukuojamus mielių *GAL7* ir *GAL10* genų promotorius (Slibinskas ir kt., 2004).

pFGPGK1 *S.cerevisiae* mielių raiškos vektorius turintis 3-fosfogliceratkinazės (*PGK1*) promotorių (EGIS kolekcija);

pFGCNE1 mielių raiškos vektorius, turintis galaktoze indukuojamą mielių *GAL7* ir nuolat aktyvų kalneksino geno promotorių *CNE1* (Ciplys ir kt., 2011).

2.1.4 Antikūnai

2.1 lentelė. Darbe naudoti antikūnai ir jų gamintojai.

Antikūno pavadinimas	Antigenas	Organizmas	Gamintojas
6D11	HaPyV VP1	Pelė	Gauti VU BTI Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje (ILBS), (Zvirbliene ir kt., 2006).
8G8	BKPyV VP1, JCPyV VP1, MWPpyV VP1, HPyV9 VP1, HPyV12 VP1	Pelė	Gauti ILBS, naudojant šio darbo metu susintetintas ir išgrynintas VPD
11A2	HPyV6-VP1, MCPyV VP1	Pelė	
11G10	KiPyV-VP1	Pelė	
8C4	TSPyV-VP1, STLPyV-VP1	Pelė	Gauti ILBS, (Gedvilaite ir kt., 2015)
22G2	Tymų viruso nukleoproteino QSRGEAR/442–448 ar. epitopas	Pelė	Gauti ILBS (Zvirbliene ir kt., 2007)
GA1R	Glicerinaldehido 3 fosfato dehidrogenazė (GAPDH)	Pelė	Thermo Scientific, JAV (Gedvilaite ir kt., 2000) (Zielonka ir kt., 2006)
anti-Hsp104 PAK	Hsp104 mielių šaperonas	Triušis	
Anti-HaPyV-VP1 PAK	HaPyV VP1 susintetintas <i>E.coli</i>		
Anti-HaPyV-VP1 PAK	APyV VP1		
Anti-Mouse-HRP PAK	Pelių IgG siunkioji ir lengvoji grandinės	Ožka	Bio-Rad, JAV
Anti-Rabbit-HRP PAK	Triušių IgG sunkioji ir lengvoji grandinės		
Anti-Human-HRP PAK	Žmogaus IgG siunkioji ir lengvoji grandinės		Thermo Scientific, JAV
Anti-WUPyV PAK	WUPyV VP1	Pelė	Gauti ILBS, naudojant šio darbo metu susintetintas ir išgrynintas VPD
Anti-JCPyV PAK	JCPyV VP1		
Anti-MCPyV PAK	MCPyV VP1		

2.1.5 Bakterijų ir mielių ląstelių auginimo terpės

LB (Luria-Bertani) terpė (pH 7): ruošiamas 1 % peptono (arba kazeino hidrolizato), 0,5 % mielių ekstrakto, 0,5 % NaCl tirpalas vandenyje, norint agarizuotos LB terpės pridedama 2 % agaro. Autoklavuojama.

YEPD terpė: ruošiamas 1 % mielių ekstrakto, 2 % peptono, 2 % gliukozės tirpalas vandenyje, norint agarizuotos YEPD terpės pridedama 2 % agaro. Autoklavuojama.

YEPG terpė: ruošiamas 1 % mielių ekstrakto, 2 % peptono, 3 % galaktozės tirpalas vandenyje, autoklavuojamas.

Transformuotos, atsparios ampicilinui *E.coli* ląstelės buvo auginamos LB terpėje, turinčiose 50 µg/mL ampicilino.

Ampicilino tirpalas: 50 mg/mL ampicilino tirpalas vandenyje sterilinamas filtruojant ir laikomas -20°C temperatūroje.

Mielių transformantai buvo išsėjami ant agarizuotos YEPD terpės, pridėjus į ją 0,3 µL/mL 37 % formaldehido tirpalo, o transformantų atrinkimui – 0,6 µL/ml formaldehido. Skystoje YEPD terpėje atrinkti transformantai buvo auginami ir indukuojami, pridėjus 0,3 µL/mL formaldehido.

2.1.6 Reagentai

2.2 lentelė. Darbe naudoti reagentai ir jų gamintojai.

Tiekėjas	Reagentai
AMRESCO	Ličio chloridas
APPLICHEM	Argininas, cezio chloridas, formaldehidai, gliukozė, kalio fosfatas, peptonas, PMSF, sacharozė, amonio sulfatas
BIOEKSMAS	Acto rūgštis
GIBCO	JSA
INVITROGEN	TMB
MERCK	Agaras, bromfenolio mėlis, chloroformas, dinatrio hidrofosfato dihidratas, druskos rūgštis, kalio chloridas, mielių ekstraktas, natrio chloridas, peptonas
MILLIPORE	Immobilon [®] polivinildifluorido (PVDF) membranos
REACHIM	Izopropanolis, natrio acetatas, natrio hidrokarbonatas, natrio karbonatas
ROCHE	Proteazių slopiklių tabletės
ROTH	Akrilamidas, amonio acetatas, amonio persulfatas, ampicilinas, merkaptio etanolis, Roti [®] -Block tirpalas, vatmanas imunoblotingui
SERVA	PEG
SIGMA	Coomasie briliantinis mėlis, EDTA, fenolis, kalcio chloridas, NDS, stiklo rutuliukai, TEMED, TRIS HCl, TRIS, litikazės fermentas
THERMO FISHER SCIENTIFIC	Agarozė, antriniai antikūnai, dNTP mišinys, FastAP fosfatazė, glicinas, restrikcijos endonukleazės ir 5 standartinių buferinių tirpalų rinkinys, T4 DNR ligazė ir jai skirti buferiniai tirpalai, DNR ir baltymų molekulinės masės žymenys, termostabili Phusion DNR polimerazė ir jai skirti buferiniai tirpalai, DreamTaq DNR polimerazė ir jai skirtas buferinis tirpalas, TAE buferinis tirpalas, Tween-20
VILNIAUS DEGTINĖ	Etanolis

2.2 Tyrimo metodai

2.2.1 Plazmidžių konstravimas

Darbui su DNR buvo naudojami klasikiniai genų inžinerijos,

molekulinės biologijos metodai (Sambrook ir Russell, 2001). Plazmidinė DNR buvo išskiriama iš *E.coli* ląstelių šarminės lizės metodu (Ausubel, 1999) arba naudojant komercinį plazmidinės DNR skyrimo rinkinį GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit #K0502 (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva), pagal gamintojo rekomendacijas. Plazmidinės DNR hidrolizės restrikcijos endonukleazėmis, 5'-galinių fosfatų pašalinimui, DNR viengrandžių galų bukinimui, 5'-galinių fosfatų pašalinimui, DNR siuvimui, buvo naudojami Thermo Fisher Scientific Baltics fermentai ir buferiai, procedūros atliekamos pagal gamintojo rekomendacijas. DNR deproteinizavimas buvo vykdomas fenolio - chloroformo mišiniu. DNR elektroforezė buvo atliekama 0,8-2 % agarozės geliuose TAE buferiniame tirpale, turinčiuose 0,1-0,2 µg/mL etidžio bromido, naudojant horizontalias agarozės plokšteles ir esant 10 V/cm itampai. Geliai buvo analizuojami transiluminatoriaus ("ULTRA-LUM" arba "Fotodyne") ultravioletinėje šviesoje. DNR koncentracija buvo nustatoma naudojantis spektrofotometru NanoDrop 2000. DNR nukleotidų seka buvo nustatoma Biotechnologijos institute, Sekvenavimo centre automatiniu sekvenatoriumi ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelių atliekamas klasikiniu „užšaldymo ir suspaudimo“ metodu arba komerciniu rinkiniu GeneJET™ Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Baltics) vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis. Ruošiant *E.coli* imliašias ląsteles, buvo naudojama Bolivar ir Backman pasiūlyta metodika (Bolivar ir Backman, 1979).

2.2.2 Polimerazinė grandininė reakcija

Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) taikyta norimams DNR fragmentams pagausinti, matrica naudojant plazmidinę DNR arba mielių ląstelių genomine DNR. Oligonukleotiduose buvo įvesti restrikcijos endonukleazių taikiniai, naudoti pradmenys nurodyti 2.3 lentelėje. Reakcijai buvo naudojami "Thermo Fisher Scientific Baltics" buferiniai tirpalai, dNTP mišinys, termostabili didelio tikslumo Phusion DNR arba DreamTaq DNR polimerazė pagal gamintojo rekomendacijas. Reakcija buvo vykdoma

plonasieniame PGR mėgintuvėlyje (Thermo Fisher Scientific Baltics) Labnet MultiGene™ termocikleryje.

2.3 lentelė. Darbe naudoti oligonukleotidai.

Padaugintas genas	Pavadinimas	Pradmens 5'-3'seka
<i>N324V</i>	AVP1-EXdir	CGAATTCTCTAGAATGTCCCAAAAAGGAAAAGGAAGC
	N324-XXrev	GCACAGGTGGAGGAGGTTCTGTGTAATCTAGACTCGAGC
<i>N306R</i>	AVP1-EXdir	CGAATTCTCTAGAATGTCCCAAAAAGGAAAAGGAAGC
	N306-XXrev	CTTGTTCAATGACCTGATGCCCCGTTAATCTAGACTCGAGC
<i>N288N</i>	AVP1-EXdir	CGAATTCTCTAGAATGTCCCAAAAAGGAAAAGGAAGC
	N288-XXrev	CAGCTGAGAAAACGTAATGTTTCGTAATAATCTAGACTGAGC
<i>N272G</i>	AVP1-EXdir	CGAATTCTCTAGAATGTCCCAAAAAGGAAAAGGAAGC
	N272-XXrev	CCAACGTGGCCGCAATATTGGCGAGGCTAATCTAGACTCGAGC
<i>N218G</i>	AVP1-EXdir	CGAATTCTCTAGAATGTCCCAAAAAGGAAAAGGAAGC
	N218-XXrev	GATATTATGGCAACCTCACAGGTGGTAATGTAGACTCGAGC
<i>C156Q</i>	C155-EXdir	CGAATTCTCTAGAATGCAAAAATTCAAAACTGTGTACCCTACA
	AVP1XXrev	GATATGCCCCCAAAGCTCCCCGCTAATCTAGACTCGAGC
<i>C156A-306R</i>	C155-NLS-dir	CTCTAGAATGGCTCCAAAGAGAAAAGGTAGTACAAAGAGAAAAGGTCAAATTCAAAACTGTGTACCCTG
	N306-XXrev	CTTGTTCAATGACCTGATGCCCCGTTAATCTAGACTCGAGC
<i>C218-306R</i>	C217-EXdir	CGAATTCTCTAGAATGGGTGGGCCTGAAACCCCCCTGTACC
	N306-XXrev	CTTGTTCAATGACCTGATGCCCCGTTAATCTAGACTCGAGC
<i>C218A-306R-NLS</i>	C217-NLS-dir	CTCTAGAATGGCTCCAAAGAGAAAAGGTAGTACAAAGAGAAAAGGTGGGCCTGAACCCCCCTG
	N306-XXrev	CTTGTTCAATGACCTGATGCCCCGTTAATCTAGACTCGAGC
<i>HSP104</i>	HSP104-F	GCACTAGTATGAACGACCAAACGCAATTTACAG
	HSP104-R	GCTCTAGATTAATCTAGGTCATCATCAATTTCCATAC

<i>HSP90</i>	HSP90-F	GCACTAGTATGGCTAGTGAAACTTTTGAATTTCAAG
	HSP90-R	GCACTAGTTAATCTACCTCTTCCATTTCCGGTGTC
<i>HSP82</i>	HSP82-F	GCTCTAGAATGGCTGGTGAAACTTTTGAATTTCAAG
	HSP82-R	GCTCTAGATTAATCAACTTCTTCCATCTCGGTGTC
<i>SSE1</i>	SSE1-F	GCTCTAGAATGAGTACTCCATTTGGTTTAGATTTAG
	SSE1-R	GCTCTAGATTAGTCCATGTCAACATCACCTTC
<i>SSE2</i>	SSE2-F	GCTCTAGAATGAGCACTCCATTTGGCTTAGATTTAG
	SSE2-R	GCTCTAGATTAATCAAGGTCCATGTTTTCATC
<i>SSA1</i>	SSA1-F	CTCTAGAATGTCAAAAGCTGTCCGGTATTGATTTAG
	SSA1-R	CTCTAGATTAATCAACTTCTTCAACGGTTGGACC
<i>SSA2</i>	SSA2-F	CTCTAGAATGGTCTAAAGCTGTCCGGTATTGATTTAG
	SSA2-R	CTCTAGATTAATCAACTTCTTCGACAGTTGGAC
<i>SSA3</i>	SSA3-F	CTCTAGAATGTCAAGAGCAGTTGGTATTGATTTGG
	SSA3-R	CTCTAGATTAATCAACCTCTTCCACTGTTGGAC
<i>SSA4</i>	SSA4-F	CTCTAGAATGTCAAAAGCTGTTGGTATTGATTTAG
	SSA4-R	CTCTAGATTAATCAACCTCTTCAACCGTTGGGC
<i>SSB1</i>	SSB1-F	GCTCTAGAATGGCTGAAGGTGTTTTCCAAGGTG
	SSB1-R	GCTCTAGATTAACGAGAAGACATGGCCTTGGTG
<i>SSB2</i>	SSB2-F	GCTCTAGAATGGCTGAAGGTGTTTTCCAAGGTG
	SSB2-R	GCTCTAGATTACGAGAAGACATGGCCTTGGTGAC
<i>LHS1</i>	LHS1-F	GCTCTAGAATGCGAAACGTTTTAAGGCTTTTATTTTAAAC
	LHS1-R	GCTCTAGATAATTCATCATGCAAAATGTCTTCCTC
<i>KAR2</i>	KAR2-F	GCACTAGTATGTTTTTCAACAGACTAAGCGCTG
	KAR2-R	GCACTAGTTACAATTCGTCTGTTCGAAATAATCAC
<i>ZUO1</i>	ZUO1-F	GCTCTAGAATGTTTTCTTTACCTACCCTAACCTCAG
	ZUO1-R	GCTCTAGAACACGAAGTAGGACAACAAGCTG
<i>APJ1</i>	APJ1-F	GCTCTAGAATGCAACAAAACACGTCTTTATATGAC
	APJ1-R	GCTCTAGATTAATATCCATTAATATCATGGTCATAAAAAC
<i>SIS1</i>	SIS1-F	GCACTAGTATGGTCAAGGAGACAAAACCTTTATG
	SIS1-R	GCACTAGTTAAAAATTTTCATCTATAGCACG
<i>YDJ1</i>	YDJ1-F	GCTCTAGAATGGTTAAAGAACTAAGTTTTACGATATTC
	YDJ1-R	GCTCTAGATTAATTGAGATGCACATTGAACACCTTC
<i>CAJ1</i>	CAJ1-F	GCACTAGTATGGTAAAGGAGACGGAGTTATG
	CAJ1-R	GCACTAGTTATCTGGCCACAGTATGTTTTTTTG
<i>JEM1</i>	JEM1-F	GCTCTAGAATGATACTGATACTGATCTCGGGATACTGTC

	JEM1-R	GCTCTAGAAAAGCCCAAAATTCATTTTAAAGCCATTTTC
<i>SCJ1</i>	SCJ1-F	GCACTAGTATGATTCCAAAATTATATATACATTTGA
	SCJ1-R	GCACTAGTTACAACCTCATCTTTGAGCATATTTTGC
<i>ERJ5</i>	ERJ5-F	GCTCTAGAATGAACGGTTACTGGAAACCTGCGTTG
	ERJ5-R	GCTCTAGAATTTACGTGAATAGATCACTTTACCG
<i>HLJ1</i>	HLJ1-F	GCTCTAGAATGTACTTTCCTGAGGATCAAG
	HLJ1-R	GCTCTAGATTAACATAACAGGTAATCTTTAATCATAG
<i>SEC63</i>	SEC63-F	GCTCTAGAATGCCTACAAATTACGAGTATGATGAG
	SEC63-R	GCTCTAGATATTCTGGTGATTCATCATCTTCAGC
<i>XDJ1</i>	XDJ1-F	GCTCTAGAATGAGTGGCAGTGATAGAGGAGACCG
	XDJ1-R	GCTCTAGATTATTGGATACAGCAGTACGAACTTCTTG
<i>HPyV12</i> <i>VP1 364</i> ar. ilgio natyvi seka	HPy12- VP1ATG2-NX	CTCTAGAATGGCACCCAAGAGGAAAACCACCTG
	HPy12- VP1stop-NX	GTCTAGATTATGGAACCTGGTGTTATTTCTTGTC
<i>HPyV12</i> <i>VP1 364</i> ar. ilgio sintetinė seka	HPy12- VP1ATG2-SX	CTCTAGAATGGCACCTAAAAGGAAGACCACATG
	HPy12- VP1stop-SX	GTCTAGATTATGGAACCTGGAGTAATTTTC
<i>APP1</i>	APP1-ATG-X	GCTCTAGAATGAATAGTCAAGGTTACGATG
	APP1-Ctag-X	GCTCTAGATTATATAGCTTCACCTCTTGATTGGTTTGAAT ACTTCTCCCTAATTCTG
<i>FDC1</i>	FDC1-ATG-X	GCTCTAGAATGAGGAAGCTAAATCCAGC
	FDC13-Ctag-X	GCTCTAGATTATCTAGCTTCACCTCTTGATTGTTTAGAGC CGTACCTTTTC
<i>YBR062C</i>	YB62C-ATG- X	GCTCTAGAATGTCTACATATGAAGGTATG
	YB62C-Ctag- X	GCTCTAGATTATCTAGCTTCACCTCTTGATTGACCGTACA TACCCCAATCTTCT
<i>YCR100C</i>	YC100-ATG-B	GCACTAGTATGTCATCTACGGACATCTG
	YC100-Ctag-B	GCACTAGTTATCTAGCTTCACCTCTTGATTGAAATGCAGC AGAAAAATCG
<i>IRC4</i>	IRC4-ATG-X	GCTCTAGAATGAGAGAATATAACCAGTAAAAAAG
	IRC4-Ctag-X	GCTCTAGATTATCTAGCTTCACCTCTTGATTGTATCTTCT CCTTTTTATGCGTTG

<i>LDB7</i>	LDB7-ATG-B	GCACTAGTATGAGTGGAAGTAATATGGGATAC
	LDB7-Ctag-B	GCACTAGTTATCTAGCTTCACCTCTTGATTGATCTACGCA GGCATGTTCTC
<i>NPL3</i>	NPL3-ATG-B	GCACTAGTATGTCTGAAGCTCAAGAACTC
	NPL3-Ctag-B	GCACTAGTTATCTAGCTTCACCTCTTGATTGCCTGGTTGG TGATCTTTCACG
<i>UBP5</i>	UBP5-ATG-B	GCACTAGTATGGGCTCAGAACAAGCCTTAAG
	UBP5-Ctag-B	GCACTAGTTATCTAGATTACCTCTTGATTGAAAAATTCT TTCGTAAAATAAAAC
<i>TUP1</i>	Tup-ATG-B	GCACTAGTATGACTGCCAGCGTTTCGAATAC
	TUP1-Ctag-X	GCACTAGTTAATTTCTAGCTTCACCTCTTGATTGTGGCGC TATTTTTTTATACTTC
<i>CYC8</i>	CYC8-ATG-X	GCTCTAGAATGAATCCGGGCGGTGAACAAAC
	CYC8-Ctag-X	GTCCTAGATTAGTCTCTAGCTTCACCTCTTGATTGGTCGT AGTTTTTCATCTTCTTC
<i>MIT1</i>	MIT1-ATG-X	GCTCTAGAATGGATATCGAGCCTACTTTC
	MIT1-Ctag-X	GCTCTAGATTATCTAGCTTCACCTCTTGATTGTTGTGTAGT AGTTGAAGTGTTTG
<i>HaVP1-Nm1</i>	HaNm1-X	CGTCTAGAATGGCCCCAAAAGGAAAAGCGGCGCTTCCA GTAG
	HaCter-X	GCTTCTAGATTAGTTTGCTGGTTTTGC
<i>HaVP1-Nm2</i>	HaNm2-X	CGTCTAGAATGGCCCCAAGCGGCGCTTCCAGTAGATGTG
	HaCter-X	GCTTCTAGATTAGTTTGCTGGTTTTGC
<i>HaVP1-Nm3</i>	HaNm3-X	CGTCTAGAATGTCCCAAAAAGGAAAAGGCTCCAGTAGAT GTGCAAAC
	HaCter-X	GCTTCTAGATTAGTTTGCTGGTTTTGC
<i>AVP1-Nm4</i>	AVP1Ndel4-X	CGTCTAGAATGGGAAGCTGCCACGACCTCAGC
	AVP1XXrev	GATATGCCCCCAAAGCTCCCCGCTAATCTAGACTCGAGC
<i>WUVP1-KRK</i>	WU-VP1-KRK-NX	GCTCTAGATATGGCTCCAATAAAAAGAAAACCAGCTTGT ACTGCTAAAC
	WU-VP1-Stop-X	GCTCTAGATTAACCTTGACTATTC

2.2.3 Imlijų *S.cerevisiae* ląstelių paruošimas ir transformacija

Transformuojant mieles, buvo naudojama modifikuota Gietz pasiūlyta metodika (Gietz ir kt., 1995). Iš vakaro mielių kamienas, kuris bus naudojamas

transformacijai, buvo užsėjamas į 5 mL YEPD terpės ir auginamas apie 16 val. +30°C purtyklėje. Naktinė kultūra skiedžiama ta pačia terpe iki optinio tankio 1 ($\lambda = 600\text{nm}$) ir inkubuojama +30°C purtyklėje, apie 3 val. Tada ląsteles nucentrifugavus 5 min. 2000 aps./min. greičiu (BECKMAN J-6B centrifuga, JS-5.2 rotorius), jos buvo plaunamos 3 mL TE buferinio tirpalo ir dar kartą nucentrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Suspendavus ląsteles 3 mL 0,1 M TE – LiCl tirpalo, jos buvo inkubuojamos 1 val. +30°C termostate. Po inkubacijos paruoštos imliosios mielių ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis ir suspenduojamos į 100 μL 0,1 M TE-LiCl tirpalo.

Transformacijai buvo imama 15 μL paruoštų imliųjų mielių ląstelių kultūros, pridama 5 μL DNR tirpalo (2-4 μg) ir 30 min. inkubuojama kambario temperatūroje. Pridėjus du tūrius 50 % TE-PEG \times 4000 ir 40 min. palaikius +30°C termostate, mišiniai 20 min. buvo laikomi +42°C temperatūros vandens vonioje. Po temperatūrinio šoko ląstelės buvo skiedžiamos 1 mL skystos YEPD atgaivinimui po transformacijos plazmidėmis su atsparumo formaldehidui markeriu, inkubuojamos per naktį (apie 16 val.) +30°C temperatūros termostate. Po inkubacijos ląstelės buvo surenkamos 6 sekundes centrifuguojant stalinėje Eppendorf minicentrifugoje 5417C ir išsėjamos ant agarizuotos YEPD terpės su 0,0125 % formalino (0,3 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Transformantai buvo tikrinami ir atrenkami persėjant juos ant YEPD terpės su dvigubai didesniu formalino kiekiu (0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

2.2.4 Heterologinių virusinių baltymų, sulietų su EGFP, sintezės *S. cerevisiae* stebėjimas tēkmės citometru

25 μL terpės su mielėmis (koncentracija apie $5,5 \times 10^6$ ląstelių/mL), kuriose buvo indukuota heterologinio virusinio baltymo sintezė, sumaišoma su 50 μL 3,7 % formaldehido tirpalo PBS buferiniame tirpale. Tirpalas suspenduojamas ir inkubuojamas 5 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės nucentrifuguojamos 3 min 1000 aps./min. greičiu (Eppendorf 5417C centrifuga). Supernatantas nusiurbiamas ir ląstelės

praplaunamos 100 μ L PBS buferinio tirpalo. Ląstelės suspenduojamos 25 μ L PBS buferinio tirpalo. Analizei citometru naudojama apie 2 μ L galutinės ląstelių suspensijos. Analizės metu stebima 6000 mielių ląstelių jas apšviečiant 488nm lazeriu. Analizei naudotas „The Partec CyFlow ML“ tėkmės citometras ir automatinio mėginių paėmimo prietaisas „RobbyWell“ (Valaviciute ir kt., 2016).

2.2.5 Genominės DNR išskyrimas iš mielių *S.cerevisiae* ląstelių

Reikiamas mielių kamienas auginamas per naktį skystoje YEPD terpėje 30°C temperatūros kratytuve. Ląstelės surenkamos centrifūguojant 3 min. 2000 aps./min. greičiu. Supernatanatas nupilamas, ląstelės praplaunamos distiliuotu vandeniu. Centrifuguojama 3 min, užpilama 400 μ l 1,2M sorbitolio (TE buferyje) tirpalo, pridedama 5 μ l merkaptoetanolio, 3 μ L litikazės fermento (30 U). Ląstelės suspenduojamos ir 10-15 min. palaikomos 30°C temperatūros termostate. Centrifūguojama 3-5min. 2000 aps./min. greičiu. Supernatanatas nusiurbiamas ir dedama 50 μ L 1,2M sorbitolio (TE buferyje), 150 μ L vandens, 400 μ L lizuojančio tirpalo (200 mM EDTA pH 8, 4 % Na sarkozilatas, 1 mL fenolio (pH 7,5), maišoma švelniame kratytuve 20 min. Po to pridedama 1 mL chloroformo ir toliau maišoma 1 min. Centrifuguojama 3-5min. 2000 aps./min. greičiu. Nusiurbiamas viršutinis sluoksnis ir jis pilamas į mėgintuvėlius, kuriuose yra 100 μ L 3M NaAc (pH 7), užpilame 2 mL 96 % etanolio ir ant antgalio išvyniojama chromosominė DNR. Gauta DNR praplaunama 70 % etanoliumi, išdžiovinama ir ištirpinama 1M TE buferyje. Chromosominė DNR yra laikoma 4°C temperatūroje.

2.2.6 Mielų auginimas ir heterologinių baltymų sintezės indukcija

Mielės *S.cerevisiae*, transformuotos plazmide su reikiamu genu, 16-24 val. buvo auginamos skystoje YEPD terpėje, 30°C temperatūroje. Po to buvo įpilama pusė tūrio indukcijai skirtos YEPG terpės, turinčios 9 % galaktozės. Indukcija trukdavo 18 – 22 val., 30°C temperatūroje. Į auginimo ir indukcinę terpes buvo dedama 0,3 μ L/mL formalino (pagal Sasnauskas ir kt., 1999).

2.2.7 Mielių ląstelių lizatų paruošimas analizei NDS-PAGE

Po baltymų sintezės indukcijos, mielių ląstelės buvo atskiriamos nuo terpės centrifuguojant 3 min. 2000 aps./min. greičiu (Beckman J-6B centrifuga, JS-5.2 rotorius). Toliau baltymai buvo išskiriami dviem būdais. Ruošiant lizatus pirmuoju būdu mielės buvo užšaldomos -20 C. Tolesni veiksmai buvo atliekami ledo vonioje. Priklausomai nuo ląstelių kiekio, jos buvo užpilamos 2 tūriais ardymo buferinio tirpalo DB450 (su argininu) ir pridedamas lygus kiekis ardomų mielių masei stiklinių rutuliukų. Mielių ląstelės buvo ardamos intensyviai maišant purtyklės pagalba (30 s. ardoma ir 30 s. dedama į ledą atšaldyti). Bendras ardymo laikas - 10 min. Suardytų mielių ląstelių lizatai buvo 5 min. centrifuguojami 4°C temperatūroje 2000 aps./min. greičiu (Eppendorf 5415D centrifuga), supernatantas buvo surenkamas ir maišomas su mėginių dažu. Ruošiant lizatus antruoju būdu buvo naudotas mielių baltymų skyrimo reagentas Y-PER™ (Thermo Fisher Scientific, JAV). Baltymai buvo išskirti pagal gamintojo nurodytas instrukcijas, pridedant 0,2M PMSF tirpalo izopropanolyje ir sumaišyti su mėginių dažu. Mėginių supernatantai buvo analizuojami NDS-PAGE po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis.

2.2.8 Heterologinių baltymų išskyrimas iš mielių ląstelių ir gryninimas

Po baltymų sintezės indukcijos mielių ląstelės buvo atskiriamos nuo terpės centrifuguojant 5 min. 2000 aps./min. greičiu (Beckman J-6B centrifuga, JS-5.2 rotorius) ir užšaldomos -20°C temperatūroje. Tolesni veiksmai buvo atliekami tik ledo vonioje. Priklausomai nuo ląstelių kiekio, jos buvo užpilamos 2,5 kartus didesniu ardymo buferinio tirpalo tūriu, į kurį prieš pat darbą buvo įpilama iki 2 mM proteazių slopiklio PMSF bei įdedama proteazių slopiklių mišinio tabletė (2.2 lentelė). Tuomet buvo pridedamas lygus kiekis (pagal šlapių mielių masę) stiklinių rutuliukų. Mielių ląstelės buvo ardamos intensyviai maišant maišykle Bead-Beater GB26. Bendras ardymo laikas 10 min. Suardytų mielių ląstelių lizatas buvo centrifuguojamas 5 min. 4°C

temperatūroje 2000 aps./min. greičiu (Beckman J-6B centrifuga, JS-5.2 rotorius), supernatantas buvo surenkamas. Suardytų mielių ląstelių lizatų (grubių lizatų) ir supernatantų mėginiai buvo analizuojami NDS-PAGE geliuose po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis. Toliau baltymai buvo gryninami dviem metodais.

Pirmuoju metodu baltymai buvo gryninami centrifuguojant per 30 % sacharozės „pagalvę“. Suardytų mielių ląstelių lizato supernatantas buvo užpilamas ant 30 % sacharozės tirpalo paviršiaus centrifuginiame mėgintuvėlyje ir centrifuguojamas 4 val. 37000 aps./min. greičiu Beckman LE-80K centrifuga 4°C temperatūroje. Nuosėdos buvo suspenduojamos ardymo buferiniame tirpale ir analizuojamos NDS-PAGE geliuose po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis.

Antruoju metodu baltymai buvo gryninami per sacharozės ir cezio chlorido tirpalų gradientus. Suardytų mielių ląstelių lizato supernatantas buvo užpilamas ant įvairių koncentracijų sacharozės tirpalų gradiento, centrifuginiame mėgintuvėlyje supilto koncentracijos mažėjimo tvarka. Buvo centrifuguojama per naktį 37000 aps./min. greičiu Beckman LE-80K centrifuga 4°C temperatūroje. Po centrifugavimo buvo renkamos atskiros frakcijos po 0.5 – 2 mL, pradėdant nuo viršaus, ir analizuojamos NDS-PAGE geliuose po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis. Atrinktos frakcijos su didžiausiu gryninamo baltymo kiekiu buvo skiedžiamos buferiniu tirpalu DB150 ir nusodinamos centrifuguojant per naktį tomis pačiomis sąlygomis. Nuosėdos buvo suspenduojamos 0,5-2 mL skiedimo buferiniame tirpale DB150.

Toliau baltymai buvo gryninami per CsCl gradientą. Ištirpintų baltymų suspensija buvo užpilama ant CsCl gradiento, sudaryto tankio mažėjimo tvarka į centrifuginį mėgintuvėlį lėtai pilant CsCl tirpalus. Buvo centrifuguojama per naktį tomis pačiomis sąlygomis. Po centrifugavimo buvo renkamos atskiros frakcijos po 0.5 – 2 mL, pradėdant nuo viršaus, ir baltyminiai mėginiai analizuojami NDS-PAGE geliuose po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis. Norint pasiekti didesnę VPD grynumo laipsnį

ar labiau jas sukonzentruoti, atrinktos frakcijos su gryninamais baltymais buvo pakartotinai užnešamos ant suformuoto CsCl gradiento ir centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis.

2.2.9 Baltymų dializė

Baltymų tirpalas buvo supilamas į vientisą 0,02 mm porėtumo celiuliozinį dializės maišelį (Carl Roth, Vokietija) ir įmerkiamas į 4°C temperatūros PBS buferinį tirpalą. Dializė buvo vykdoma 2 L PBS tirpalo tūryje maišant magnetine maišykle, 4°C temperatūroje, kas 2-4 val. keičiant PBS buferinį tirpalą.

2.2.10 Baltymų NDS-PAGE ir poliakrilamidinio gelio dažymas

Ruošiant baltymų mėginius, baltyminiai tirpalai ar ląstelių lizatai buvo maišomi su 2× mėginių dažu santykiu 1:1 turinčiu 10 % redukuojančio agento (merkaptoetanolio). Mėginiai 10 min. buvo verdami 100°C temperatūroje. Elektroforezei buvo naudojamas NDS-PAGE gelis, sudarytas iš 12 % skirstomojo ir 3,2 % koncentruojančio gelio dalių. Elektroforezė vykdoma Tris-glicino/NDS elektroforezės buferiniame tirpale (pH 8,3) vertikalios elektroforezės aparate, esant 40 mA nuolatinės srovės stipriui ir 120 V įtampai. Gelis buvo 10 min fiksuojamas, dažomas Coomassie briliantinio mėlio tirpalu švelniai purtant ir 2 – 4 kartus plaunamas gelių plovimo tirpalu.

2.2.11 Į virusus panašių dalelių stebėjimas elektroniniu mikroskopu

Cezio chlorido gradiente grynintos VPD buvo užlašinamos ant anglimi padengto paladžio tinklelio su 400 akučių (S162-3 Formvar/Carbon 300 Mesh Cu, Agar Scientific, Didžioji Britanija). Pavyzdžiai buvo dažomi 2 % vandeniniu uranilacetato tirpalu, stebimi „Morgagni-268“ elektroniniu mikroskopu (FEI, Olandija) ir fotografuojami.

2.2.12 Į virusus panašių dalelių analizė NanoSight LM10-HS aparatu

Tiriamasis mėginys, kuriame VPD VP1 baltymų koncentracija 10^{-5} - 10^{-3} mg/mL, švirkštu su antgaliu iš lėto suleidžiamas į Nanosight (Didžioji Britanija) modulio angą stebint celę, kad joje neliktų oro. Užpildžius celę švirkštas paliekamas angoje ir modulis pastatomas ant mikroskopo platformos. Įjungiamas lazeris ir Nanosight NTA 3.1.54 programa. Pasirinkus eksperimento parametrus (kambario temperatūra, matavimo laikas 30-60 s), įjungiama kamera, reguliuojant mikroskopo platformą surandami šviečiantys ir judantys taškai (dalelės esančios mėginyje). Nustačius kameros parametrus (VPD stebėjimui optimaliausias ekrano ryškumas pagal NTA 3.1.54 skalę: 1-2, kameros ryškumas: 14-16) filmuojamas celės vaizdas. Programinė įranga suskaičiuoja dalelių dydį ir koncentraciją. Nustačius apdorojimo parametrus ekrane rodoma dalelių dydžio ir koncentracijos diagrama.

2.2.13 Imunoblotingas

Imunoblotingas buvo atliekamas pagal Sambrook ir Russell, 2001; Walker, 2002 ir smulkiau aprašytas Norkiene ir kt., 2015 metodinėje dalyje.

2.2.14 Hemagliutinacijos inhibicijos testas

Į plokšteles su išgaubtais šulinėlių dugnais buvo pilama 25 μ L 1 % jūrų kiaulytės arba žmogaus eritrocitų suspensija PBS (v/v) tirpale. Tuomet pilamas įvairių nuo 50 μ g mL⁻¹ iki 0,025 μ g mL⁻¹ skiedimų VPD tirpalas 25 μ L PBS buferyje. Plokštelė inkubuojama 3 val. 4 °C temperatūroje. Vizualiai nustatoma VPD skiedimo koncentracija, kurioje aiškiai stebimas hemagliutinacijos inhibicijos aktyvumas.

2.2.15 Netiesioginė imunofermentinė analizė

Į specialios polistireno plokštelės („Nerbe plus“) plokščiadugnius šulinėlius buvo pilama po 50 μ L 2 μ g/mL koncentracijos žmogaus poliomos virusų VP1 baltymų tirpalo padengimo tirpale. Plokštelės buvo inkubuojamos per naktį 37°C termostate. Tirpalą išpylus, šulinėliai buvo 3 kartus plaunami

plovimo buferiniu tirpalu. Užpylus 150 μ L blokavimo buferinio tirpalo (Roti[®]-Block), plokštelės buvo inkubuojamos 1 val. kambario temperatūroje švelniai purtant. Po inkubacijos šulinėliai buvo plaunami plovimo buferiniu tirpalu 3 kartus po 150 μ L. Įpylus po 100 μ L įvairaus praskiedimo (1:100, 1:200 ir 1:400) tiriamųjų ir kontrolinių žmogaus kraujo serumų plovimo buferiniame tirpale su 1 % JSA, plokštelės buvo inkubuojamos 1 val. 37°C termostate. Kraujo serumo koncentracija buvo parenkama empiriškai. Po inkubacijos šulinėliai buvo plaunami 7 kartus po 150 μ L plovimo buferinio tirpalo. Įpylus po 100 μ L atitinkamai praskiestų (skiedimą nurodo gamintojas), su krienų peroksidaze konjuguotų ožkos anti-žmogaus IgG antrinių antikūnų plovimo buferiniame tirpale, plokštelės buvo inkubuojamos 1 val. 37°C termostate. Po inkubacijos šulinėliai buvo plaunami 7 kartus po 150 μ L plovimo buferinio tirpalo. Ryškinama įpylus po 50 μ L TMB ryškalo. Po 4 min. 50 sek. reakcija buvo sustabdoma įpylus po 150 μ L 10 % H₂SO₄ tirpalo. Rezultatai buvo kiekybiškai įvertinami spektrofotometru „Infinite M200“ (bangos ilgis 450 nm).

2.2.16. Konkurencinė imunofermentinė analizė

Konkurencinei IFA buvo naudoti kraujo serumai, atsirinkti 2.2.15 metodu, kaip turintys anti-HPyV antikūnų. Tiriami kraujo serumai buvo skiedžiami 100 kartų PBS buferyje kartu su įvairių koncentracijų konkurentinėmis VPD (5, 15, 25 μ g/mL). Mišiniai inkubuojami purtyklėje 1 val. 37°C ir tuomet pilami į analizuojamą Ag padengtas ir blokuotas plokšteles. Toliau atliekamos procedūros analogiškos tiesioginei IFA (žr. 2.2.15). Rezultatai pateikiami procentiškai išreiškiant optinio tankio (OT) sumažėjimą dėl konkurencinių VPD adsorbcijos. Naudota formulė: [(serumo OT be konkuruojančiųjų VPD adsorbcijos – serumo OT su konkuruojančiųjų VPD adsorbcija)/serumo OT be konkuruojančiųjų VPD adsorbcijos] \times 100.

2.2.17 Statistinė analizė

Matuojant mielių ląstelių fluorescenciją mutantiniuose mielių kamienuose, visuomet kartu buvo auginamas ir analizuojamas tėvinis BY4741 mielių kamienas su transformuota pFG-HaPyV-VP1-EGFP arba pFDC-UK114-EGFP plazmide. Tėvinio BY4741 mielių kamieno fluorescencija buvo prilyginama 100 %. Kiekvieno mielių baltymų sintezės matavimo varianto buvo analizuojami 6 arba daugiau nepriklausomų mielių kolonijų klonų. Skaičiuojamas mažiausiai 6 nepriklausomų matavimų aritmetinis vidurkis įskaitant standartinį nuokrypį (\pm SN). Baltymų sintezės skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$, pagal dvipusį neporinį Student'o t-skirstinį. Skaičiavimui naudotas Microsoft Excel 2013 programos Analysis ToolPak plėtinys.

2.2.18 Bioetikos komisijos leidimai

Žmogaus epidermio tepinėliai Merkelio poliomos viruso išskyrimui buvo surinkti gavus Lietuvos bioetikos komiteto leidimą (nr. 158200-7-070-17). Žmogaus kraujo serumai anti-HPyV Ak nustatymui buvo analizuoti gavus Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimą (nr. 152800-15-785-305). Žmogaus kraujo serumai konkuruojančiųjų anti-HPyV Ak nustatymui buvo panaudoti gavus Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimą (nr. 152800-17-901-409).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Poliomos virusų VP1 baltymų sintezės ypatybių *S. cerevisiae* ląstelėse tyrimas ir sintezės optimizavimas

Patobulėjus virusų paieškos ir sekoskaitos technologijoms per paskutinius dešimt metų atrasta daug naujų stuburinių gyvūnų PyV, įskaitant ir 12 naujų žmogaus PyV (1.1 lentelė). Daugumos iš šių PyV infekcijai tirti nėra sukurtų tinkamų ląstelių linijų, todėl labai svarbų vaidmenį tyrimuose atlieka rekombinantinės VP1 VPD, o jų sintezės ypatumų tyrimai gali prisidėti atskleidžiant ir kitas ypatybes, svarbias virusų infekcijos metu. *S.cerevisiae* ląstelėse optimizuojant skirtingų PyV VP1 baltymų sintezę nežiūrint į labai didelę šių baltymų homologiją (Johnė ir kt., 2011; van der Meijden ir kt., 2013) buvo susidurta su įvairiomis baltymų sintezės kliūtimis, pavyzdžiui, neefektyvi kai kurių PyV VP1 VPD raiška ir maža išėiga, mielių ląstelių flokuliacija, netipiško dydžio VPD formavimasis. Problemų sprendimui ir norint gauti kokybiškas VPD šio tyrimo metu buvo iširtos kai kurios PyV sintezės mielių ląstelėse ypatybės: mielių šaperonų poreikis PyV VP1 sintezei, bei atliktas PyV VP1 biosintezės sukeltos mielių ląstelių flokuliacijos priežasčių tyrimas.

Visiems šiems tyrimams buvo pasinaudota mielių mutantų kolekcija su inaktyvuotais genais (angl. Yeast Knock Out Collection). VP1 geno raiškai tirti pirmiausia buvo naudojamas modelinis žiurkėno PyV VP1 baltymas, sulietas su EGFP (žaliu fluorescuojančiu baltymu; VP1-EGFP), o jo sintezės lygio pokyčiai buvo įvertinti matuojant VP1-EGFP fluorescencijos pokyčius gyvoje mielių ląstelėse tėkmės citometru. VP1-EGFP fluorescencijos intensyvumo matavimų mutantiniuose ir tėviniame BY4741 kamiene duomenys buvo lyginami ir pateikiami kaip santykinis fluorescencijos intensyvumas procentais. Šalia VP1-EGFP tyrimų srauto tėkmės metodu buvo atliekami ir tyrimai su nemodifikuotu HaPyV VP1 genu naudojant mielių ląstelių lizatus NDS-PAGE ir imunoblotingo metodais, kad įsitikintume, jog suliejimas su EGFP

minimaliai įtakojo VP1 baltymo sintezės lygį. Flokuliacijos reiškinio tyrimui buvo naudojamas modelinis APyV VP1 genas.

HaPyV VP1 ir VP1-EGFP baltymai formuoja mielių ląstelėms netipinius, didelius baltyminius kompleksus VPD, todėl paraleliai buvo atliekami nevirusinio UK114 baltymo, C gale sulieto su EGFP (UK114-EGFP) fluorescencijos intensyvumo matavimai. UK114 baltymas yra mažas 130 ar. ilgio, netoksiškas, tirpus, priklausantis konservatyviai YERO57c/YJGfc šeimai baltymas, kuris efektyviai sintetinamas tiek *E.coli*, tiek ir mielių ląstelėse, todėl labai tikėtina, kad jo teisingam susilankstymui reikia minimalios šaperonų pagalbos (Colombo ir kt., 1998). UK114-EGFP genas buvo įklonuotas, kad jo veikla būtų reguliuojama konstitutyvaus *PGK1* promotoriaus, o VP1-EGFP geno veikla *GAL7* promotoriaus, nes paprastai PyV VP1 genų raiškai mielėse naudojamos galaktoze indukuojamos raiškos sistemos. Kadangi Floer su kolegomis nustatė vėluojančią *GAL* genų raiškos indukciją galaktoze *Δhsp90* ir *Δhsp70* mielių kamienuose (Floer ir kt., 2008), šio darbo pradžioje buvo atlikti keli pilotiniai eksperimentai naudojant *PGK1* ir *GAL7* promotorius. Jie patvirtino, kad matuojant VP1-EGFP fluorescencijos intensyvumą 18 valandų po indukcijos, santykinis fluorescencijos intensyvumas su abiem promotoriais buvo panašus ir *GAL7* promotoriaus naudojimas gautiems rezultatams įtakos neturėjo.

Atrinktuose mielių kamienuose pastebėti sintezės pokyčiai buvo patikrinti ir naudojant naujų žmogaus PyV VP1 genus. Tam KIPyV, WUPyV, HPyV6, HPyV7, TSPyV, HPyV9, HPyV12, STLPyV ir NJPyV VP1 baltymus kuoduojantys atvirieji skaitymo rėmeliai (ASR) buvo optimizuoti raiškai mielių *S.cerevisiae* ląstelėse ir šios DNR sekos buvo susintetintos (GenScrip). HPyV10 VP1 geno seka nebuvo optimizuota pagal mielių ląstelėms palankius kodonus, o buvo naudoti natyvūs virusui būdingi kodonai kaip ir šio tyrimo metu analizuotoje HPyV12 VP1 geno kopijoje. MCPyV VP1 genas buvo padaugintas PGR metodu nuo viruso genomo, išskirto iš sveiko savanorio odos tepinėlio. Šie vienuolika žmogaus PyV VP1 genų, po jų sekų patikrinimo sekoskaitos metodu bakteriniuose vektoriuose buvo perklonuoti į pFX7 mielių

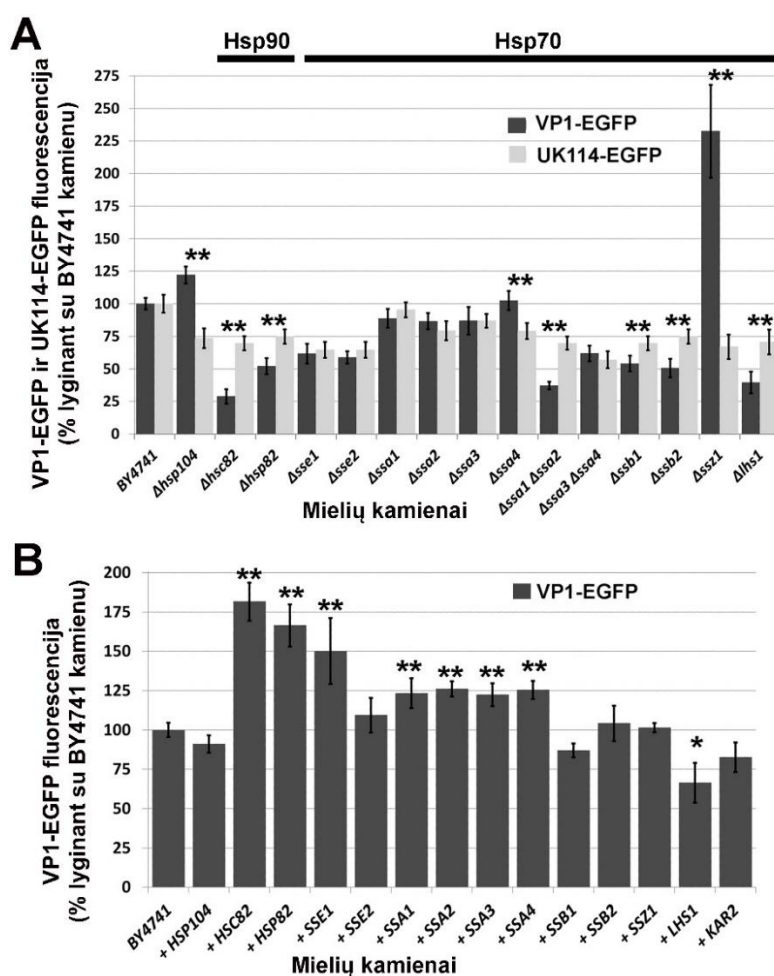
raiškos vektorių, kad genų raiška būtų reguliuojama galaktozės indukuojamo promotoriaus (žr. 2.1.3), o vėliau ir į kitus reikalingus vektorius. JCPyV ir BKPyV VP1 genus turinčios plazmidės gautos iš EGIS kolekcijos (Sasnauskas ir kt., 2002).

Papildomuose eksperimentuose buvo tiriamas kai kurių mielių genų padidintos raiškos poveikis PyV VP1 baltymų sintezei. Tam reikalingi genai buvo padauginę nuo mielių *S. cerevisiae* genominės DNR su specifiniais pradmenimis (2.3 lentelė), patikrinti sekoskaitos metodu ir įsiūti į reikiamus mielių raiškos vektorius. Jų raiškai buvo naudojami įvairaus stiprumo konstitutyvūs promotoriai *PGKI* (stiprus) ar *CNE1* (silpnas). Papildomai šaperonų genų raiškai buvo pasirinktas silpnesnis *CNE1* promotorius, nes naudojant *PGKI* promotorių, per stipri kai kurių šaperonų sintezė buvo toksiška mielių ląstelėms.

3.1.1. Mielių šaperonų poreikis poliomos virusų VP1 sintezei

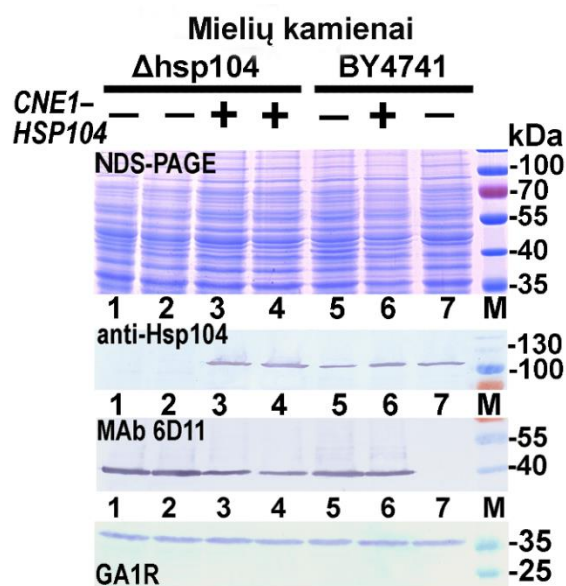
Poliomos virusų infekcijos metu Hsp70 šaperonai vaidina labai svarbų vaidmenį ir sąveikai su jais PyV naudoja LT antigeno sudėtyje esantį šaperonų C-galinį DNA J domeną (Cripe ir kt., 1995; Chromy ir kt., 2003). VP1 baltymai taip pat sąveikauja su Hsp70 šaperonais tiek infekcijos metu, tiek ir po transliacijos transportuojant juos į branduolį (Cripe ir kt., 1995, Chromy ir kt., 2003). *In vitro* tyrimais parodyta, kad jaučio ir paukščių hsc70 šaperonai ir J domeną turintys košaperonai sąveikauja su pelės poliomos viruso VP1 C galu iškart po transliacijos bei taip aktyvuoja taisyklingą kapsidės susirinkimą (Chromy ir kt., 2003). Dauguma duomenų apie šaperonų funkcijas eukariotuose buvo gautos mielių modelinėje sistemoje. Be to, ir kompiuteriniais metodais lyginant streso atsako mielių ir žmogaus šaperonų pokyčius stebimas evoliucinis konservatyvumas (Palotai ir kt., 2008). Kadangi aukštesnių eukariotų ląstelėse būtų sunku įvertinti šaperonų poreikį PyV VP1 baltymo sintezei, nes pagrindiniai šaperonai yra esminiai ląstelių gyvybingumui, tai buvo galima padaryti mielėse, juo labiau, kad apie mielių šaperonų poreikį VP1 VPD sintezei iki šiol nieko nebuvo žinoma.

Pirmausia HaPyV VP1, HaPyV VP1-EGFP ir UK114-EGFP baltymų sintezės pokyčiai buvo tikrinami mutantiniuose mielių kamieniuose su šaperonų genų iškritomis ir suskirstyti pagal specifines šaperonų šeimas. Rezultatai parodė, kad visų tirtų baltymų sintezės lygis mielių kamieniuose neturinčiuose bet kurio vieno šaperono iš Hsp104, Hsp90 ir Hsp70 šaperonų grupių skyrėsi nuo sintezės lygio tėviniame BY4741 kamiene (3.1 pav A; 3.2 pav; 3.3 pav; 3.4 pav): UK114-EGFP fluorescencijos lygis nukrito 10–35 %, o HaPyV VP1-EGFP ir VP1 – dar daugiau.



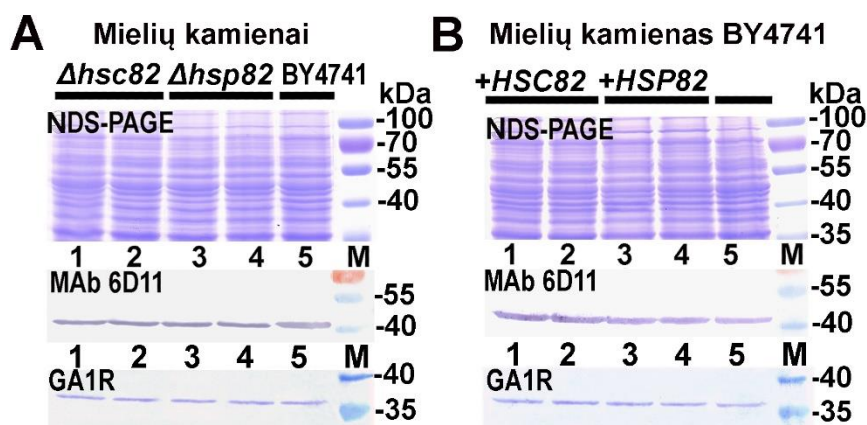
3.1 pav. VP1-EGFP ir UK114-EGFP baltymų fluorescentinė analizė mielių kamieniuose su Hsp104, Hsp90 ir Hsp70 šaperonų genų iškritomis (A) ir atskirų šaperonų genų padidinta raiška (B). Rezultato vertė pateikta procentais lyginant su tėviniu BY4741 kamienu. Paveiksle pateikti šešių skirtingų mielių transformantų rezultatų vidurkiai +/- SN. Reikšmingi skirtumai tarp VP1-EGFP ir UK114-EGFP baltymų fluorescencijos pažymėti žvaigždutėmis: (*) - $p < 0.05$; (**) - $p < 0.01$.

Mielių šaperonas Hsp104, kuris svarbus baltyminių agregatų išrinkime po streso bei mielių prionų paveldimumui (Chernoff, 2007) neigiamai veikia HaVP1 baltymo sintezės lygį. Mielių kamiene su *hsp104* geno iškrita VP1-EGFP baltymo fluorescencija padidėjo beveik ketvirtadaliu (22 %), lyginant su tėviniu BY4741 kamienu, ir sumažėjo 9 % mielių kamiene su padidinta *HSP104* geno raiška (3.1 pav). Šiuos rezultatus patvirtino ir imunoblotingo rezultatai su nemodifikuotu HaPyV VP1 mielių ląstelių lizatuose (3.2 pav). VP1 baltymo sintezė buvo šiek tiek didesnė $\Delta hsp104$ mielių kamiene ir sumažėjo atstačius Hsp104 raišką naudojant plazmidinę DNR su *CNE1* promotoriumi (3.2 pav, 1-4 takeliai). Atitinkamai, BY4741 kamiene padidinus Hsp104 baltymo lygį, VP1 baltymo kiekis ląstelių lizatuose šiek tiek sumažėjo (3.2 pav, 5-6 takeliai).



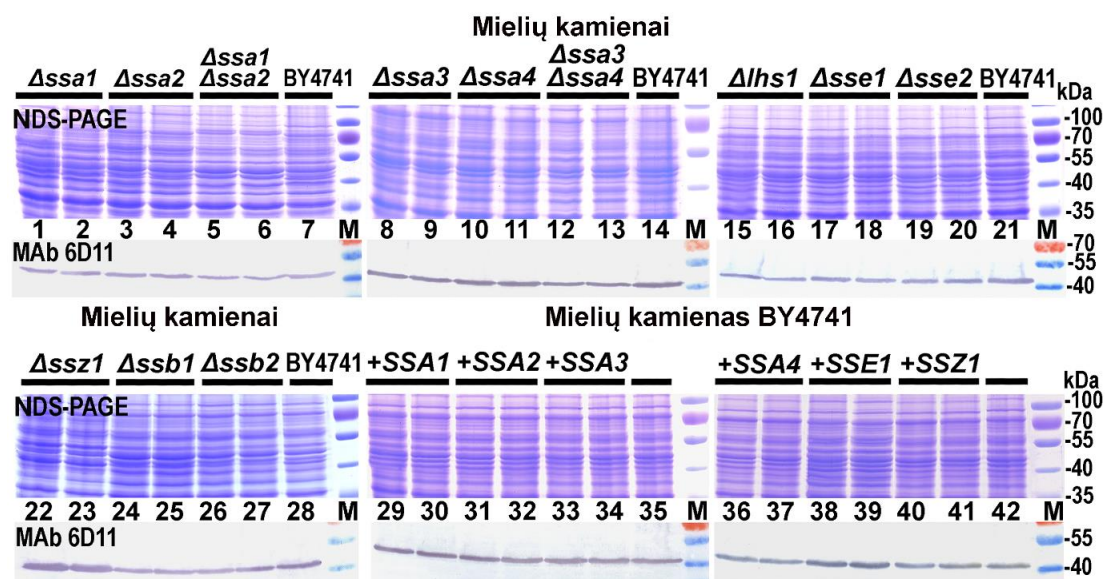
3.2 pav. HaPyV VP1 baltymo sintezės lygio įvertinimas mielių kamienuose su Hsp104 šaperono geno iškrita arba padidinta raiška. Nemodifikuoto HaPyV VP1 sintezės efektyvumas analizuotas mielių ląstelių lizatuose NDS-PAGE ir imunoblotinguose naudojant anti-Hsp104 Ak, 6D11 (anti HaPyV VP1) ir GA1R (anti-glicerinaldehido 3 fosfato dehidrogenazė) MAk. Geliuose išlaikytas tas pats mėginių eiliškumas. Takeliuose: mielių BY4741 $\Delta hsp104$ kamieno lizatai be (1-2) ir su papildoma *HSP104* geno sinteze (3-4); mielių tėvinio kamieno BY4741 lizatai be (5) ir su papildoma *HSP104* geno sinteze (6); BY4741 kamieno lizatas su pFGCNE1 vektoriumi (7). M, dažytas baltymų molekulinės masės žymeklis (Thermo Fisher Scientific Baltics).

HaPyV kapsidės baltymo VP1 sintezės lygis labiau priklausė nuo mielių Hsp90 šaperonų. Mielėse Hsp90 šaperonų šeimai priklauso dvi izoformos, koduojamos *HSC82* ir *HSP82* genų (Csermely ir kt., 1998). Mielių kamienuose su *HSC82* ir *HSP82* genų iškritomis VP1-EGFP ir VP1 baltymų lygis atitinkamai sumažėjo iki 70 ir 50 %, lyginant su tėviniu mielių kamieniu (3.1 pav A; 3.3 pav A). Papildoma *HSC82* ir *HSP82* genų raiška (kontroliuojama *CNE1* promotoriaus) padidino VP1-EGFP ir VP1 baltymų sintezės lygį atitinkamai iki 182 ir 166 %, lyginant su tėviniu BY4741 kamieniu (3.1 pav B, 3.3 pav B). Panašūs rezultatai buvo gauti tiriant *STII* iškritos įtaką VP1-EGFP fluorescencijos lygiui, kuris sumažėjo iki 68 %, bet nepaveikė UK114-EGFP sintezės lygio (3.5 pav). *Sti1* yra Hsp90 šaperono komplekso dalis svarbi jo aktyvumui (Li ir kt., 2012). Tuo tarpu kamienuose su kitų Hsp90 košaperonų *SBA1*, *AHA1*, *CPR6*, *CPR7* ir *PPT1* iškritomis ir VP1-EGFP, ir UK114-EGFP baltymų biosintezės lygiai sumažėjo panašiai (3.5 pav). Tai rodo, kad tik *Sti1* galėtų būti tas košaperonas, kuris kartu su Hsp90 dalyvauja VP1-EGFP sintezėje, o kitų tirtų košaperonų trūkumas svarbus tik bendram Hsp90 šaperonų šeimos aktyvumui, paveikiančiam visų rekombinantinių baltymų sintezės lygį.



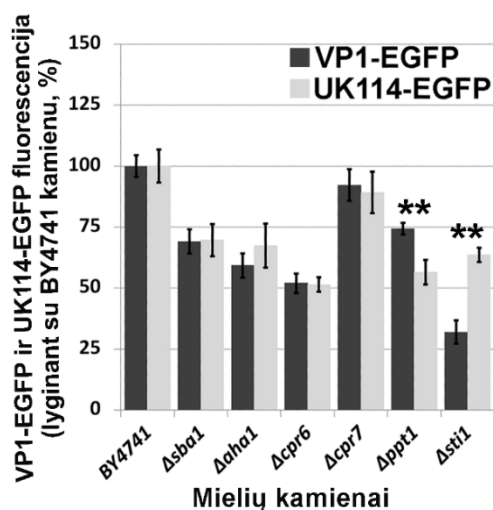
3.3 pav. HaPyV VP1 baltymo sintezės įvertinimas, mielių kamienuose su Hsc82 ir Hsp82 šaperonų genų iškritomis arba padidinta raiška. Nemodifikuoto HaPyV VP1 sintezės efektyvumas analizuotas mielių ląstelių lizatuose NDS-PAGE ir imunoblotinguose naudojant 6D11 ir GA1R MAK. Takeliuose: **(A)** mielių kamienų BY4741 $\Delta hsc82$ (1-2), BY4741 $\Delta hsp82$ (3-4) ir BY4741 (5) ląstelių lizatai; **(B)** mielių BY4741 kamieno su papildoma *HSC82* (1-2) ir *HSP82* (3-4) genų raiška ląstelių lizatai; mielių BY4741 kamieno ląstelių lizatas (5). M, dažytas baltymų molekulinės masės žymeklis (Thermo Fisher Scientific Baltics).

Hsp70 šaperonų šeimą mielėse sudaro devyni citozoliniai baltymai, kurių keturis koduoja *SSA* genai, po du – *SSB* ir *SSZ* genai bei *SSZI* genas. *LSH1* ir *KAR2* genai koduoja ir Hsp70 šaperonų narius. *Ssa1* ar. seka 99 %, 84 % ir 85 % panaši atitinkamai į *Ssa2*, *Ssa3* ir *Ssa4* ar. sekas. Kadangi, Δ *ssa1*, Δ *ssa2*, Δ *ssa3* ir Δ *ssa4* mielių kamienuose VP1-EGFP baltymo sintezė dėl galimo funkcinio kompensavimo (Werner-Washburne ir kt., 1987) nepakito lyginant su tėviniu BY4741 kamieniu (3.1 pav A), buvo sukurti ir panaudoti dvigubi Δ *ssa1 Δ *ssa2* ir Δ *ssa3 Δ *ssa4* mielių mutantai. Nors VP1-EGFP ir UK114-EGFP sintezės lygis sumažėjo abejuose dvigubuose mielių mutantuose, bet VP1-EGFP baltymo biosintezę labiau paveikė abiejų *SSA1* ir *SSA2* iškritos (3.1 pav A, 3.3 pav 5, 6, 12 ir 13 takeliai). Kitų Hsp70 šaperonų šeimos narių: *SSE1*, *SSE2*, *SSB1*, *SSB2* ir *LHS1* iškritos sumažino VP1-EGFP sintezės lygį 50 %, nors UK114-EGFP sintezės lygis sumažėjo tik 25 % (3.1 pav). *SSZI* geno iškrita padidino VP1 sintezės lygį daugiau nei du kartus lyginant su tėviniu BY4741 kamieniu (3.1 pav A; 3.4 pav 22-23 takeliai). *Ssz1* baltymas yra prie ribosomų prisijungiančio komplekso (RAC) dalis, stimuliuojanti *Ssb* šaperonų sąveiką su naujai sintetinama polipeptidine grandine (Huang ir kt., 2005). Papildoma atskirų Hsp70 šeimos narių genų raiška tik šiek tiek padidino arba neveikė VP1-EGFP ar VP1 sintezės efektyvumo (3.1 pav B, 3.4 pav 29-37 takeliai), išskyrus *SSE1* geną, kurio papildoma raiška padidino VP1-EGFP biosintezės lygį iki 150 % (3.1 pav B; 3.4 pav 38-39 takeliai).**



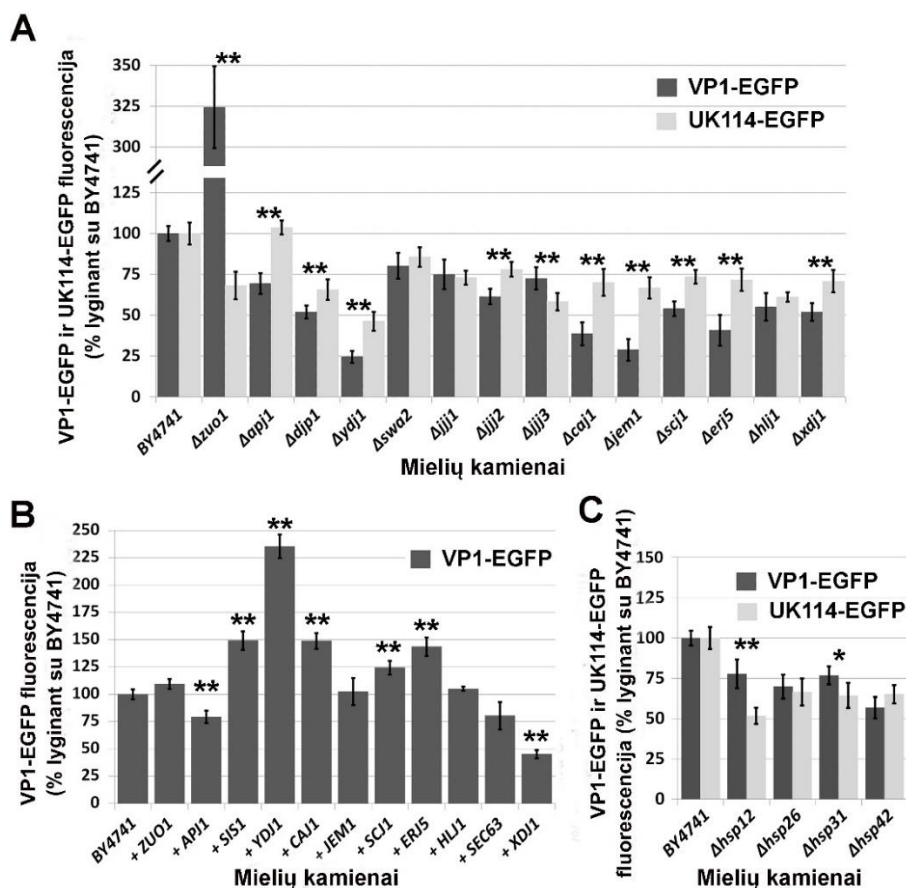
3.4 pav. HaPyV VP1 baltymo sintezės lygio įvertinimas, mielių kamienuose su Hsp70 šaperonų genų iškritomis arba padidinta raiška. Nemodifikuoto HaVP1 sintezės efektyvumas analizuotas mielių ląstelių lizatuose NDS-PAGE ir imunoblotinguose naudojant MAK 6D11. Takeliuose: mielių kamienų BY4741 Δ ssa1 (1-2), BY4741 Δ ssa2 (3-4), BY4741 Δ ssa1 Δ ssa2 (5-6), BY4741 (7, 14, 21, 28, 35 ir 42), BY Δ ssa3 (8-9), BY Δ ssa4 (10-11), BY Δ ssa3 Δ ssa4 (12-13), Δ lhs1 (15-16), Δ sse1 (17-18), Δ sse2 (19-20), Δ ssz1 (22-23), Δ ssb1 (24-25) ir Δ ssb2 (26-27) ląstelių lizatai; mielių BY4741 kamieno su papildoma SSA1 (29-30), SSA2 (31-32), SSA3 (33-34), SSA4 (36-37), SSE1 (38-39) ir SSZ1 (40-41) genų raiška ląstelių lizatai. M, dažytas baltymų molekulinės masės žymeklis (Thermo Fisher Scientific Baltics).

Mielių kamienuose su atsako į stresą *HSP26*, *HSP42*, *HSP12* ir *HSP31* mažųjų šaperonų genų iškritomis statistiškai patikimas poveikio skirtumas tarp VP1-EGFP ir UK114 sintezės lygių pastebėtas nebuvo (3.6 pav C), todėl jų poreikio toliau netyrėme.



3.5 pav. VP1-EGFP ir UK114-EGFP baltymų fluorescentinė analizė mielių kamienuose su Hsp90 košaperonų genų iškritomis. Rezultato vertė pateikta procentais lyginant su tėviniu BY4741 kamieniu. Paveiksle pateikti šešių skirtingų mielių transformantų rezultatų vidurkiai +/- SN. Reikšmingi skirtumai tarp VP1-EGFP ir UK114-EGFP baltymų fluorescencijos pažymėti žvaigždutėmis: (*) - $p < 0.05$; (**) - $p < 0.01$.

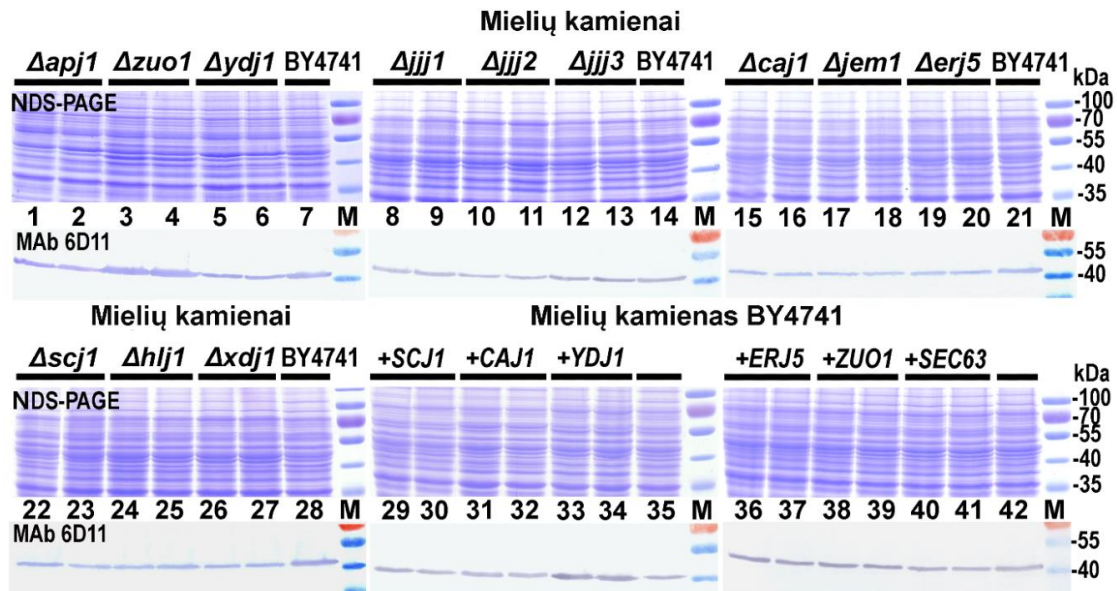
Hsp40 šaperonai arba košaperonai yra kita mažųjų šaperonų šeima pasižyminti J-domenu. Jie įtakoja Hsp70 šaperonų ATP-azinį ir funkcinį aktyvumą. Mielių kamienuose su visų Hsp40 košaperonų, išskyrus *ZUO1*, genų iškritomis abiejų tirtų rekombinantinių baltymų sintezės lygis buvo mažesnis negu tėviniame BY4741 kamiene (3.6 pav A). UK114-EGFP baltymo fluorescencijos lygis nukrito iki 20-40 % visuose tirtuose mutantuose, išskyrus $\Delta apj1$ kamieną, kuriame jokių pokyčių nenustatyta, nors VP1-EGFP baltymo sintezės lygis $\Delta apj1$ mielių kamiene sumažėjo apie 30 % (3.6 pav A). Labiausiai abiejų rekombinantinių baltymų UK114-GFP ir VP1-EGFP fluorescencijos lygis sumažėjo $\Delta ydj1$ mielių kamiene iki 50 % ir 75 % atitinkamai (3.6 pav A), todėl galima teigti, jog Ydj1 yra labai svarbus šaperonas rekombinantinių baltymų, tame tarpe ir virusinių, sintezei. Reikšmingi UK114-GFP ir VP1-EGFP biosintezės lygio skirtumai buvo nustatyti $\Delta jem1$, $\Delta caj1$, $\Delta erj1$ ir $\Delta zuo1$ mielių kamienuose. $\Delta zuo1$ mutantiniame kamiene VP1-EGFP sintezė buvo tris kartus efektyvesnė, bet sumažėjo daugiau nei 60 % $\Delta jem1$, $\Delta caj1$, $\Delta erj1$ kamienuose. BY4741 tėviniame kamiene padidinus šaperonų turinčių J-domeną genų raišką VP1-EGFP produkcija labiausiai (iki 235 %) išaugo dėl papildomos *YDJ1* geno raiškos (3.6 pav B). $\Delta zuo1$ kamiene VP1-EGFP ir VP1 baltymų sintezės lygis buvo net didesnis nei kamiene su *SSZ1* geno iškrita (3.1 pav A), nors Ssz1 ir Zuo1 šaperonai yra RAC partneriai. Atstačius *ZUO1* geno aktyvumą $\Delta zuo1$ kamiene VP1-EGFP sintezės lygis grįžo į tėvinio kamieno lygį (duomenys nepateikiami).



3.6 pav. VP1-EGFP ir UK114-EGFP baltymų fluorescencinė analizė mielių kamienuose su Hsp40 šaperono genų iškritomis (A), padidinta Hsp40 šaperonų genų raiška (B) ir kamienuose su mažųjų šaperonų genų iškritomis (C). Rezultato vertė pateikta procentais lyginant su tėviniu BY4741 kamieniu. Paveiksle pateikti šešių skirtingų mielių transformantų rezultatų vidurkiai +/- SN. Reikšmingi skirtumai tarp VP1-EGFP ir UK114-EGFP baltymų fluorescencijos (A, C) ir VP1-EGFP fluorescencijos reišmingas skirtumas lyginant su fluorescencija tėviniame kamienne BY4741 (B) pažymėti žvaigždutėmis: (*) - $p < 0.05$; (**) - $p < 0.01$.

Eukariotuose yra du su ribosomomis susiję kompleksai: RAC, kuris sąveikauja su Hsp70 šaperonais (mielėse su Ssb1 ir Ssb2) ir NAC, su sintetinamu polipeptidu susijęs heterodimerinis (mielėse jis sudarytas iš trijų subvienetų) kompleksas (Gautschi ir kt., 2002; Huang ir kt., 2005; Chen ir kt., 2014; Preissler ir Deuerling, 2012; Peisker ir kt., 2010). Abu kompleksai yra svarbūs *de novo* baltymų susilankstymui, reguliuoja ribosomų biogenezę, moduliuoja transporto per membraną procesus ir taip kontroliuoja baltymų sintezę (Preissler ir Deuerling, 2012). NAC subvienetų ir Ssb genų iškritos sumažino VP1 baltymo sintezės lygį nuo 30 iki 60 % (duomenys neparodyti; 3.1 pav A). Tuo tarpu bet kurio iš RAC komplekso subvienetų Ssz1 ar Zuo1

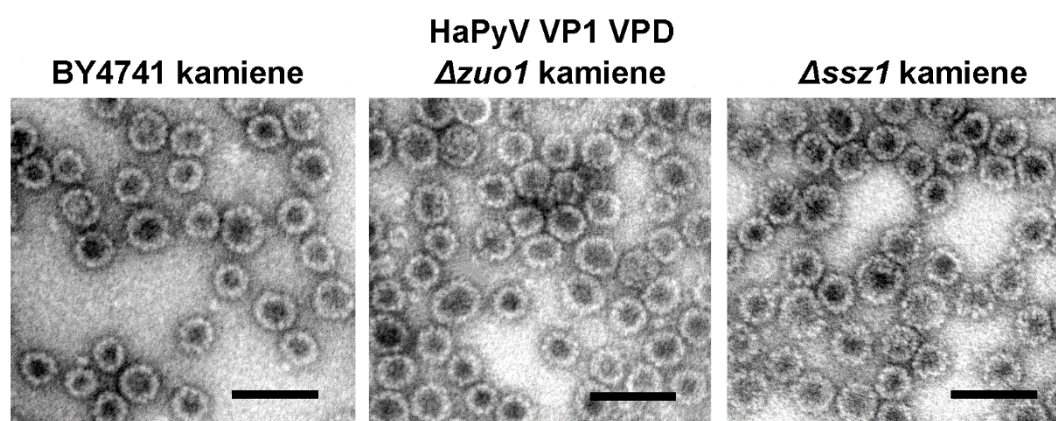
trūkumas 2,5-3 kartus padidino VP1 ir VP1-EGFP sintezės lygį (3.7 pav 3, 4 takeliai; 3.4 pav 22, 23 takeliai; 3.1 pav A ir 3.6 pav A).



3.7 pav. HaPyV VP1 baltymo sintezės lygio įvertinimas, mielių kamienuose su Hsp40 šaperonų genų iškritomis arba padidinta raiška. Nemodifikuoto HaPyV VP1 sintezės efektyvumo analizė mielių ląstelių lizatuose NDS-PAGE ir imunoblotinguose naudojant MAk 6D11. Takeliuose: mielių kamienų *Δdap1* (1-2), *Δzuo1* (3-4), *Δydj1* (5-6), BY4741 (7, 14, 21, 28, 35 ir 42), *Δjji1* (8-9), *Δjji2* (10-11), *Δjji3* (12-13), *Δcaj1* (15-16), *Δjem1* (17-18), *Δerj5* (19-20), *Δscj1* (22-23), *Δhlj1* (24-25) ir *Δxdj1* (26-27) ląstelių lizatai; mielių BY4741 kamieno su papildoma *SCJ1* (29-30), *CAJ1* (31-32), *YDJ1* (33-34), *ERJ5* (36-37), *ZUO1* (38-39) ir *SEC63* (40-41) genų, kontroliuojamų CNE1 promotoriaus, raiška ląstelių lizatai. M, dažytas baltymų molekulinės masės žymeklis (Thermo Fisher Scientific Baltics).

Pagal kai kuriuos tyrimus trūkstant RAC komponento ir sutrikus RAC komplekso veikimui gali sutrikti transliacijos tikslumas (Gautschi ir kt., 2002; Huang ir kt., 2005; Chen ir kt., 2014). Patvirtinimui, kad *Δssz1* ir *Δzuo1* mielių ląstelėse sintetinama daugiau VP1 baltymo ne dėl sutrikusio transliacijos tikslumo ir sumažėjusios kokybės kontrolės, o susintetinti VP1 baltymai efektyviai formuoja VPD, HaPyV VP1 VPD buvo išgrynintos CsCl gradientinio ultracentrifugavimo metodu iš *Δssz1*, *Δzuo1* ir BY4741 mielių kamienų. Buvo įvertintos išgrynintų baltymų išeigos, o mėginiai išanalizuoti elektroniniu mikroskopu (EM). EM nuotraukose galima matyti, kad iš visų trijų kamienų išgryninti VP1 baltymai formavo simetriškas tradicinio dydžio - 45-50 nm skresmens - VPD (3.8 pav). VP1 VPD išeigos buvo du ir tris kartus

didesnės atitinkamai gryninant iš $\Delta ssz1$, $\Delta zuo1$ mielių kamienų lyginant su tėviniu BY4741 kamieniu. Taigi, RAC komplekso trūkumas neturėjo įtakos VP1 baltymo transliacijos tikslumui, nes net nedideli VP1 baltymo sekos pokyčiai gali įtakoti VPD susirinkimą, o šis rezultatas patvirtino tekmės citometrijos metodu ir imunoblotingu nustatytą 2,5-3 kartų didesnę VP1-EGFP fluorescencijos intensyvumą ir VP1 baltymo kiekį $\Delta ssz1$, $\Delta zuo1$ mielių kamienuose.



3.8 pav. HaPyV VP1 VPD išgrynintų iš BY4741, $\Delta zuo1$ ir $\Delta ssz1$ mielių kamienų EM nuotraukos. Skalė – 100 nm.

$\Delta ssz1$ ir $\Delta zuo1$ mielių kamienuose padidėjo ir visų 13 žmogaus PyV VP1 sintezės lygis, tačiau, kadangi $\Delta ssz1$ ir $\Delta zuo1$ kamienai pasižymi sulėtėjusiu augimu normaliomis sąlygomis, jie nebuvo naudojami VP1 VPD išskyrimui. Neseniai K. Goda (Goda K., 2017) parodė, kad papildomai įvesti nedideli Ssz1 ir Zuo1 šaperonų kiekiai BY4741 $\Delta ssz1$ ir BY4741 $\Delta zuo1$ kamienų ląstelėse panaikina šių kamienų augimo defektus, bet nesumažina rekombinantinių virusinių baltymų išeigos, ir padaro šiuos kamienus tinkamus biotechnologiniams tikslams.

3.1.2. Mielių ląstelių flokuliacijos, sukeltos poliomos virusų VP1 raiškos, tyrimas

Jau anksčiau (Sasnauskas ir kt., 2002) buvo pastebėta, kad APyV VP1 raiška mielių ląstelėse yra lydima mielių flokuliacijos, o tai ne tik apsunkina mielių ląstelių ardymą, bet ir stipriai sumažina išgryninto VP1 baltymo išeigas.

Ilgainiui plečiantis skirtingų VP1 baltymų susintetintų mielėse ratui pasirodė, kad yra ir daugiau VP1 baltymų, kurių sintezė indukuoja mielių ląstelių flokuliaciją, pvz., mielėse flokuliaciją įjungia paukščių PyV: papūgų, žašų, kikilių ir varnų (Zielonka ir al. 2006; 2012), taip pat pelėnų PyV, bet ne beždžionių, pelių ar žiurkėno poliomos virusų VP1 baltymų raiška. Mielių flokuliacija - nelytinio tipo, homotipinis, grįžtamas ir multivalentinis agregacijos procesas, dėl kurio mielių ląstelės sudaro multiląstelinę masę (Stratford ir kt., 1992). Atominės jėgos mikroskopijos tyrimai patvirtino kad baltymų flokulinių raiška mielių sienelės paviršiuje yra esminė šiam fenotipui pasireikšti (El-Kirat-Chatel ir kt., 2015). Žinoma, kad mielių ląstelių flokuliaciją gali sukelti įvairiausios priežastys: metabolizmo, temperatūros ar pH pokyčiai, mechaniniai poveikiai, augimo terpės sudėtis, kamieno genetinės charakteristikos ir kt. (Claro ir kt., 2007). Vis dėlto, nors raiškos sąlygos yra identiškos, mielių flokuliaciją sukelia tik kai kurių VP1 baltymų sintezė. Kadangi VP1 baltymų sekos yra gana panašios (50-96 %) ir paprasti VP1 baltymų sekų palyginimai nepaaiškina šios flokuliacijos priežasčių, tyrimas buvo atliekamas dviem kryptimis: 1) nustatant mielių genus, kurių trūkumas specifiškai pašalina VP1 baltymo sukeltą flokuliaciją; 2) nustatant VP1 baltymo sekas galimai atsakingas už flokuliacijos indukciją. Abejuose tyrimuose kaip pagrindiniai modeliniai baltymai buvo naudojami: paukščių PyV (APyV) VP1 baltymas, kurio sintezės sukeliama flokuliacija yra labai intensyvi ir žiurkėno PyV (HaPyV) VP1 baltymas, kurio sintezė flokuliacijos nesukelia. Gauti rezultatai buvo vėliau patikrinti ir su kitų PyV VP1 baltymais.

3.1.2.1. Genų, kurių trūkumas specifiškai pašalina VP1 baltymo sukeltą flokuliaciją, atranka

Genų, kurių trūkumas specifiškai pašalina VP1 baltymo sukeltą flokuliaciją, atrankai buvo panaudota mielių mutantų kolekcija. Mutantiniai mielių kamienai buvo transformuojami pFGG3-AVP1 plazmide ir vizualiai tiriami ar transformuotuose kamienuose su atrinktų genų iškritomis išnyksta APyV VP1 baltymo sukelta flokuliacija. Neflokuliuojant kamienai buvo

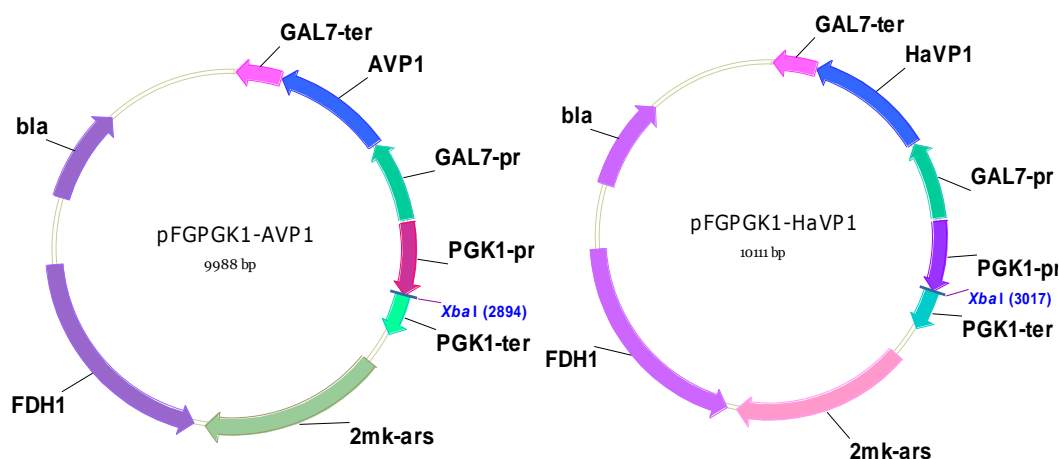
transformuojami pFGG3-HaVP1-GFP plazmidėmis bei tikrinamas HaPyV VP1-GFP sintezės efektyvumas srauto citometrijos metodu. Tai leido atmesti mutantinius kamienus, kuriuose flokuliacija nevyko todėl, kad nevyko ar labai sumažėjo VP1 baltymo sintezė dėl atitinkamo mielių geno iškritos. Po patikrinimo buvo atrinkti 9 mielių mutantiniai kamienai, dėl kurių genų iškritų galimai susilpnėjo arba visai neįsijungė mielių flokuliacija APyV VP1 sintezės metu (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. Tyrimo metu atrinkti *S. cerevisiae* genai, kurių iškritos keičia APyV VP1 sukeltos flokuliacijos fenotipą.

Standartinis pavadinimas	Sisteminis pavadinimas	Fenotipas
<i>Δflo1</i>	YAR050W	Neflokuliuoja
<i>Δapp1</i>	YNL094W	Flokuliacija labai silpna
<i>Δfdc1</i>	YDR539W	Neflokuliuoja
<i>Δybr062C</i>	YBR062C	Neflokuliuoja
<i>Δycr100C</i>	YCR100C	Neflokuliuoja
<i>Δirc4</i>	YDR540C	Neflokuliuoja
<i>Δldb7</i>	YBL006C	Flokuliacija labai silpna
<i>Δnpl3</i>	YDR432W	Neflokuliuoja
<i>Δubp5</i>	YER144C	Neflokuliuoja

Visi 9 atrinkti mielių genai (3.1 lentelė) buvo padauginami nuo mielių *S. cerevisiae* genomines DNR, patikrinti sekoskaitos metodu ir įterpti tarp *PGK1* promotoriaus ir *PGK1* terminatoriaus mielių raiškos vektoriuose, kuriuose yra APyV VP1 genas arba HaPyV VP1 genas reguliuojamas galaktoze indukuojamo *GAL7* promotoriaus (3.9 pav). Sukonstruotos plazmidinės DNR buvo transformuotos į mielių ląsteles su analizuojamo geno iškrita bei tėvinio kamieno ląsteles. Mielių transformantuose indukavus VP1 baltymų sintezę buvo analizuojama mielių flokuliacija. Kiekvienu atveju buvo tikrinta po 6 skirtingus mielių transformantus. *APP1*, *FDC1*, *YBR062C*, *YCR100C*, *IRC4*, *LDB7*, *NPL3*, *UBP5* genų raiška atitinkamuose mielių mutantuose, su

analizuojamo geno iškritomis, bei tėviniame BY4741 kamiene neturėjo įtakos nustatytam mutantų flokuliacijos fenotipui ir toliau tiriami nebuvo. Gali būti, kad šiuose mielių kamienuose dėl atitinkamų mutacijų spaudimo laikui bėgant įvyko supresorinės mutacijos, kurios kažkaip įtakojo ir flokuliacijos įjungimo procesus. Tokių supresorinių mutacijų susikaupimas vis dažniau yra pastebimas dirbant su mielių mutantų kolekcija.



3.9 pav. pFGPGK plazmidžių skirtų svetimų baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae* schemas. pFGPGK plazmidės turi 2μ plazmidės ARS ir bakterijų ORI DNR fragmentus, kuriuose yra DNR replikacijos pradžios sekos, todėl šios plazmidės gali daugintis bakterijų ir mielių ląstelėse. Vektoriaus atrankos žymenys (violetine spalva): mielėse yra FDH1 – *Candida maltosa* formaldehid dehidrogenazės genas, o bakterijose yra *bla* genas, suteikiantis atsparumą ampicilinui. Tarp galaktoze indukuojamo GAL7 promotoriaus ir GAL7 terminatoriaus yra įterpti AVP1 (APyV VP1) arba HaVP1 (HaPyV VP1) genai (mėlyna spalva). Analizuojami 9 genai įterpti (3.1 lentelė) per XbaI restrikcijos endonukleazės kirpimo vietą (pažymėta mėlynai) tarp PGK1 promotoriaus ir PGK1 terminatoriaus, ir tokios plazmidės skirtos dviejų baltymų sintezei mielių ląstelėse vienu metu (AVP1 / HaVP1 ir vieno iš genų pretendentų).

FLO1 geno raiška sukėlė mielių flokuliaciją tiek mutantiniame, tiek ir BY4741 kamiene net ir neindukavus APyV VP1 raiškos. Kadangi kitus flokulinus koduojančių ar reguliuojančių genų $\Delta flo10$, $\Delta flo11$, $\Delta flo8$, $\Delta flo5$ ir $\Delta flo9$ bei pagalbinių: $\Delta aga1$, $\Delta aga2$, $\Delta fig1$, $\Delta sag1$ iškritos neturėjo jokios pastebimos įtakos VP1 baltymo sintezės sukeliama flokuliacijai mielių ląstelėse, tapo aišku, kad už ją atsakinga būtent *FLO1* geno raiška. *FLO1* genas yra lokalizuotas pirmos chromosomos telomerinėje srityje, kaip ir kiti flokulinus koduojantys genai, aptinkami telomerinėse arba subtelomerinėse

mielių chromosomų srityse (Russell ir kt., 1980; Sieiro ir kt., 1997; Verstrepen ir kt., 2003; Halme ir kt., 2004). Nustatyta, kad šių genų, taip pat ir *FLO1*, reguliacijoje labai svarbų vaidmenį vaidina genai, kurių produktai yra susiję su mielių *S. cerevisiae* telomerų galų chromatino nutildymo procesais. Pagal mielių *S. cerevisiae* genomo duomenų bazės SGD duomenis tokių genų yra net 163, iš jų 11 genų, kurių iškritos sukelia flokuliaciją, o 21 genas yra esminis mielių ląstelių gyvybingumui (3.2 lentelė).

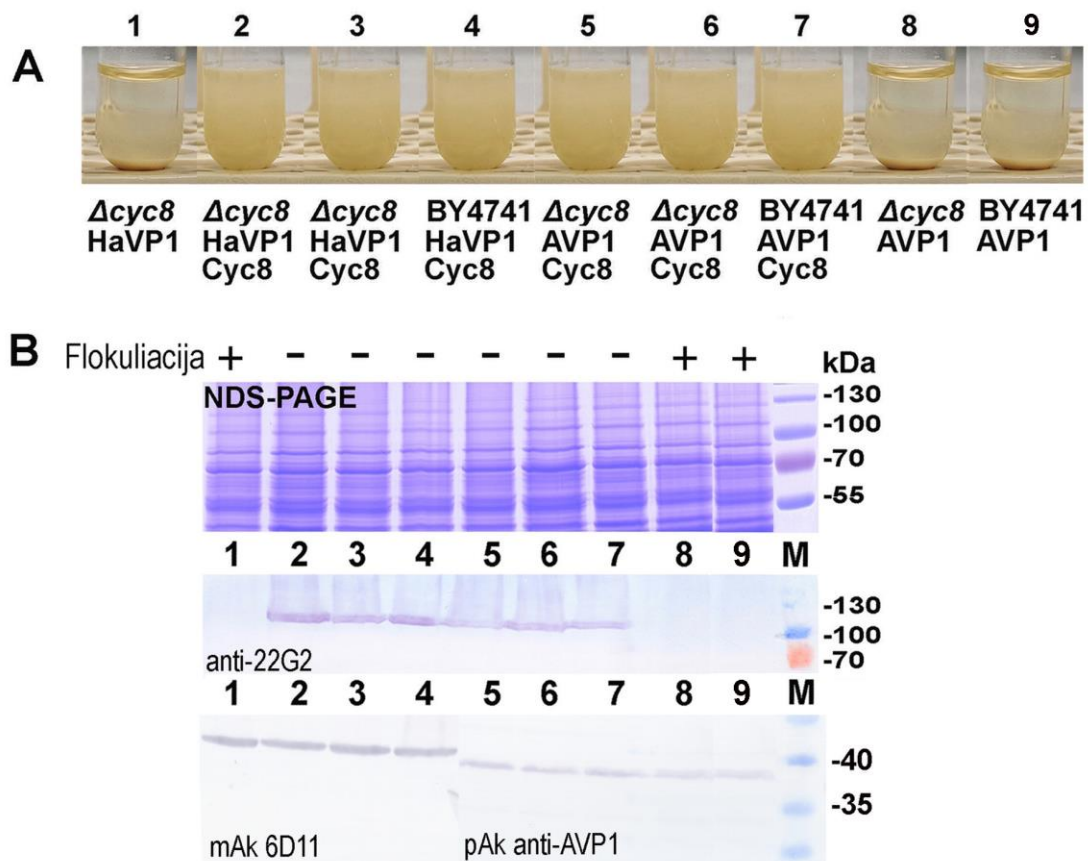
3.2 lentelė. *S. cerevisiae* genai, susiję su telomerų galų chromatino nutildymo procesais (pagal SGD).

<i>S. cerevisiae</i> genai, kurių iškritų mielių mutantai pasižymi flokuliuojančiu fenotipu		<i>S. cerevisiae</i> esminiai genai, susiję su telomerų galų chromatino nutildymo procesais (pagal SGD) ir kurių mutantai prieinami YTHC kolekcijoje.			
Standartinis pavadinimas	Sisteminis pavadinimas	Standartinis pavadinimas	Sisteminis pavadinimas	Standartinis pavadinimas	Sisteminis pavadinimas
<i>HSP12</i>	YFL014W	<i>ABF1</i>	YKL112W	<i>NUP145</i>	YGL092W
<i>RVB2</i>	YPL235W	<i>CDC45</i>	YLR103C	<i>ORC1</i>	YML065W
<i>SLF1</i>	YDR515W	<i>CDC6</i>	YJL194W	<i>ORC2</i>	YBR060C
<i>SSD1</i>	YDR293C	<i>CDC7</i>	YDL017W	<i>ORC5</i>	YNL261W
<i>CYC8</i>	YBR112C	<i>EPE1</i>	YDL087C	<i>POL30</i>	YBR088C
<i>TUP1</i>	YCR084C	<i>IFH1</i>	YLR223C	<i>RAP1</i>	YNL216W
<i>BDF1</i>	YLR399C	<i>IRA1</i>	YBR140C	<i>RNA1</i>	YMR235C
<i>BRE2</i>	YLR015W	<i>MCM10</i>	YIL150C	<i>RNT1</i>	YMR239C
<i>MIT1</i>	YEL007W	<i>MCM3</i>	YEL032W	<i>SEN1</i>	YLR430W
<i>SSN3</i>	YPL042C	<i>MCM7</i>	YLR274W		
<i>SSN2</i>	YDR443C	<i>MPT1</i>	YMR005W		

Net 20 iš šių esminių genų, valdomų titruojamu tetraciklino promotoriumi, yra mielių kamienų YTHC kolekcijoje. Šios kolekcijos mutantuose galima užauginus mutantinio kamieno ląsteles ir indukavus rekombinantinio baltymo sintezę (šiuo atveju APyV VP1) išjungti pasirinkto esminio geno raišką, pridodant dioksiciklino į auginimo terpę. Tai suteikia galimybę tirti esminių genų reikalingumą tiriamiems procesams. Ištyrus visų

turimų 20 esminių genų (3.2 lentelė) raiškos išjungimo pasekmes flokuliacijai jokių pokyčių nebuvo nustatyta. Gali būti, kad šie genai nėra susiję su VP1 indukuojama flokuliacija arba šis tyrimo būdas nėra tinkamas šiam reiškiniui tirti, nes po to, kai flokuliniai jau yra eksponuojami mielių ląstelių sienelėje, jų sąveikos su α -manozės liekanomis nėra grįžtamos. Neesminių genų, susijusių su mielių *S. cerevisiae* telomerų galų chromatino nutildymo procesais, mutantai taip pat nesumažino VP1 sintezės sukeltos flokuliacijos, todėl toliau buvo tiriami 11 mutantų, kurių genų iškritos sukėlė mielių mutantų flokuliaciją ir be VP1 baltymo raiškos (3.2 lentelė). Vienuolika genų, kurių iškritos sukėlė flokuliaciją (3.2 lentelė), buvo padauginti nuo mielių *S. cerevisiae* genomines DNR, patikrinti sekoskaitos metodu ir įterpti tarp *PGK1* promotoriaus ir *PGK1* terminatoriaus mielių raiškos vektoriuose, kuriuose buvo APyV VP1 genas arba HaPyV VP1 genas reguliuojami galaktoze indukuojamo *GAL7* promotoriaus (3.9 pav). Sukonstruotos plazmidinės DNR buvo panaudotos mielių transformacijai ir transformantuose indukavus VP1 baltymų sintezę buvo analizuojama mielių flokuliacija. Nors visų tikrintų genų raiška atitinkamuose mutantuose kompensavo trūkstamo geno poreikius, tačiau tik *CYC8* geno raiška atstatė Cyc8 baltymo trūkumą ne tik $\Delta cyc8$ mielių mutante, bet ir slopino APyV VP1 baltymo sintezės sukeltą flokuliaciją tiek $\Delta cyc8$ mutante, tiek ir BY4741 kamieno (3.10 pav A). Taigi, būtent Cyc8 baltymo trūkumas gali būti atsakingas už VP1 baltymo indukuojamą mielių flokuliaciją.

Papildomo rekombinantinio Cyc8 baltymo sintezė buvo patvirtinta mielių ląstelių lizatuose imunoblotingo metodu naudojant MAk 22G2 prieš sintetinio Cyc8 baltymo C gale įvestą 22G2 epitopą (Žvirblienė ir kt., 2006) (3.10 pav B). Taip pat imunoblotingo metodu naudojant MAk 6D11 ir PAK anti-AVP1 buvo patvirtinta ir rekombinantinių APyV bei HaPyV VP1 baltymų raiška.



3.10 pav. Mielų flokuliacijos analizė $\Delta cyc8$ arba BY4741 mielių kamienuose, su indukuota APyV arba HaPyV VP1 baltymų bei papildoma Cyc8 baltymo sinteze. (A) Fenotipinė mielių flokuliacijos analizė $\Delta cyc8$ arba BY4741 mielių kamienuose ir **(B)** APyV ir HaPyV VP1 baltymų bei papildomo Cyc8 baltymo sintezės patvirtinimas imunoblotingo metodu mielių ląstelių lizatuose naudojant MAk 22G2, 6D11 ir anti-APyV VP1 PAK. Mėginių numeracija A ir B dalyse sutampa. Takeliuose užnešti mielių ląstelių lizatai: $\Delta cyc8$ mielių kamienas su indukuota HaPyV VP1 sinteze (1) bei du mielių klonai su papildoma Cyc8 baltymo sinteze (2-3), BY4741 mielių kamienas su su indukuota HaPyV VP1 sinteze ir papildoma Cyc8 baltymo sinteze (4); $\Delta cyc8$ mielių kamienas su indukuota APyV VP1 sinteze (8) bei du mielių klonai su papildoma Cyc8 baltymo sinteze (5-6), BY4741 mielių kamienas su su indukuota APyV VP1 sinteze (9) ir su papildoma Cyc8 baltymo sinteze (7); M, dažytas baltymų molekulinės masės žymeklis (Thermo Fisher Scientific Baltics).

Literatūros duomenimis Cyc8 baltymas kartu su keturiais Tup1 subvienetais sudaro kompleksą, susijusį su chromosomų telomerų nutildymu ir yra plataus veikimo represorius bei gali histonų deacetilazių pagalba reguliuoti genų raišką (Varanasi ir kt., 1996; Wong ir Struhl, 2011). Kadangi Cyc8-Tup1 komplekso svarba reguliuojant *FLO1* geno raišką yra nustatyta Fleming ir jo kolegų darbuose (Fleming ir kt., 2014), gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad APyV VP1 baltymo raiška tiesiogiai ar netiesiogiai sumažina Cyc8 baltymo kiekį ar kitaip apriboja jo dalyvavimą Cyc8-Tup1 komplekso sudaryme

ir todėl yra indukuojama *FLO1* geno raiška sukianti mielių ląstelių flokuliaciją.

Siekiant įsitikinti, kad *Cyc8p* trūkumas atsakingas ir už kitų PyV VP1 baltymų sintezės sukeltą mielių flokuliaciją, šie baltymai buvo patikrinti. Tik trijų iš 13 žmogaus poliomos virusų (1.1 lentelė): MCPyV, HPyV10 ir STLPyV VP1 baltymų, kaip ir rudojo pelėno (BVPyV) VP1 baltymo (Nainys ir kt., 2015), sintezė mielių ląstelėse sukelia flokuliaciją. MCPyV, HPyV10, STLPyV ir BVPyV VP1 genai buvo įklonuoti tarp indukuojamo *GAL7* promotoriaus ir *GAL7* terminatoriaus į mielių raiškos vektorių, kuriame yra *CYC8* genas kontroliuojamas *PGK1* promotoriaus. Po VP1 baltymo sintezės indukcijos (atitinkamų VP1 baltymų sintezė mielių ląstelių lizatuose buvo patikrinta imunoblotingo metodu (3.11 pav B), analizuojant mielių transformantus su papildomo *CYC8* geno raiška, MCPyV, HPyV10, STLPyV ir BVPyV VP1 sintezė kaip ir APyV VP1 atveju flokuliacijos nebeindukavo (3.11 pav A dešinėje). Taigi, galima teigti, kad ir kitų PyV VP1 baltymų sintezė mielių ląstelėse indukuoja flokuliaciją per *Cyc8* baltymo apribojimą dalyvauti *Cyc8-Tup1* reguliaciniame komplekse.

Šio tyrimo metu sukonstruoti PFG-CYC8-PGK, PFG-CYC8-CNE1 mielių raiškos vektoriai galės būti panaudoti ir kitų rekombinantinių VP1 baltymų, kurių sintezė sukelia flokuliaciją, gavimui. Norimą geną galima klonuoti pasirenkant promotoriaus efektyvumą (*PGK1* arba *CNE1*).

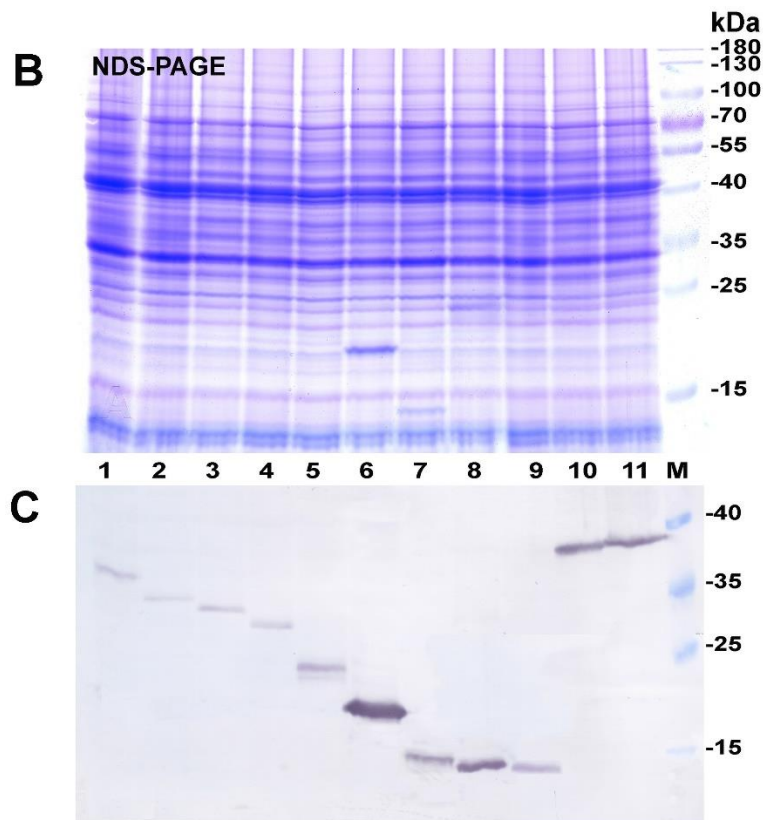
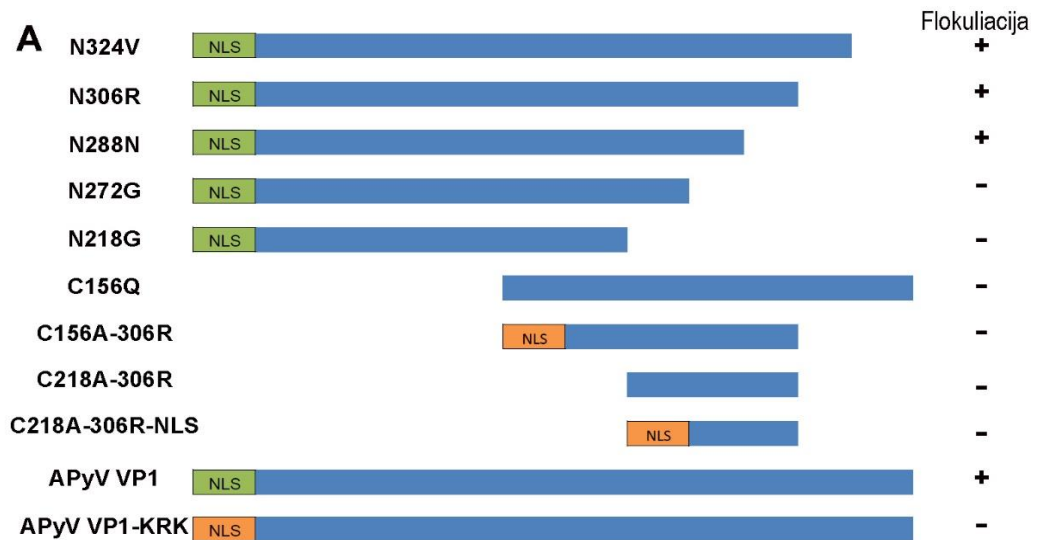
3.1.2.2. VP1 baltymo sekų, atsakingų už flokuliacijos indukciją, paieška

Siekiant išsiaiškinti, kurios VP1 baltymo sekos yra galimai atsakingos už flokuliacijos indukciją buvo sukonstruoti modelinio APyV VP1 baltymo mutantiniai variantai bei palyginimui trys HaPyV VP1 N galo mutantai (3.3 lentelė, 3.12 pav A).

3.3 lentelė. Flokuliacijos tyrime naudotų baltymų sąrašas.

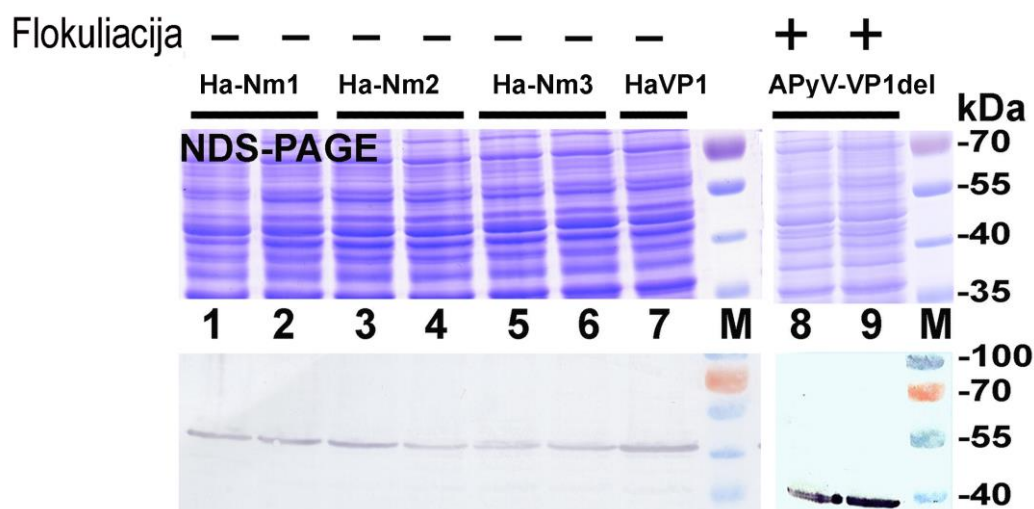
Pavadinimas	Baltymo seka	NLS ar. seka ¹	Baltymo dydis kDa
N324V	APyV VP1 baltymas nuo 1 iki 324 ar.	MSQ KGK -GSCPR	35,59
N306R	APyV VP1 baltymas nuo 1 iki 306 ar.	MSQ KGK -GSCPR	33,42
N288N	APyV VP1 baltymas nuo 1 iki 288 ar.	MSQ KGK -GSCPR	31,41
N272G	APyV VP1 baltymas nuo 1 iki 272 ar.	MSQ KGK -GSCPR	29,36
N218G	APyV VP1 baltymas nuo 1 iki 218 ar.	MSQ KGK -GSCPR	23,68
C156Q	APyV VP1 baltymas nuo 156 iki 344 ar. ilgio	-	21,17
C156A-306R	APyV VP1 baltymas nuo 156 iki 306 ar. ilgio	-	18,45
C218A-306R	APyV VP1 baltymas nuo 218 iki 306 ar. ilgio	-	11,43
C218A-306R-NLS	APyV VP1 baltymas nuo 218 iki 306 ar ilgio	MAP KRK -G STKR	10,88
APyV VP1	Pilno ilgio APyV VP1 baltymas (344 ar.)	MSQ KGK -GSCPR	37,54
APyV VP1del	APyV VP1 baltymas su 6 ar. iškrita	M-----GSCPR	36,99
APyV VP1-KRK	Pilno ilgio APyV VP1 baltymas su SV40 būdinga NLS seka (345 ar.)	MAP TKRK GSCPR	37,59
HaPyV VP1	HaPyV VP1 baltymas	MAP KRK SGASSR	42,35
Ha-Nm1	HaPyV VP1 baltymas	MAP KGK SGASSR	41,6
Ha-Nm2	HaPyV VP1 baltymas be KRK ar.	MAP---SGASSR	41,03
Ha-Nm3	HaPyV VP1 baltymas su APyV VP1 N galo seka	MSQ KGK G--SSR	41,23

¹ Geltona spalva pažymėta SV40 VP1 būdinga NLS seka; žalia spalva pažymėta APyV VP1 būdinga NLS seka. Raudonai paryškintas klasikinis konsensusas K(R)K NLS sekose.



3.12 pav. APyV pagrindinio kapsidės baltymo VP1 sutrumpintų baltymų schema (A) bei sintezės mielėse patvirtinimas NDS-PAGE (B) ir imunoblotinge (C) naudojant anti-VP1 PAK. Schemoje A žalia spalva pavaizduota natyvi PyV nukreipimo į branduolį seka (NLS), oranžine spalva - SV40 viruso NLS, mėlyna spalva - baltymo ar. seka. Dešinėje plusais pažymėti tie APyV VP1 baltymai, kurių sintezė sukelia flokuliaciją mielių ląstelėms. B ir C takeliuose AH22-214 kamieno mielių ląstelių lizatai su indukuota atitinkamų VP1 baltymų sinteze: N324V (1), N306R (2), N288N (3), N272G (4), N218G (5), C156Q (6), C156A-306R-NLS (7), C218A-306R (8), C218A-306R-NLS (9), APyVP1 (10), APyVP1-KRK (11). M, dažytas baltymų molekulinės masės žymeklis (Thermo Fisher Scientific Baltics).

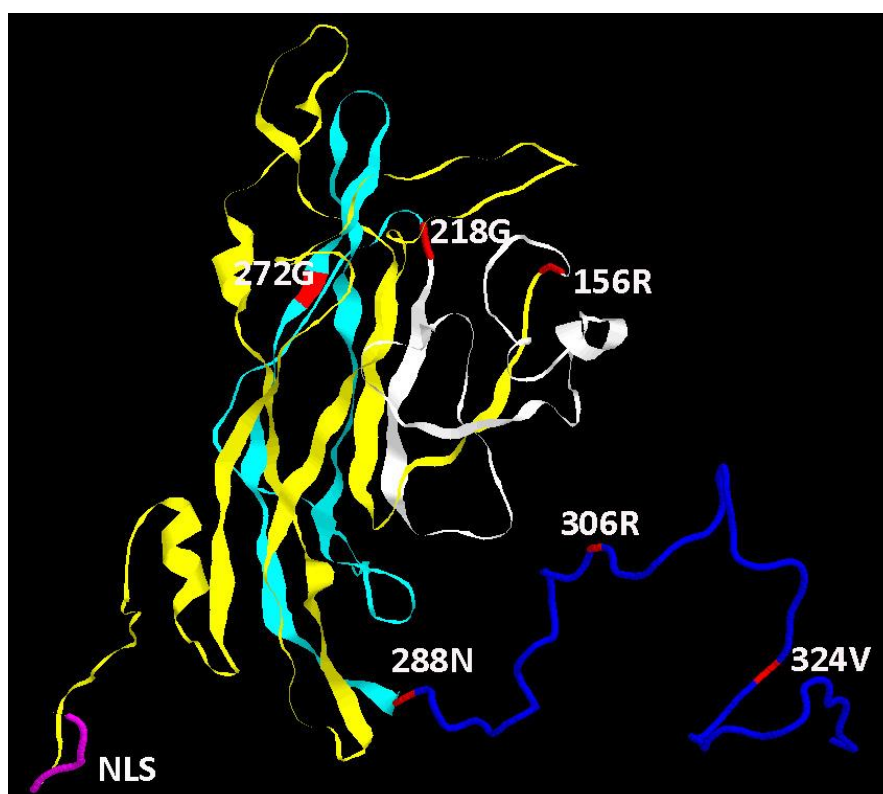
APyV ir HaPyV VP1 genų sekos buvo patrumpintos ar pakeistos PGR metodu naudojant atitinkamas natyvias VP1 genų sekas ir specifinius pradmenis (2.3 lentelė). Gauti DNR fragmentai buvo klonuoti į bakterinį vektorių pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific Baltics), o jų sekos patikrintos sekoskaitos metodu. Gauti mutantiniai APyV VP1 geno variantai: N324V, N306R, N288N, N272G, N218G, C156Q, C156A-306R, C218-306R, C218A-306R-NLS, APyV-VP1del bei mutantiniai HaPyV VP1 geno variantai: Ha-Nm1, Ha-Nm2 ir Ha-Nm3 (3.3 lentelė) buvo klonuoti į raiškos vektorių pFX7 ir po transformacijos į *S. cerevisiae* AH22-214 kamieno ląstelės bei po mutantinių VP1 baltymų sintezės indukcijos buvo tiriama ar jų sintezė indukuoja mielių flokuliaciją. APyV ir HaPyV VP1, bei visų mutantinių baltymų sintezė mielių ląstelėse buvo patvirtinta išfrakcionavus atitinkamus mielių lizatus NDS-PAGE ir ištyrus imunoblotingo metodu su MAk 6D11 ir PAk anti-VP1 antikūnais (3.12 B, C ir 3.13 pav).



3.13 pav. Žiurkėno ir paukščių PyV VP1 su pakeistomis N-galo baltymo sekomis sintezės mielių ląstelių lizatuose analizė NDS-PAGE ir imunoblotinge naudojant 6D11 MAk ir anti-VP1 PAk. Takeliuose AH22-214 mielių ląstelių lizatai su indukuota atitikamų VP1 baltymų sinteze: Ha-Nm1 (1-2), Ha-Nm2 (3-4), Ha-Nm3 (5-6), HaVP1 (7) ir APyV-VP1del (8-9). Analizuota po du mielių klonus. M, dažytas baltymų molekulinės masės žymeklis (Thermo Fisher Scientific Baltics).

Tyrimo rezultatai parodė, kad sutrumpinus VP1 baltymo galą iki 288N vietos jo sintezė vis dar sukėlė flokuliaciją. Ši iškrita visiškai pašalina išlindusį C galą, bet nepaliečia ar sudarančių globulinę VP1 baltymo struktūrą (3.14

pav. pašalinta C galo dalis pažymėta mėlyna). VP1 baltymų, kurie buvo sutrumpinti toliau negu 288N iš C galo (N272G, N218G), ar iš N galo (C156Q, C156A-306R, C218-306R, C218A-306R-NLS), sintezė flokuliacijos nebesukėlė. Šios iškritos suardo VP1 baltymo susivyniojimą ir pentamerų susiformavimą, tuo tarpu C galo pašalinimas niekaip nepaveikia pentamerų susidarymo, o panašus HaPyV VP1 C galo pašalinimas netrukdo net ir VPD susiformavimui (Gedvilaite ir kt, 2006).



3.14 pav. APyV VP1 baltymo tretinės struktūros schema. Raudona spalva pažymėtos vietos iki kurių patrumpinti mutantiniai APyV VP1 baltymai. Violetine spalva pažymėta NLS seka, mėlyna – baltymo C galas.

Šis tyrimas patvirtino, kad flokuliacijai sukelti yra svarbu, kad VP1 baltymas būtų teisingai susivyniojęs ir formuotų bent jau pentamerus. Dar vienas įrodymas, kad VP1 baltymo struktūra svarbi flokuliacijos indukcijai mielėse galėtų būti ir eksperimentai, kai APyV VP1 N galas buvo sulietas su transkripcijos aktyvatoriaus aktyvaciniu ar prisijungimo prie DNR domenuis mielių dviejų hibridų sistemoje (duomenys neparodyti). Dėl prie VP1 prijungtų kito baltymo domenų tokių sulietų VP1 baltymų sintezė nesukėlė mielių

flokuliacijos. Viena priežastis galėtų būti sutrikdytas pentamerų susiformavimas, tačiau šiuo atveju flokuliacijos nebuvimo priežastis galėjo būti ir kita. Abu suliejimui naudojami domenai turėjo branduolio lokalizacijos signalines sekas NLS, o jau anksčiau buvo pastebėta, kad APyV VP1 sintezei ir VPD formavimuisi viščiuko ląstelių kultūrose (Johnė ir Muller, 2004) ir Sf9 ląstelėse (Zielonka ir kt., 2006) buvo svarbi SV40 VP1 NLS seka, pridėta VP1 N gale. Tokia APyV VP1 baltymo modifikacija pagerino VP1 VPD išėigas ir mielių ląstelėse (Zielonka ir kt., 2012). Pirmoji klasikinė NLS: PKKKRKKV buvo nustatyta SV40 LT antigene (Kalderon ir kt., 1984). Vėliau tyrinėjant kitų į branduolį transportuojamų baltymų sekas išryškėjo šios klasikinės sekos konsensusas: KR(K/R)R arba K(K/R)RK bei buvo parodyta šios sekos svarba prisijungimui prie alfa importino baltymo (Kosugi ir kt., 2009). Daugumai PyV VP1 baltymų būdinga konservatyvi ir minėtam konsensusui artima NLS seka N-gale: MAP(x)KRK arba MAPKRK (3.15 pav). APyV VP1 N galo sekoje šios NLS nėra, o vietoje jos yra netipinė PyV MSQKGK seka, kuri, gali būti netinkama transporto į branduolį aparatui mielių ląstelėse. Pašalinus šią seką APyV VP1del (3.3 lentelė) baltymo sintezės lygis praktiškai nesiskiria nuo natyvaus VP1 ir sukelia mielių flokuliaciją. Tuo tarpu APyV VP1 baltymo su SV40 NLS seka sintezė mielėse, nežiūrint į padidėjusį APyV VP1 sintezės lygį mielių flokuliacijos nebesukelia. Tai rodo, kad natyvus APyV VP1 NLS signalas yra labai neefektyvus ir jo buvimas (APyV VP1), ar nebuvimas (APyV VP1del atveju) nepakeitė VP1 baltymo lokalizacijos, o esant netinkamam APyV VP1 transportui į branduolį kinta Cyc8 baltymo kiekis, todėl sukeliama flokuliacija. Tuo tarpu stiprus NLS signalas sumažina flokuliacijos indukciją, nes VP1 baltymas yra nukreipiamas į branduolį ir galimai nebetrukdo Cyc8 baltymui patekti į branduolį.

Mutantinių HaPyV VP1 baltymų su pakeistais N-galais (3.3 lentelė) sintezė nesukėlė flokuliacijos mielių ląstelėse, nors šie baltymai turėjo dalinį arba pilną neefektyvų APyV VP1 (Ha-Nm1 ir Ha-Nm3), ar neturėjo jokio NLS (Ha-Nm2). Visi šie rezultatai atskleidė, kad APyV VP1 baltymo sintezės sukeliama flokuliacijai yra svarbios trys savybės: VP1 baltymo seka, erdvinė

struktūra bei VP1 baltymo lokalizacija, nes, nors HaPyV VP1 mutantiniai baltymai nebuvo transportuojami į branduolį, jie flokuliacijos nesukėlė ir Cyc8 baltymo lygii jokios įtakos nedarė. Kadangi, Cyc8 veikia branduolyje, gali būti, VP1 jungdamasis su Cyc8 baltymu užlaiko jį citoplazmoje ir taip trukdo jo sąveikai su Tup1 branduolyje.

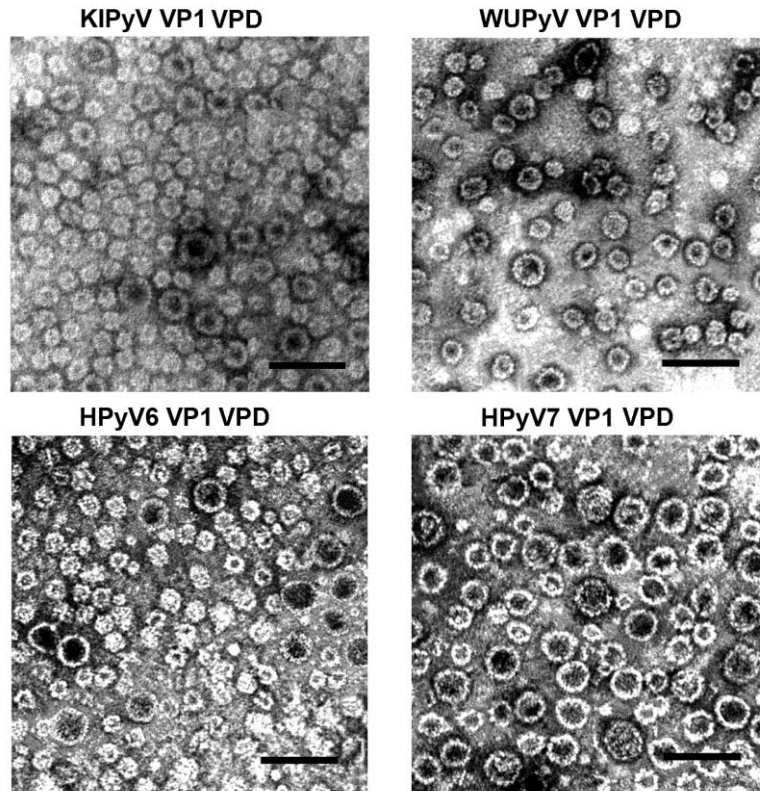
BKPyV	NC_001538	-----MAPTKRK-----	-----GECPGAAPKKPKPEP-----	-----VQVPKLLIKGG	32
JCPyV	NC_001699	-----MKMAPTKRK-----	-----GER-----	-----KDP-----	24
MCPyV	FJ173815	-----MAP-KRK-----	-----ASSTCKTPKRQCIPKPGCCP-----	-----NVASVPKLLVKG	39
KIPyV	NC_009238	-----MSCTPCRPOKR-----	-----LTRPR-SQVPRVQTLATEVVKGG	33	
WUPyV	NC_009539	-----MACTA-K-----	-----PACTAKPGRSPR-SQPTRVQSLPKQVRKGG	35	
HPyV6	NC_014406	-----M-PCHRK-----	-----GNGP-----	-----IQKLPRVIKGG	22
HPyV7	NC_014407	-----M-PCQRK-----	-----GNGP-----	-----TQKLSRVIKGG	22
TSPyV	NC_014361	-----MAP-KRK-----	-----GEG-----	-----CARKCP-TKTCPTPKVPKLLIMKGN	33
HPyV9	HQ696595	-----MAPQ-RKR-----	-----QECGACPVKTCPTPAPVPKLLVKG	33	
HPyV10	JX262162	-----M-PPKTKVCTKTCTRAEAPNKKVCEKPTCSRSCRMSCNKCP-CIPCPVPTKVPRIIVSKGG	60		
STLPyV	JX463183	-----MAP-KRKSRCSTQTCPMDTCNPRRRRCEYDP-----	-----CQKSVCPKPLPPPTCVPRIIARGG	56	
HPyV12	JX308829	MGLLLKKGVKCNFLQVMAP-KRK-----	-----TTCSSKKTCP-----	-----QPSSVPKLLIKGG	40
SV40	AF316139	-----MKMAPTKRK-----	-----GSCPGAAPKKPKPEP-----	-----VQVPKLLIKGG	34
HaPyV	JX036360	-----MRKSMAP-KRK-----	-----SGASSRCANPCGKPCP-----	-----KPANVPKLLIKGG	35
MPyV	PSU27813	-----MAP-KRK-----	-----SGVSKCETKCTKACP-----	-----RPAPVPKLLIKGG	34
BatPyV	ACT116488	-----MAPKKR-----	-----SSAP-----	-----SEVPKLLISGG	21
LPyV	K02562	-----MAPQ-RKR-----	-----QDGACKKTCP-----	-----IPAPVPKLLIKGG	30
APyV	M20775	-----MSQ-KGK-----	-----GSCP-----	-----RPQVPRLLVKG	23
GHPyV	AF226991	-----MAPVKRPR-----	-----NGP-----	-----VVPKLLIKGG	23
FPyV	AGM34012	-----MAP-KKG-----	-----NGSCP-----	-----RPQVPRLLVKG	24
CPyV	ABB04266	-----MGP-KRPR-----	-----AAGP-----	-----SPVPKLLIKGG	22
BVPyV	ALJ83727	-----MRRSRAPSKMR-----	-----TTP-----	-----NIRLPRTIKGG	26

3.15 pav. Kai kurių poliomos virusų VP1 baltymų N-galo sekų palyginimo schema. N-galo sutampančios NLS ar. sekos pažymėtos raudonai. Mėlyna spalva paryškintos ar. sekos, transliuojamos nuo pirmo iniciacijos kodono.

Trys žmonių PyV VP1 baltymai, kurių sintezė indukavo flokuliaciją nors ir turi tipiškas VP1 NLS, tačiau jų nestruktūrizuoti N galai yra daug ilgesni negu kitų VP1 baltymų (3.15 pav) ir galimai sąveikauja su kažkokiais kitais citozolio baltymais, o tai gali trukdyti N galo sąveikai su alfa importino baltymu ir VP1 baltymo transportui į branduolį (Kosugi ir kt, 2009) bei prisidėti prie Cyc8 baltymo lygio sumažinimo.

Įdomu, kad palyginus PyV VP1 baltymų N-galo aminorūgščių sekas, tipiškų NLS sekų kurios 3.15 paveiksle pažymėtos raudona spalva, neturi ir daugiau skirtingos kilmės PyV VP1 baltymų. Pirmiausia tai paukščių PyV grupė (APyV, GHPyV, FPyV ir CPyV VP1 baltymai), nes nei vienas iš šių VP1 baltymų neturi tipiškos NLS sekos ir visų jų sintezė sukėlė flokuliaciją. Stiprią flokuliaciją sukėlė ir pelėnų BVPyV VP1 baltymo, kurio N gale nėra tipiškos NLS, sintezė mielėse. Antra vertus, tipiškų NLS neturi nei WUPyV ar

KIPyV, nei HPyV6 ar HPyV7 VP1 baltymai, o jų sintezė flokuliacijos mielėse nesukėlė, kaip ir HaPyV VP1 baltymo sintezė pašalinus NLS. Vis dėlto visų šių keturių žmonių PyV VP1 baltymai formavo daugiausia mažesnes 25–35 nm VPD (3.16 pav) nors būdingas PyV VPD dydis yra apie 45-50 nm.



3.16 pav. Žmogaus KIPyV, WUPyV, HPyV6 ir HPyV7 VP1 baltymų formuojamų VPD EM nuotrauka. Skalė – 100 nm.

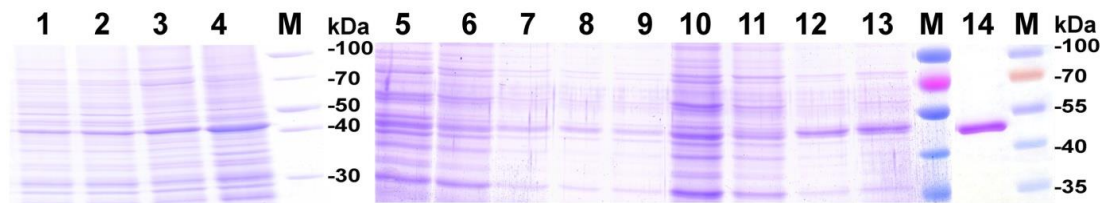
3.1.3. N galo NLS poveikis WU VP1 VPD dydžiui ir išėigai

NLS seka buvo įvesta į WUPyV VP1 geną PGR reakcijos metu naudojant pFX7-WUPyV-VP1 plazmidę ir specifinius pradmenis (žr. 2.3 lentelė). 3.4 lentelėje parodyta, kaip pasikeitė WUPyV VP1-KRK baltymo N-galo aminorūgščių seka, lyginant su natyvaus WUPyV-VP1 geno koduojama ar seka.

3.4 lentelė. WUPyV VP1 ir VP1-KRK baltymų N-galų aminorūgščių sekos. Raudonai pažymėtos pakeistos aminorūgštys.

WUPyV VP1	MACT- AK PACTAK
WUPyV VP1-KRK	MA PT KRK K PACTAK

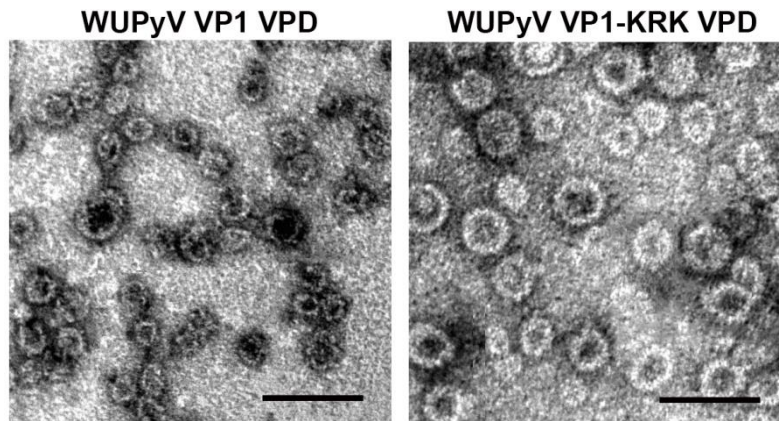
Po WUPyV VP1 ir VP1-KRK baltymų sintezės indukcijos mielėse nusodintos šlapios biomasės kiekiai buvo sulyginami sveriant ir mechaniškai suardžius atšaldytas ląsteles purtant su stiklo rutuliukais iš lizatų buvo išsodinti VP1 baltymai, susirinkę į VPD ar pentamerus, sukant 4 val. 37000 aps./min. greičiu 4 °C temperatūroje ultracentrifugoje per 30 % sacharozės pagalvę (žr. 2.2.8). Nuosėdų suspenduotų buferiniame DB150 tirpale baltymų mėginiai buvo analizuojami NDS-PAGE (3.17 pav).



3.17 pav. WUPyV VP1 baltymų sintezės BY4741, AH22-214 mielių kamienuose analizė NDS-PAGE. Takeliuose: WUPyV VP1 (1, 3), WUPyV VP1-KRK (2, 4) baltymų analizė BY4741 (1, 2) ir AH22-214 (3, 4) mielių ląstelių lizatų nuosėdų po ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės pagalvę mėginiuose; WUPyV VP1 (5-9), WUPyV VP1-KRK (10-13) baltymai AH22-214 kamieno lizatų (5, 10), tirpių supernatantų (6, 11) ir frakcijų po centrifugavimo per CsCl gradientą (7-9 ir 12-13) mėginiuose; išgrynintas WUPyV VP1-KRK baltymas (14). M, nedažytas arba dažytas baltymų molekulinės masės žymeklis (Thermo Fisher Scientific Baltics).

Palyginus analizuojamų baltymų sintezės efektyvumą *S. cerevisiae* AH22-214 ir BY4741 kamienų baltyminiuose mėginiuose po ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės pagalvę, AH22-214 kamieno ląstelėse buvo susintetinta tiek WUPyV VP1, tiek ir VP1-KRK baltymų (3.17 pav 3 ir 4 takeliai), todėl VPD buvo toliau gryninamos naudojant šį kamieną. WUPyV VP1 ir VP1-KRK baltymų frakcijos, gautos po ultracentrifugavimo per sacharozės pagalvę, buvo toliau gryninamos centrifuguojant per CsCl gradientą. Baltymų mėginiai iš įvairių gryninimo stadijų buvo išanalizuoti NDS-PAGE. Ši analizė parodė, kad nors mielių ląstelių lizatuose ir jų supernatantuose WUPyV VP1 ir VP1-KRK baltymų kiekiai panašūs (3.17 pav 5, 6, 10 ir 11 takeliai), tačiau po centrifugavimo CsCl gradientu WUPyV VP1-KRK baltymo kiekis padidėjo du kartus (3.17 pav, 12 ir 13 takeliai). Išgrynintus WUPyV VP1 ir VP1-KRK baltymus ištyrus mikroskopu

„Morgagni“ paaiškėjo, kad mėginyje padaugėjo ir PyV būdingo 45-50nm dydžio VPD (3.18 pav).



3.18 pav. Žmogaus WUPyV VP1 ir VP1-KRK baltymų VPD EM nuotrauka. Skalė – 100 nm.

Išgrynintų WUPyV VP1 ir VP1-KRK VPD mėginiai praskiedus iki 0,002 mg/mL buvo ištirti ir NanoSight LM10-HS aparatu, o gauti duomenys išanalizuoti naudojant NTA 3.1 Build 3.1.54 programinę įrangą (žr. 2.2.12). Buvo apskaičiuoti 41,5-50,5 nm (didelių) ir 31,5-40,5 nm (mažų) dydžio VPD koncentracijų vidurkių santykiai abiejuose mėginiuose. WUPyV VP1-KRK mėginyje didelių 41,5-50,5 nm ir mažų 31,5-40,5 nm VPD kiekio santykis buvo $3,6 \times 10^6 : 0,02 \times 10^6$, o WUPyV VP1 didelių/mažų VPD dalelių santykis buvo $9,5 \times 10^6 : 1,5 \times 10^6$. Remiantis šia analize, galima teigti, kad pakeitus N galo NLS seką ne tik dvigubai padidėjo išgrynintų WUPyV VP1-KRK VPD išeigos lyginant su natyvaus VP1 VPD, bet ir pagerėjo būdingo PyV dydžio VPD formavimosi efektyvumas, kuris išaugo apie 28 kartus.

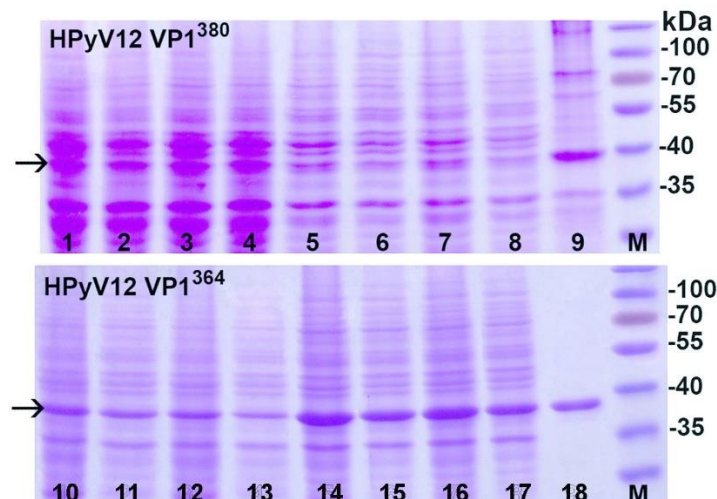
3.1.4. HPy12 VP1 transliacijos iniciacijos kodono nustatymas

Pabandžius mielėse susintetinti HPy12 VP1 baltymą buvo susidurta su problemomis, nors raiškai buvo panaudotos dvi HPy12 VP1 geno versijos: geno seka, kuri užkoduota natyviai virusui būdingais sinoniminiais kodonais (HPy12 VP1³⁸⁰; Genų Banko Nr.: KP293750), ir geno seka, kurios sinoniminiai kodonai optimizuoti raiškai mielių *S.cerevisiae* ląstelėse (HPy12 VP1s³⁸⁰; Genų Banko Nr.: KP293751). HPy12 VP1³⁸⁰ baltymo sintezės lygis

buvo žemas, nepriklausomai nuo jo raiškai naudoto geno varianto (3.19 pav A), labai maža išgryninto baltymo išeiga (0,05 mg iš 1 gramo šlapios mielių ląstelių biomasės), o HPy12 VP1³⁸⁰ baltymo grynumas žemas, nes po sacharozės ir CsCl gradientų surinktose frakcijose buvo daug mielių baltymų priemaišų, kurios išliko ir po papildomo centrifugavimo CsCl gradiente. Mėginių tyrimas EM patvirtino, kad didžioji dalis HPy12 VP1³⁸⁰ baltymo formavo netipiškas PyV, mažas (apie 20 nm skersmens) į daleles panašias struktūras ar agregatus (3.20 pav). Raiškai naudotas HaPyV12 VP1 genas, koduojantis 380 ar. ilgio baltymą, buvo susintetintas pagal genų banke nurodytą informaciją (Genų Banko Nr.: JX308829). Analizuojant poliomos virusų VP1 baltymų N galo sekas (3.15 pav), buvo pastebėta, kad HPyV12 VP1 baltymo N galo seka labai išsikiša iš palyginio, jei yra transliuojama nuo pirmo AUG kodono (VP1³⁸⁰), bet yra labai tipiška poliomos virusams, jei prasideda nuo antro AUG kodono (VP1³⁶⁴). Kadangi aukščiau aprašyti tyrimai parodė, kad VP1 baltymų N galas labai svarbus tiek VP1 sintezės lygiui, tiek ir VPD formavimosi efektyvumui, PGR pagalba (specifinių pradmenų sekos pateiktos 2.3 lentelėje) buvo sukonstruoti abu 364 ar. ilgio VP1 baltymą koduojantys HPyV12 VP1 geno variantai: su natyviai virusui būdingais sinoniminiais kodonais (HPy12 VP1ⁿ³⁶⁴) ir su kodonais optimizuotais raiškai mielių *S.cerevisiae* ląstelėse (HPy12 VP1^{s364}). Buvo nuspręsta išbandyti mielių ląstelėms būdingus sinoniminius kodonus, nes labai artimo (ir seniau priklausiusio tai pačiai virusų šeimai su PyV) HPV16 L1 baltymo sintezei panaudojus L1 genus su skirtingų penkių organizmų sinoniminiais kodonais, L1 geno sekoje pasirenkant būtent mielių ląstelėms būdingus sinoniminius kodonus, minėto baltymo sintezė buvo efektyviausia (Norkiene ir Gedvilaite, 2012).

Pabandžius N-gale 16 ar. trumpesnę HPy12 VP1³⁶⁴ baltymą susintetinti mielėse pavyko ženkliai pakelti jo sintezės lygį: HPy12 VP1³⁶⁴ baltymo juostelės elektroforegramose buvo lengvai aptinkamos net mielių ląstelių lizatų mėginiuose (3.19 pav B). HPyV12 VP1³⁶⁴ baltymo išeigos buvo panašios, kaip kitų PyV (3.5 lentelė), labai palengvėjo ir pats gryninimo procesas: baltymas

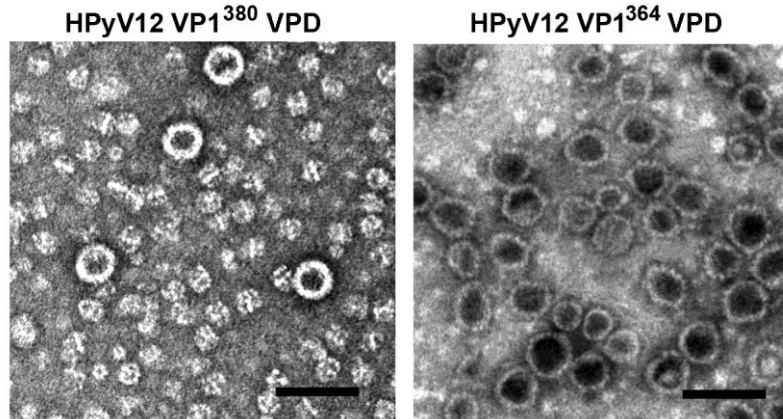
lengvai atsiskyrė nuo priemaišų, buvo tirpus (3.19 pav B 9 takelis). EM analizė patvirtino, kad HPyV12 VP1³⁶⁴ baltymas efektyviai rinkosi į taisyklingos struktūros ir dydžio VPD (3.20 pav). Visi šie rezultatai patvirtino, kad, kaip ir buvo tikėtasi, tikroji HPyV12 VP1 geno koduojamo baltymo translacijos iniciacijos vieta yra ne nuo pirmojo, o nuo antrojo iniciacijos kodono. Keli tokie atvejai jau yra žinomi ir patvirtinti HaPyV, JCPyV, ir SV40 VP1 genuose (3.15 pav mėlynai pažymėtos ar.) (Siray ir kt., 1999). Galutinai HPyV12 VP1 geno koduojamo baltymo translacijos iniciacijos vieta turėtų būti nustatyta šį virusą padauginus ląstelių kultūroje.



3.19 pav. HPyV12 VP1 baltymo sintezės ir gryninimo iš mielių ląstelių efektyvumo analizė NDS-PAGE. HPy12 VP1³⁸⁰ baltymo sintezė analizuota mielių ląstelėse transformuotose pFX7-HPy12-VP1n³⁸⁰ plazmide (1-4 takeliai) ir pFX7- HPy12-VP1s³⁸⁰ plazmide (5-8 takeliai); HPy12 VP1³⁶⁴ baltymo sintezė analizuota mielių ląstelėse transformuotose pFX7- HPy12-VP1n³⁶⁴ plazmide (10-13 takeliai) ir pFX7-HPy12-VP1s³⁶⁴ plazmide (14-17 takeliai). Takeliuose: ląstelių lizatai (1, 3, 5, 7, 10, 12, 14 ir 16), jų tirpūs supernatantai (2, 4, 6, 8, 11, 13, 15 ir 17); grynas HPy12 VP1³⁸⁰ baltymas (9) ir grynas HPy12 VP1³⁶⁴ baltymas (18). M – dažytas baltymų molekulinės masės žymeklis (Thermo Fisher Scientific Baltics).

HPyV12 VP1 geno variantų su natyviai virusui būdingais sinoniminiais kodonais (HPyV12 VP1n³⁶⁴) ir su kodonais optimizuotais raiškai mielių *S.cerevisiae* ląstelėse (HPy12 VP1s³⁶⁴) panaudojimas raiškai mielėse leido įvertinti kiek skirtingas kodonų polinkis prisideda prie VP1 baltymo sintezės efektyvumo. Kaip ir daugelio kitų rekombinantinių baltymų sintezės atvejais, naudojant HPyV12 VP1³⁶⁴ baltymo sintezei geną su mielėms

palankiais kodonais jo išėiga padidėjo 2,5 karto lyginant su šio baltymo išėiga naudojant geną su virusui būdingais kodonais (3.5 lentelė, 11 ir 12 eilutės, 3.19 pav). Panašūs rezultatai gauti analizuojant ir HPV16 L1 baltymo biosintezę mielėse (Norkiene ir Gedvilaite, 2012).

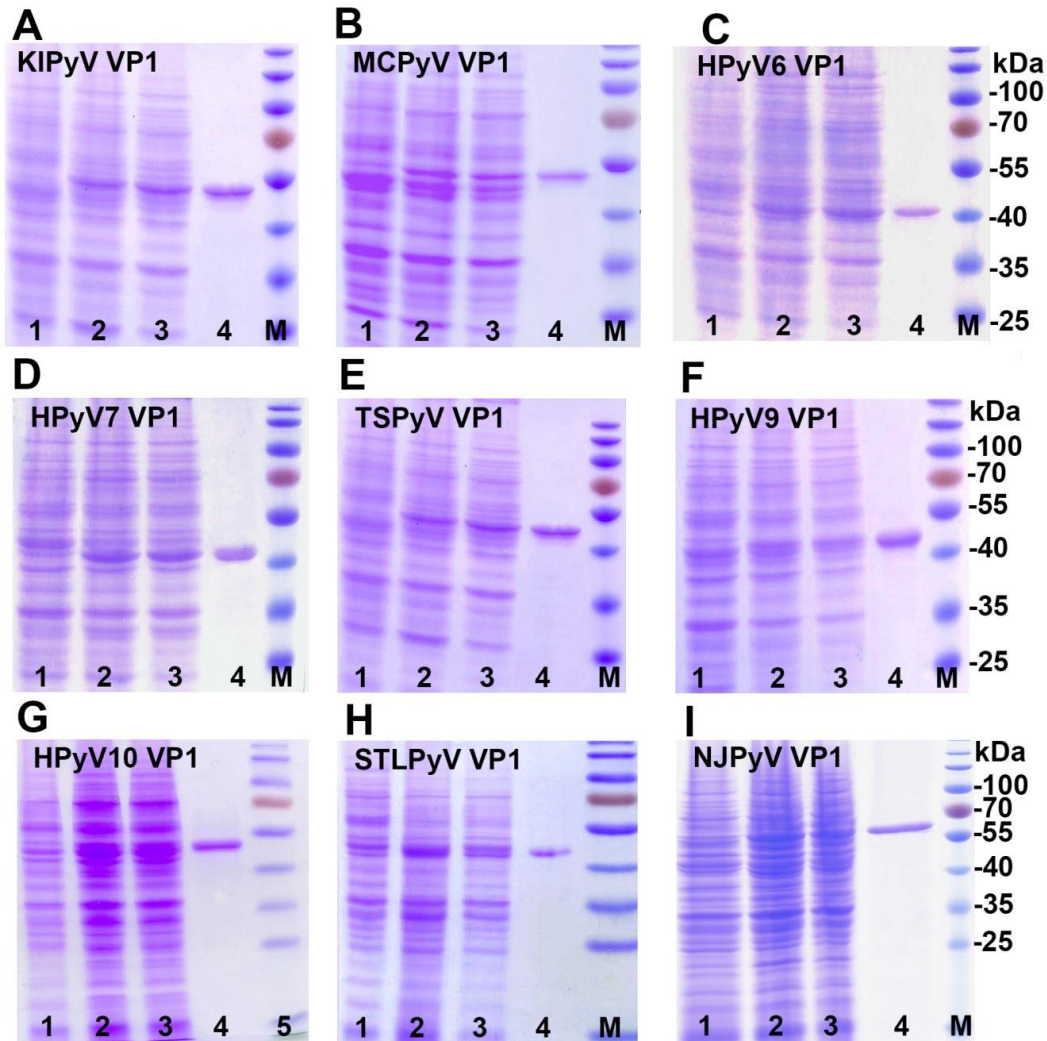


3.20 pav. Išgrynintų HPyV12 VP1 baltymų VPD stebimos EM. Fotonuotraukose: HPy12 VP1³⁸⁰ ir VP1³⁶⁴ formuojamos VPD išgrynintos iš mielių ląstelių; juostelė atitinka 100 nm.

3.2. Naujų žmogaus poliomos virusų VP1 baltymų sintezė mielėse *Saccaromyces cerevisiae* ir gryninimas

Visų naujų PyV: KIPyV, WUPyV, MCPyV, HPyV6, HPyV7, TSPyV, HPyV9, HPyV10, STLPyV, HPyV12 ir NJPyV VP1 baltymai buvo išgryninti po sintezės mielių ląstelėse. HPyV10 ir NJPyV VP1 sintezei buvo panaudotas AH22-214- $\Delta pep4$ kamienas, o likusių VP1 baltymų sintezei AH22-214 kamienas. Mielių transformantų lizatus išanalizavus NDS-PAGE, buvo aptikta visų tirtų VP1 baltymų sintezė (3.17 pav 3 ir 4 takeliai; 3.19 pav B 5 ir 7 takeliai; 3.21 pav). Nucentrifugavus minėtus mielių lizatus, visi 11 rekombinantinių baltymų išliko supernatante (3.17 pav 12 ir 13 takeliai; 3.19 pav B 6 ir 8 takeliai; 3.21 pav 1A-I, 3 takelis). Po baltymų gryninimo per sacharozės ir CsCl gradientus ultracentrifugavimo metodu VP1 baltymai išliko tirpūs ir gana gerai atsiskyrė nuo kitų mielių baltymų (3.21 pav, 1A-I, 4 takelis). KIPyV VP1 baltymas iš supernatanto tirpalo prieš ultracentrifugavimą per sacharozės gradientą buvo išsodintas naudojant 45 % amonio sulfato tirpalą ir tai labai pagerino šio baltymo grynumą. Didžiausia išėiga pasižymėjo

TSPyV, HPy9 ir HPyV12 VP1 baltymai – apie 1 mg baltymo iš 1 gramo šlapios mielių ląstelių biomasės (3.5 lentelė).



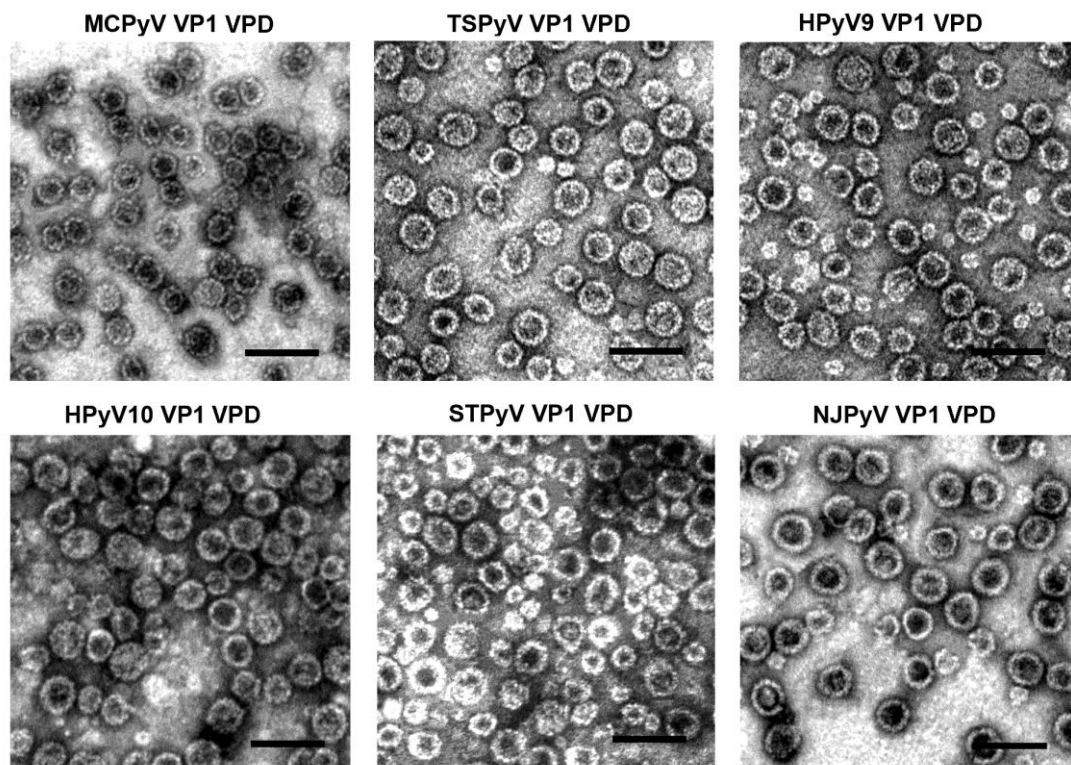
3.21 pav. Naujų žmogaus poliomos virusų VP1 baltymų sintezės ir grynumo analizė NDS-PAGE. Takeliuose: Visuose geliuose 1- grubus mielių ląstelių lizatų mėginiai su tusčia pFX7 raiškos plazmide; 2- mielių ląstelių lizatų su KIPyV VP1 (A), MCPyV VP1 (B), HPyV6 VP1 (C), HPyV7 VP1 (D), TSPyV VP1 (E), HPyV9 VP1 (F), HPyV10 VP1 (G), STLPyV VP1 (H) ar NJPyV VP1 (I) baltymų sinteze mėginiai; 3- supernatanto tirpūs KIPyV VP1 (A), MCPyV VP1 (B), HPyV6 VP1 (C), HPyV7 VP1 (D), TSPyV VP1 (E), HPyV9 VP1 (F), HPyV10 VP1 (G), STLPyV VP1 (H) ar NJPyB VP1 (I) baltymų mėginiai; 4- išgryninti KIPyV VP1 (A), WUPyV VP1 (B), MCPyV VP1 (C), HPyV6 VP1 (D), HPyV7 VP1 (E), TSPyV VP1 (F), HPyV9 VP1 (G), HPyV10 VP1 (H), STLPyV VP1 (H) ar NJPyB VP1 (I) baltymų mėginiai; M, dažytas baltymų molekulinės masės žymeklis (Thermo Fisher Scientific Baltics).

EM metodu buvo nustatyta, kad visi 11 išgrynintų PyV VP1 baltymai formuoja VPD (3.16, 3.18, 3.20, 3.22 pav). MCPyV, TSPyV, NJPyV VP1 (3.22 pav) ir HPyV12 VP1 (3.20 pav) formavo vienalytes PyV būdingo dydžio (45-50 nm) VPD. Kitų septynių VP1 baltymų formuojamų VPD dydis variavo

nuo 25 iki 55nm. Didžioji dalis HPyV7 (3.16 pav), HPyV9, HPyV10 ir STLPyV VP1 formuojamų VPD buvo 40-50 nm skersmens (3.20 pav), bet KIPyV, WUPyV ir HPyV6 VP1 mėginiuose dominavo mažesnės 25-35 nm skersmens VPD (3.16 pav). Modifikavus WUPyV VP1 baltymo N-galo seką pavyko pagerinti VPD formavimosi efektyvumą ir padidinti 40-50 nm dydžio VPD kiekį WUPyV VP1 mėginiuose (3.18 pav).

3.5 lentelė. Naujų žmogaus poliomų VP1 baltymų apibūdinimas ir gryninimo iš mielių *S.cerevisiae* ląstelių išeiga.

PyV VP1	VP1 geno seka	Molekulinė masė, kDa	VPD formavimasis	VP1 baltymo išeiga mg (iš 1 g šlapios biomasės)
KIPyV	Optimizuota	41,59	+	0,62 ± 0,05
WUPyV	Optimizuota	39,87	+	0,61 ± 0,03
MCPyV	Natyvi	46,56	+	0,81 ± 0,04
HPyV6	Optimizuota	41,84	+	0,55 ± 0,04
HPyV7	Optimizuota	40,98	+	0,58 ± 0,03
TSPyV	Optimizuota	41,52	+	1,05 ± 0,05
HPyV9	Optimizuota	40,32	+	1,01 ± 0,03
HPyV10	Natyvi	43,57	+	0,44 ± 0,04
STLPyV	Optimizuota	43,54	+	0,62 ± 0,04
HPyV12	Optimizuota	42,16	+/-	0,05 ± 0,03
HPyV12	Natyvi	40,39	+	0,42 ± 0,04
HPyV12	Optimizuota	40,39	+	1,02 ± 0,06
NJPyV	Optimizuota	53,78	+	0,45 ± 0,03

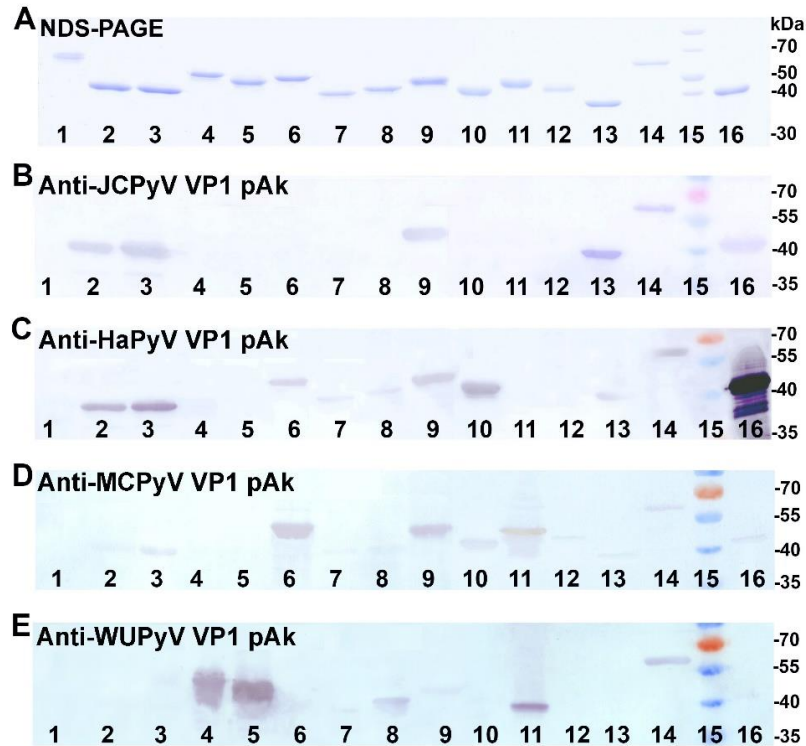


3.22 pav. Išgrynintų naujų žmogaus poliomos virusų VP1 baltymų VPD EM nuotraukos. Fotonuotraukose: MCPyV VP1, TSPyV VP1, HPyV9 VP1, HPyV10 VP1, STLPyV VP1 ir NJPyV VP1 formuojamos VPD išgrynintos iš mielių ląstelių; juostelė atitinka 100 nm.

3.3. Naujų žmogaus poliomos virusų VP1 baltymų taikymas serologiniams tyrimams

3.3.1. Naujų žmogaus poliomos virusų VP1 baltymų kryžmės reakcijos su polikloniniais antikūnais

Žmogaus poliomos virusų VP1 baltymų ar. sekų palyginimas atskleidė, kad 25-78 % sekų sutampa (Moens ir kt., 2013). Kai kurių PyV kryžminis reaktyvumas buvo pademonstruotas naudojant PAK ir atliekant imunoblotingo metodą (Sasnauskas ir kt., 2002; Moens ir kt., 2013). JCPyV ir BKPyV VP1 VPD buvo išgrynintos anksčiau, ne šio disertacinio darbo metu (EGIS kolekcija), bet panaudotos serologiniams tyrimams. Šiame darbe trylikos išgrynintų žmogaus PyV VP1 baltymų kryžminis reaktyvumas buvo ištirtas imunoblotingo metodu naudojant anti-JCPyV, anti-MCPyV, anti-WUPyV VP1 PAK, sukurtus VU BTI Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje (ILBS) ir anti-HaPyV PAK (3.23 pav).



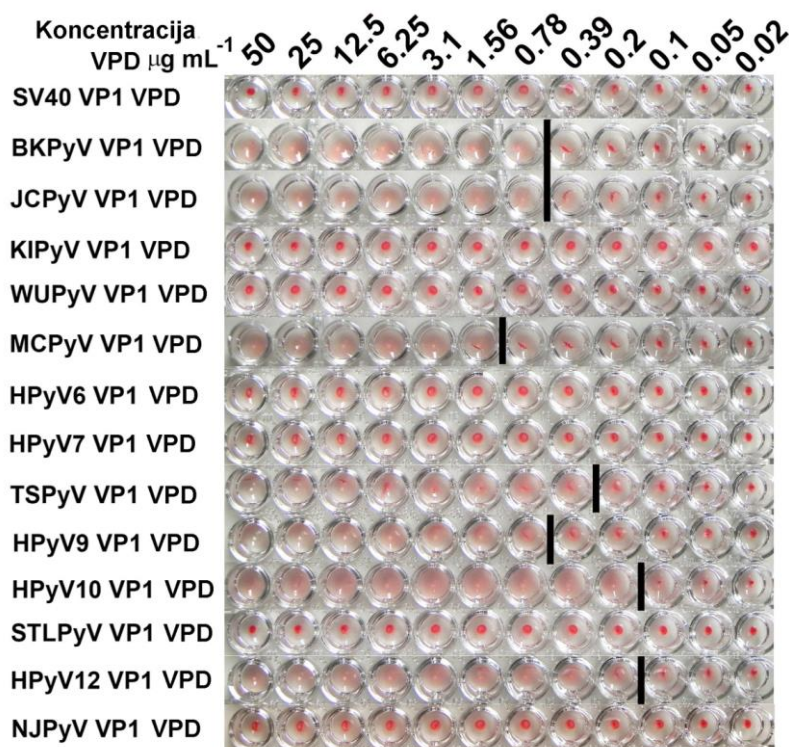
3.23 pav. Išgrynintų žmogaus poliomos virusų VP1 baltymų analizė NDS-PAGE (A) ir imunoblotinguose naudojant anti-JCPyV (B), anti-HaPyV (C), anti-MCPyV (D) ir anti-WUPyV VP1 pAk. Kiekviename gelyje ta pačia tvarka užnešti tie patys baltyminių mėginių kiekiai. Takeliuose: HPV16 L1 baltymas, neigiama kontrolė (1); BKPyV VP1 (2); JCPyV VP1 (3); KIPyV VP1 (4); WUPyV VP1 (5); MCPyV VP1 (6); HPyV6 VP1 (7); HPyV7 VP1 (8); TSPyV VP1 (9); HPyV9 VP1 (10); HPyV10 VP1 (11), STPyV VP1 (12), HPyV12 VP1 (13); NJPyV VP1 (14) baltymai; dažytas baltymų molekulinės masės žymeklis (Thermo Fisher Scientific Baltics) (15); HaPyV VP1 baltymas (16).

Anti-JCPyV polikloniniai Ak kryžmiškai reagavo su BKPyV VP1 baltymu (sekos identiškumas 78 %), TSPyV (sekos identiškumas 52 %), HPyV12 (sekos identiškumas 54 %) ir NJPyV (sekos identiškumas 48 %) VP1 baltymais (3.23 pav B, 3, 9, 13, 14 takeliai). Žmogaus PyV VP1 baltymus gana efektyviai atpažino anti-HaPyV VP1 pAk. Jie neregavo tik su KIPyV (sekos identiškumas 31 %), WUPyV (sekos identiškumas 31 %), HPyV10 (sekos identiškumas 47 %) ir STLPyV (sekos identiškumas 43 %) VP1 baltymais (3.23 pav C, 4, 5, 11, 12 takeliai). Anti-MCPyV VP1 pAk kryžmiškai reagavo su TSPyV (sekos identiškumas 57 %) ir HPyV10 (sekos identiškumas 42 %) VP1 baltymais (3.23 pav D, 9 ir 11 takeliai) bei šiek tiek su STLPyV VP1 baltymu (sekos identiškumas 43 %) (3.23 pav D 12 takelis). Įdomu, kad NJPyV ir TSPyV VP1 baltymai reagavo su visais keturiais naudotais pAk,

nepaisant žemos jų sekų homologijos lyginant su WUPyV VP1 baltymu (sekos identiškos atitinkamai 30 ir 29 %) (3.23 pav B-E 9 ir 14 takeliai). Čia reikėtų pažymėti, kad pelių imunizacijai buvo panaudotos mažos WUPyV VP1 VPD, todėl tikėtina, kad jų paviršiuje galėjo būti ir nebūdingų 50 nm diametro VPD epitopų. Anti-WUPyV VP1 PAK parodė labai stiprų signalą su KIPyV VP1 baltymu (sekos identiškumas 66 %) ir taip pat regavo su HPyV7, HPyV10 ir NJPyV VP1 baltymais, kurių sekos identiškos WUPyV VP1 baltymo sekai atitinkamai tik 41, 33 ir 30 % (3.23 pav E: 4, 8, 11 ir 14 takeliai). Taigi, dėl kryžminio reaktyvumo visų išgrynintų žmogaus PyV VP1 baltymų aptikimui imunoblotingo metodu užteko tik keturių PAK.

3.3.2. Naujų PyV VP1 panaudojimas hemagliutinacijos teste

Visos išgrynintos žmonių PyV VP1 VPD, kartu SV40 PyV VP1, kaip kontrolinėmis VPD, buvo panaudotos hemagliutinacijos teste su jūrų kiaulytės arba sveiko žmogaus 0 kraujo grupės eritrocitais. Rezultatai nesiskyrė, naudojant skirtingos kilmės eritrocitus, todėl pateikiami tik su jūrų kiaulytės eritrocitais gauti duomenys (3.24 pav). JCPyV ir BKPyV VP1 VPD buvo naudotos kaip šio tyrimo teigiama kontrolė, jų koncentracija sukėlusii hemagliutinaciją buvo $0,78 \mu\text{g mL}^{-1}$, sutapo su Knowles ir kolegų publikuotais duomenimis (Knowles ir kt., 2003). SV40 VP1 VPD nehemagliutinoja eritrocitų (Knowles ir kt., 2003), todėl šios VPD buvo naudotos kaip neigiama kontrolė. Stiprus hemagliutinuojantis aktyvumas buvo nustatytas naudojant HPyV10 ir HPyV12 VP1 VPD, šis efektas neišnyko pastarųjų VPD koncentraciją sumažinus net iki $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$. TSPyV ir HPyV9 VP1 VPD hemagliutinavo eritrocitus naudojant šių VPD koncentracijas atitinkamai $0,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ ir $0,78 \mu\text{g mL}^{-1}$. WUPyV, KIPyV, HPyV6, HPyV7, STLPyV ir NJPyV VP1 baltymų formuojamos VPD nehemagliutinavo nei jūrų kiaulytės nei žmogaus eritrocitų (3.24 pav).



3.24 pav. Žmogaus poliomos virusų VP1 formuojamų VPD hemagliutinacinis aktyvumas. Išgrynintos iš mielių ląstelių KIPyV, WUPyV, MCPyV, HPyV6, HPyV7, TSPyV, HPyV9, HPyV10, STLPyV, HPyV12 ir NJPyV VP1 VPD buvo skiedžiamos 50 - 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ir inkubuojamos su 1 % eritrocitų suspensija. Išgrynintos JCPyV ir BKPyV VP1 VPD buvo naudotos kaip šio eksperimento teigiama kontrolė, o SV40 VP1 - kaip neigiama kontrolė. VPD koncentracijos $\mu\text{g mL}^{-1}$ pažymėtos paveikslo viršuje. Juostelė žymi pereinamąją VPD koncentracijos ribą, ties kuria fiksuojamas teigiamas neutralizuojantis hemagliutinacinis efektas.

3.3.3. Naujų PyV VP1 VPD panaudojimas žmogaus kraujo serumo mėginių tyrimams netiesioginės imunofermeninės analizės metodu

Išgrynintos žmogaus poliomos virusų VP1 VPD buvo panaudotos serologiniams šių virusų paplitimo tyrimams. Imunofermeninė analizė (IFA) buvo atlikta naudojant dvi skirtingas žmonių kraujo serumų pavyzdžių imtis: Lietuvos gyventojų kraujo serumo mėginių grupę (I grupė, n=627) bei aukštos rizikos grupę (II grupė, n=479), kurios kraujo serumo mėginiai buvo surinkti Sofijos (Bulgarija) dermo-venerologiniame centre (3.6 lentelė). Kiekvieno IFA testo metu buvo naudojami keturi kontroliniai sveikų žmonių kraujo serumo mėginiai, pagal kuriuos gauti rezultatai buvo lyginami tarpusavyje.

3.6 lentelė. Imunofermentinei analizei naudotų žmogaus kraujo serumo mėginių imčių ypatybės.

	Lytis			Amžius			
	Vyras	Moteris	Nežinoma	7-20	21-50	51-86	Nežinomas
I grupė (n=627)	190	343	94	12	130	166	319
II grupė (n=479)	312	167	-	5	57	73	344

Gautai sugerties (bangos ilgis 450 nm) reikšmei buvo suskaičiuojama minimali sugerties koeficiento pereinamoji reikšmės riba – optinių tankių verčių, gautų su 30 atsitiktinai parinktais neigiamais (neturinčiais Ak prieš tiramą Ag) kraujo serumais vidurkio reikšmė plus trys apskaičiuoto SN reikšmės.

3.7 lentelė. Ak titro 100 kartų praskiestame žmogaus kraujo serume ribinės reikšmės

HPyV VP1 VPD	Vidurkis	Standartinis nuokrypis	Apskaičiuota reikšmės riba
BKPyV	0,1416	0,0459	0,2796
JCPyV	0,1731	0,0691	0,3806
KIPyV	0,1779	0,0756	0,4048
WUPyV	0,1862	0,0744	0,4097
MCPyV	0,1807	0,0633	0,3708
HPyV6	0,2803	0,1149	0,625
HPyV7	0,2531	0,0946	0,537
TSPyV	0,1815	0,07	0,3918
HPyV9	0,2049	0,0949	0,4897
HPyV10	0,2691	0,1029	0,5778
STLPyV	0,1842	0,0675	0,3867
HPyV12	0,1459	0,041	0,2691
NJPyV	0,1447	0,049	0,2906

Visi kraujo serumo pavyzdžiai, kurių sugerties koeficientas didesnis už minimalią ribinę reikšmę, buvo laikomi teigiamais (turinčiais specifinių Ak prieš tiramą žmogaus PyV VP1 baltymą), kurių mažesni – neigiamais (neturinčiais šių specifinių Ak). Apskaičiuotos minimalios ribinės Ak titro reikšmės kiekvienam naudotam antigenui, 100 kartų praskiestuose kraujo serumuose, pateiktos 3.7 lentelėje.

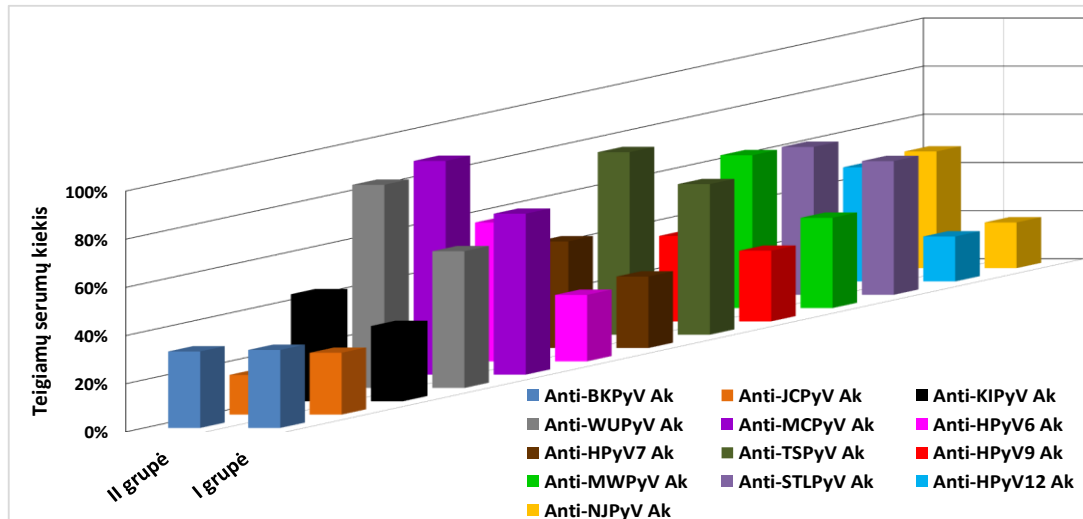
IFA rezultatai pateikti 3.8 lentelėje ir grafiškai pavaizduoti 3.25 pav. Ak buvo aptikti prieš visų 13 HPyV VP1 VPD.

3.8 lentelė. HPyV paplitimas tirtose žmonių kraujo serumų grupėse

HPyV VP1 VPD	I grupė (n=627)		II grupė (n=479)	
	Vyrai (n=190)	Moterys (n=343)	Vyrai (n=312)	Moterys (n=167)
BKPyV	32,37 %		31,73 %	
	36,31 %	35,86 %	30,44 %	33,53 %
JCPyV	25,67 %		16,49 %	
	24,21 %	31,48 %	17,94 %	13,77 %
KIPyV	31,25 %		44,46 %	
	31,05 %	37,31 %	41,66 %	49,7 %
WUPyV	56,77 %		84,34 %	
	64,73 %	58,89 %	82,37 %	88,02 %
MCPyV	66,82 %		88,72 %	
	74,73 %	67,63 %	87,5 %	91,01 %
HPyV6	27,59 %		57,62 %	
	36,31 %	28,86 %	59,61 %	53,89 %
HPyV7	29,66 %		44,25 %	
	36,84 %	30,02 %	43,91 %	44,91 %
TSPyV	62,51 %		75,78 %	
	67,89 %	66,18 %	77,88 %	71,85 %
HPyV9	29,34 %		35,49 %	
	34,21 %	32,65 %	30,44 %	44,91 %
HPyV10	37,48 %		63,46 %	
	40 %	42,27 %	57,05 %	75,44 %
STLPyV	55,5 %		61,37 %	
	54,21 %	61,51 %	55,44 %	72,45 %
HPyV12	18,66 %		47,39 %	
	25,78 %	16,61 %	46,47 %	49,1 %
NJPyV	18,97 %		48,43 %	
	18,97 %	18,95 %	48,43 %	51,28 %

Atlikti serologiniai tyrimai parodė, kad daugiau nei pusė pirmos grupės tiriamųjų buvo susidūrę su WUPyV, MCPyV, TSPyV ir STLPyV (3.8 lentelė). Šiek tiek mažiau tiriamųjų turėjo Ak prieš BKPyV, KIPyV, MWPyV, HPyV7, HPyV9. Mažiausiai tiriamųjų serumų turėjo Ak prieš JCPyV, HPyV6 ir HPyV12. Pirmoje tiriamųjų grupėje Ak prieš HPyV, išskyrus JCPyV, KIPyV, MWPyV, STLPyV, buvo nustatyti iki 9 % daugiau vyrų nei moterų serumų mėginiuose. Kitų tyrėjų serologiniuose tyrimuose taip pat nustatomas didesnis

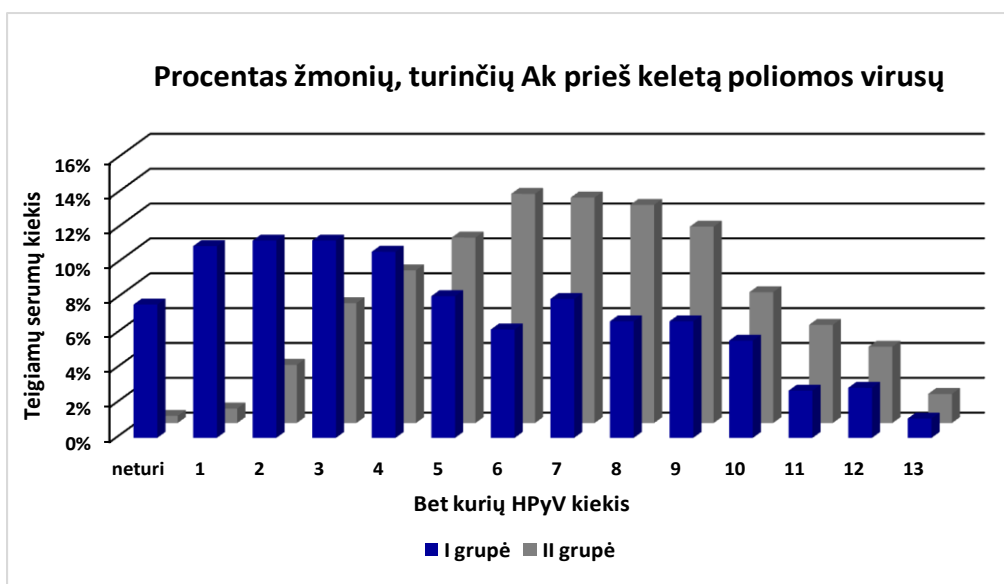
HPyV paplitimas tarp vyrų nei tarp moterų (Knowles ir kt., 2003) arba paplitimo skirtumų nenustatoma (Egli ir kt., 2009; van der Meijden ir kt., 2013).



3.25 pav. HPyV paplitimo tirtose žmonių grupėse grafikas. Žmonių, turinčių Ak prieš skirtingus HPyV, procentai buvo nustatyti, remiantis Ak titrų 100 kartų praskiestuose kraujo serumuose reikšmėmis bei ribinėmis reikšmėmis, nurodytomis 3.7 lentelėje.

Antroje tiriamųjų aukštos rizikos asmenų kraujo serumų grupėje visų HPyV, išskyrus BKPyV ir JCPyV, bendras paplitimas buvo nuo 6 % iki 30 % didesnis nei pirmoje grupėje. BKPyV paplitimas abiejose grupėse buvo beveik vienodas, o JCPyV seroteigiamų žmonių pirmoje grupėje buvo 9 % daugiau. Žinoma, kad JCPyV ir BKPyV latentinėje būsenoje gali gyvuoti labai ilgai, todėl su amžiumi sumažėja Ak prieš abu virusus reikšmės. JCPyV paplitimas abiejose grupėse nustatytas mažesnis nei BKPyV. Panašius rezultatus gavo ir kiti tyrėjai (Knowles ir kt., 2003; Carter ir kt., 2009; Egli ir kt., 2009; Kean ir kt., 2009; Antonsson ir kt., 2010).

Daugelis tiriamųjų turėjo Ak daugiau nei prieš vieną HPyV (3.26 pav), kas sutampa su kitų tyrėjų duomenimis (Gossai ir kt., 2016).



3.26 pav. HPyV koinfekcijų pasiskirstymo tirtose žmonių grupėse grafikas. Žmonių, turinčių Ak prieš keletą poliomos virusų, procentai buvo nustatyti, remiantis Ak titrų 100 kartų praskiestuose kraujo serumuose reikšmėmis bei ribinėmis reikšmėmis, nurodytomis 3.7 lentelėje.

Pirmoje grupėje daugiau kaip 10 % tiriamųjų turėjo Ak prieš bet kuriuos 1, 2, 3 ar 4 HPyV, o daugiausia serumų buvo aptikti Ak prieš bet kuriuos du HPyV. Aukštos rizikos grupėje daugiau kaip 10 % serumo mėginių turėjo Ak prieš bet kuriuos 5, 6, 7, 8 ar net 9 HPyV tipus, o daugiausia mėginių buvo teigiami pagal bet kuriuos šešis virusus. Žmonių, neturinčių Ak prieš nei vieną poliomos virusą, procentas pirmojoje grupėje buvo didesnis nei aukštos rizikos grupėje (7,97 ir 0,62 % atitinkamai).

3.3.4. Naujų PyV VP1 VPD panaudojimas žmogaus kraujo serumo mėginių tyrimams konkurencinės imunofermentinės analizės metodu

Kadangi nustatyta net 14 žmogaus PyV, o dėl didelio VP1 baltymų ar sekų panašumo (3.9 lentelė), t.y., genetiško ir antigeninio panašumo, galimos kryžminės reakcijos tarp skirtingų HPyV VP1 VPD tipų. Literatūroje galima rasti prieštaringų duomenų. Pavyzdžiui, IFA panaudojant iš bakterijų ląstelių išgrynintus BKPyV, MCPyV, TSPyV, HPyV9 GST-VP1 baltymus nebuvo nustatytas prieš šiuos baltymus reaguojančių Ak kryžminis aktyvumas, tik labai silpnas kryžminis reaktyvumas tarp anti-HPyV6 ir HPyV7 GST-VP1 Ak (van der Meijden ir kt., 2013). Schowalter su kolegomis kryžminio reaktyvumo

tarp anti-HPyV6 ir anti-HPyV7 VP1 VPD Ak neužfiksavo, nors VP1 buvo išgryninti iš žmogaus 293TT ląstelių (Schowalter ir kt., 2010), o konkurencinėje IFA panaudojant VPD išgrynintas iš vabzdžių ląstelių, buvo nustatyta Ak prieš HPyV6 ir HPyV7 VP1 kryžminis serologinis reaktyvumas (Šroller ir kt., 2016).

3.9 lentelė. HPyV sekų panašumas. Panašumo reikšmės pateiktos procentais.

	BKPyV	JCPyV	KIPyV	WUPyV	MCPyV	HPyV6	HPyV7	TSPyV	HPyV9	HPyV10	STLPyV	HPyV12	NJPyV
BKPyV	100	78	32	34	49	32	31	55	55	48	45	56	49
JCPyV		100	32	33	49	32	33	52	55	49	46	56	48
KIPyV			100	66	30	38	40	28	31	32	31	29	47
WUPyV				100	33	42	41	29	32	33	33	32	30
MCPyV					100	32	31	57	59	42	43	58	56
HPyV6						100	69	32	32	33	33	34	28
HPyV7							100	31	32	34	34	32	30
TSPyV								100	62	49	44	60	57
HPyV9									100	51	50	59	58
HPyV10										100	55	50	50
STLPyV											100	46	45
HPyV12												100	57
NJPyV													100

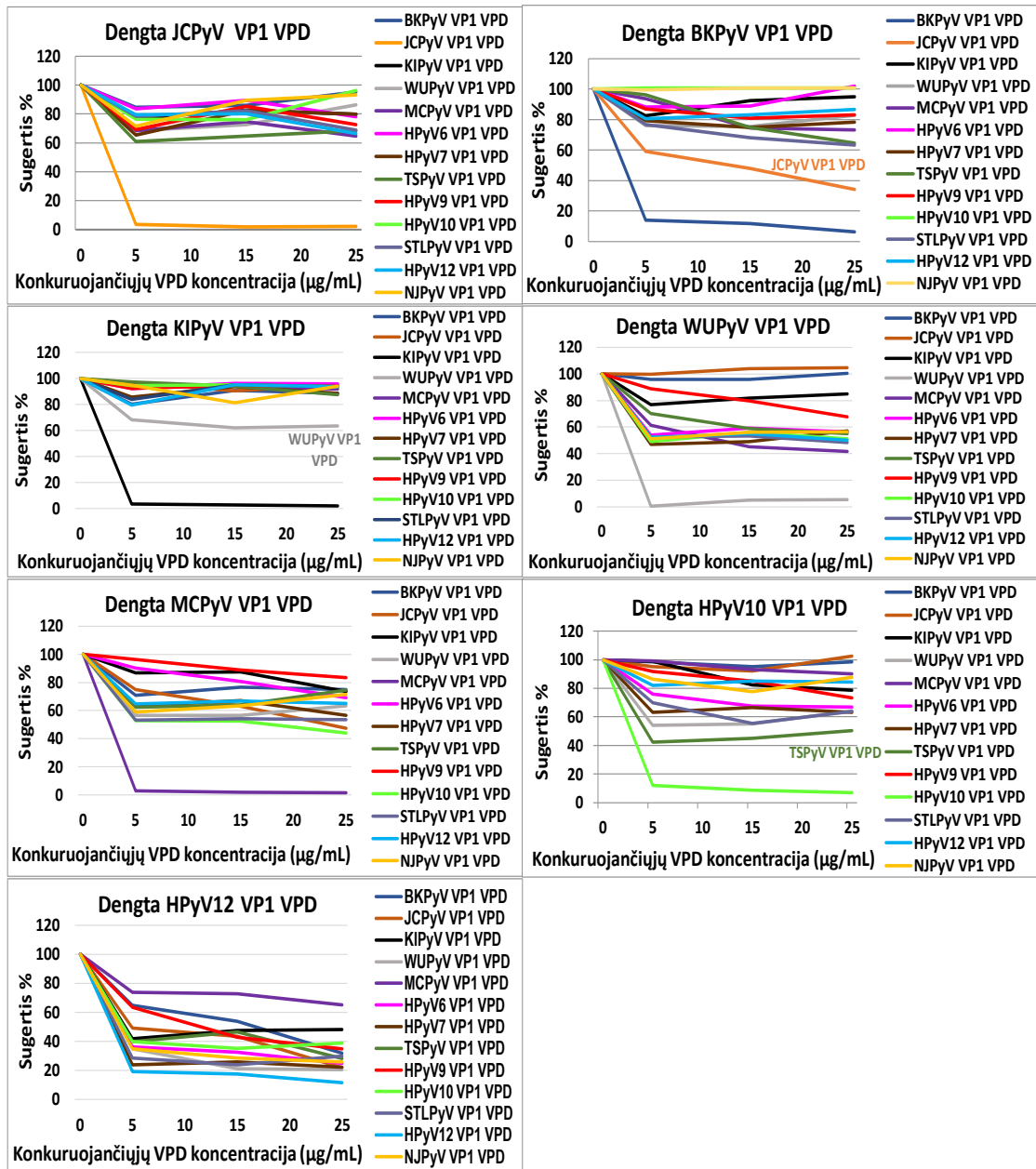
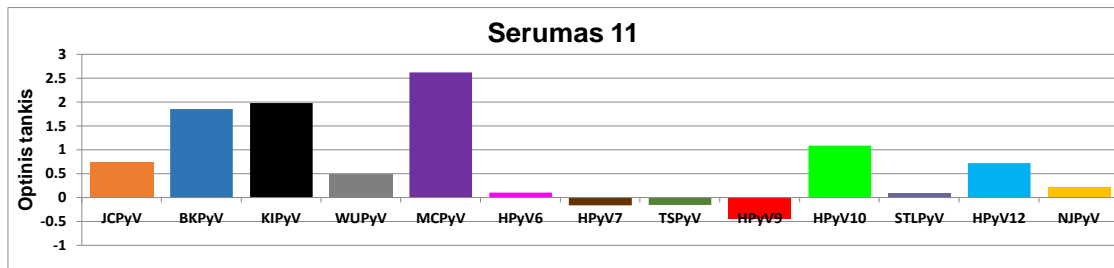
Konkurencinės IFA metodu buvo patikrinta 10 sveikų Lietuvoje gyvenančių asmenų kraujo serumo mėginių (3.27, 3.28, 3.29 pav pateikiami trijų kraujo serumų tyrimo rezultatai) su palyginti aukštais anti-HPyV Ak titrais, nustatytais netiesioginės IFA metodu. Serumo mėginys 11 turėjo specifinių anti-HPyV Ak prieš 7 skirtingus HPyV, serumas 56 turėjo specifinių anti-HPyV Ak net prieš 10 skirtingų HPyV, o serumas 11 turėjo specifinių anti-HPyV Ak prieš 6 skirtingus HPyV. Stulpeliniuose grafikuose pateikti tiramojo serumo netiesioginės IFA rezultatai, kiekvienu serumo atveju buvo patikrinti visų tipų reaktyvių anti-HPyV Ak konkuruojantis aktyvumas. Kaip konkuruojantys antigenai buvo naudojamos visos kitos HPyV VP1 VPD ir kontrolinės tos pačios VPD, kurios naudotos kaip analizuojamas antigenas IFA plokštelių padengimui. Serumų mėginių inkubavimas su konkuruojančiomis HPyV VP1 VPD leido eliminuoti kryžmiškai reaktyvius IgG Ak, todėl prie plokštelės dugne padengto antigeno jungėsi tik jam specifiniai Ak, o kryžminių

Ak buvimą atspindėjo sumažėjęs tiriamojo kraujo serumo optinis tankis. Skirtinguose kraujo serumuose IgG Ak prieš analizuojamas žmonių PyV VP1 VPD titrai buvo nevienodi, todėl netiesioginės IFA atitinkamas optinis tankis buvo prilyginamas maksimumui (100 %) ir konkurencinėje IFA sugerties pokytis (dėl konkuruojančiųjų VPD) yra nurodomas procentais. Optinio tankio reikšmės sumažėjimas 50 % ir daugiau konkurencinėje IFA, lyginant su kontrole (konkurencinis aktyvumas tų pačių VPD, kurios naudojamos kaip tiriamasis antigenas) rodo anti-HPyV IgG Ak kraujo serume kryžminį poveikį.

Šio tyrimo konkurencinės imunofermentinės analizės rezultatai patvirtino antikūnų prieš JCPyV ir BKPyV (3.27 pav), HPyV6 ir HPyV7 (3.29 pav), HPyV9 ir HPyV10 (3.28 pav) bei WUPyV ir KIPyV VP1 galimą kryžminį aktyvumą sveikų asmenų kraujo serumuose (3.27; 3.28; 3.29 pav).

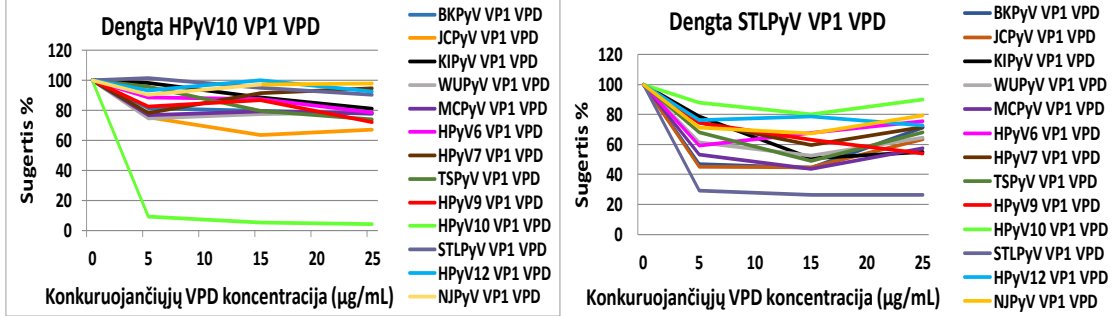
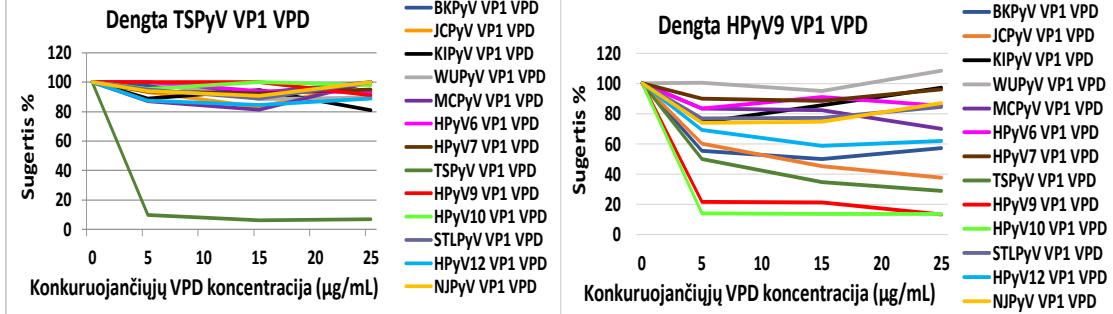
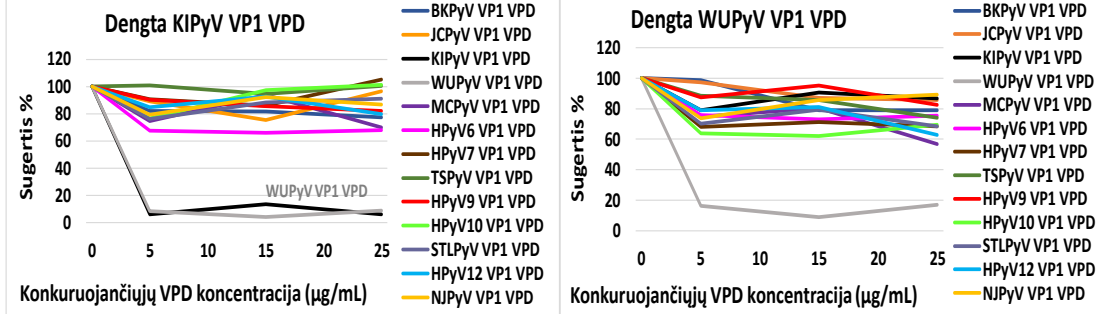
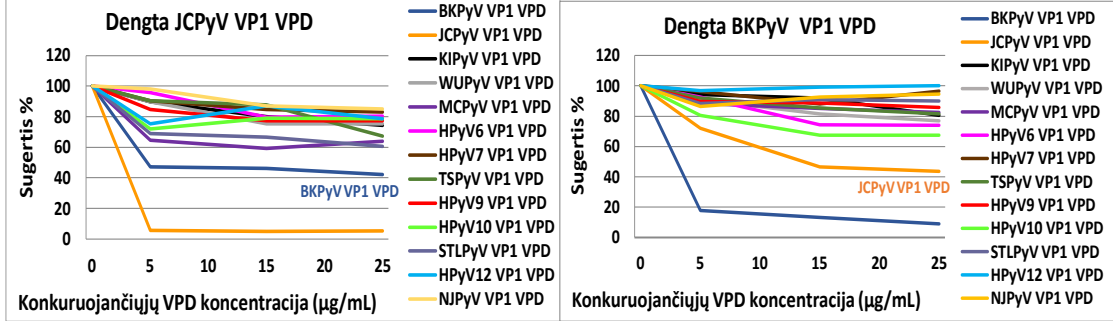
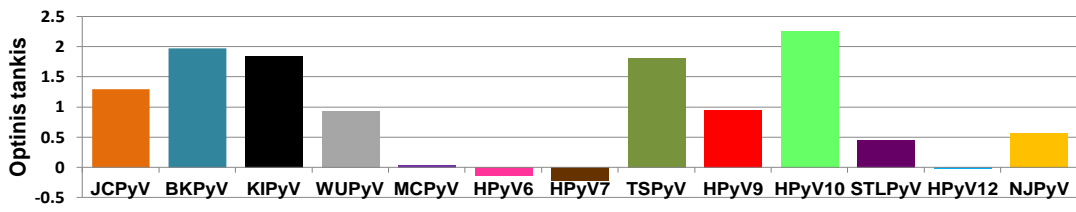
Anti-JCPyV ir anti-BKPyV Ak ne visuose serumuose pasižymėjo kryžminiu reaktyvumu, nors JCPyV ir BKPyV VP1 ar. sekos homologiškos net 78 % (3.9 lentelė). Analizuojant kraujo serumą, jame gali būti anti-HPyV Ak reaguojančių su labai įvairiais VPD epitopais, ir skirtingų organizmų kraujo serumų Ak kompozicija ir jų koncentracijos nesutampa. Todėl viename kraujo serume gali būti kryžmiškai reaguojančių anti-HPyV Ak, o kitame esantys Ak sąveikauja su konservatyvesniais VPD epitopais.

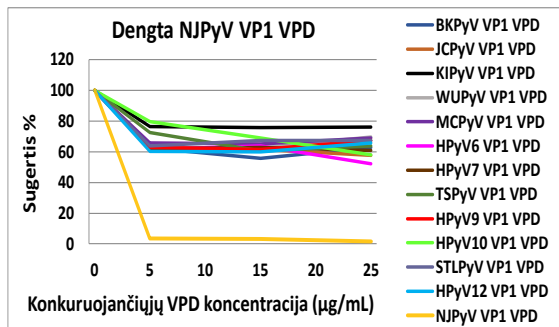
Optinio tankio (sugerties) sumažėjimas nuo 70 % iki 50 % konkurencinėje IFA, lyginant su kontrole rodo silpną anti-HPyV IgG Ak kryžminį poveikį. Silpnų kryžminių reakcijų tarp Ak prieš 13 tipų HPyV VP1 VPD analizuojamuose kraujo serumuose buvo nustatyta daug (3.27; 3.28; 3.29 pav). Dėl itin gausaus Ak prieš visų tipų HPyV serologinio paplitimo (1.2 lentelė) statistiškai padidėja ir įvairių kryžminių Ak susidarymo galimybė. Be to, šio darbo metu pastebėta, kad konkurencinėje IFA naudojant kaip antigeną VPD, kurios formuoja mažas netipines daleles, pavyzdžiui, KIPyV, WUPyV, HPyV6 VPD (3.16 pav), STLPyV, HPyV9 VPD (3.22 pav) IFA nustatomas gausesnis kryžminių anti-HPyV Ak reaktyvumas. Gali būti, kad formuojantis netipiškoms VPD yra atidengiami vidiniai konservatyvesni epitopai ir jie tampa prieinami Ak.



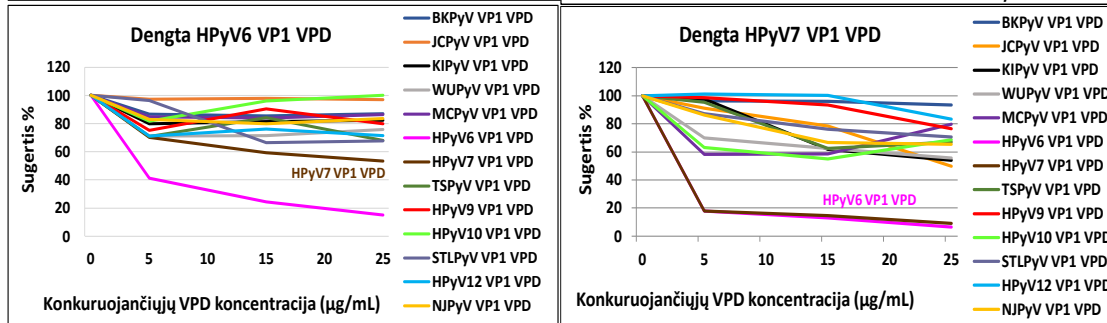
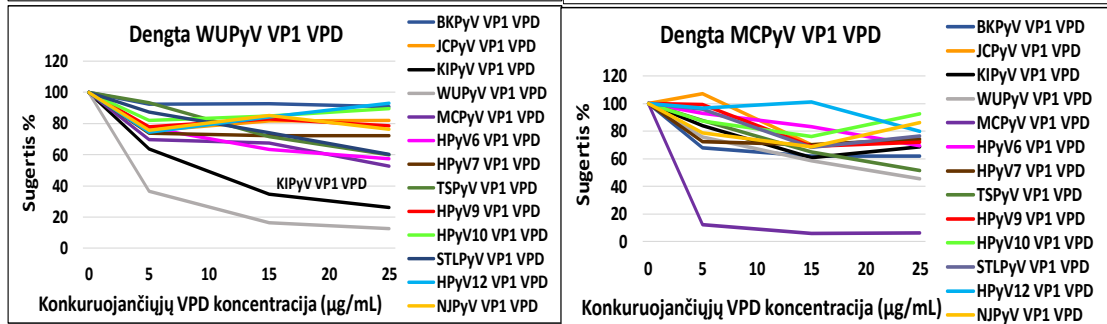
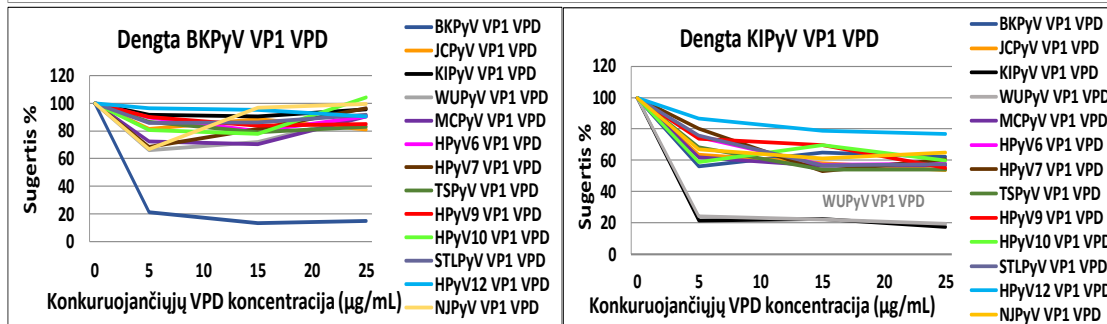
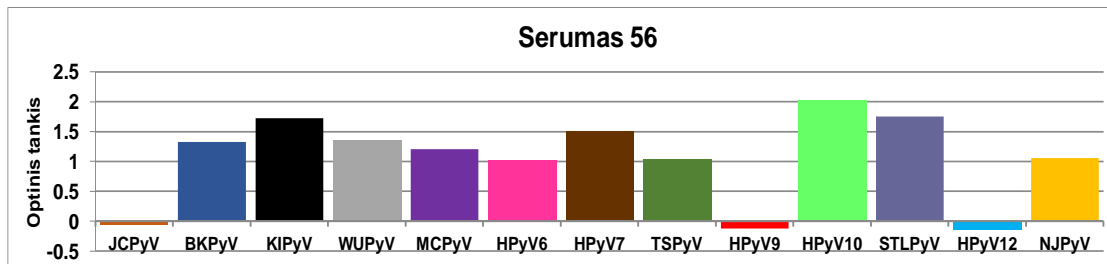
3.27 pav. Serumo 11 konkurencinės IFA duomenys. Serumo 11 esančių anti-HPyV Ak kryžminių Ak nustatymas konkuruojančiais antigenais naudojant visas kitas HPyV VP1 VPD, įskaitant ir tas pačias VPD kurias naudotas kaip analizuojamas antigenas.

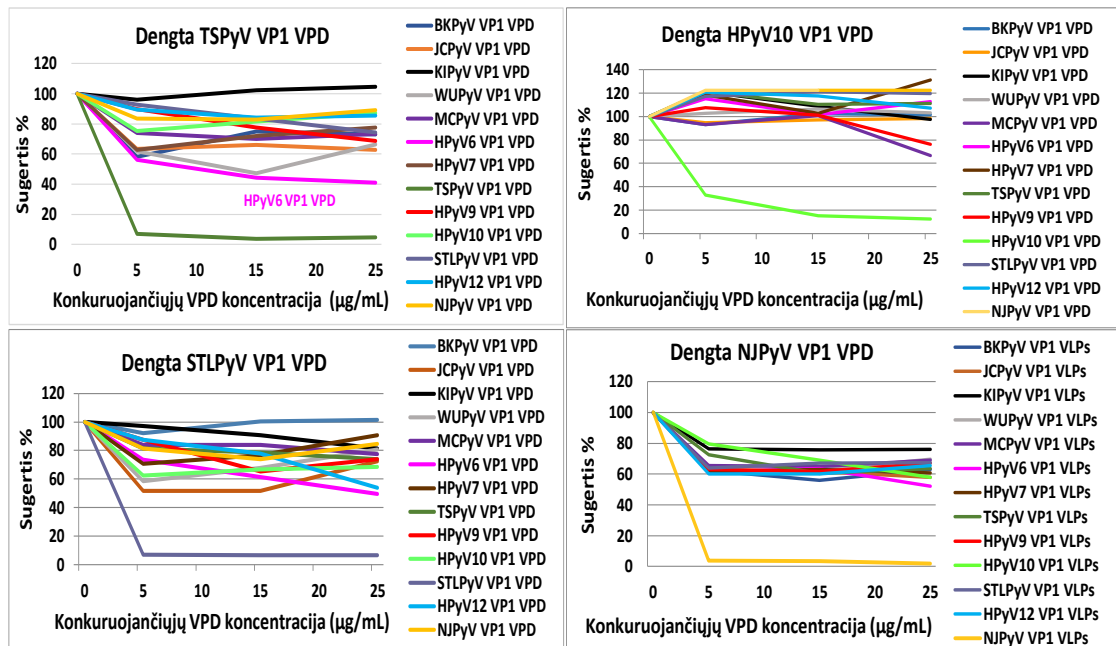
Serumas 22





3.28 pav. Serumo 22 konkurencinės IFA duomenys. Serumo 22 esančių anti-HPyV Ak kryžminių Ak nustatymas konkuruojančiais antigenais naudojant visas kitas HPyV VP1 VPD, įskaitant ir tas pačias VPD kurios naudotos kaip analizuojamas antigenas.





3.29 pav. Serumo 56 konkurencinės IFA duomenys. Serumo 56 esančių anti-HPyV Ak kryžminių Ak nustatymas konkuruojančiais antigenais naudojant visas kitas HPyV VP1 VPD, įskaitant ir tas pačias VPD kurios naudotos kaip analizuojamas antigenas.

Netiesioginėje IFA sveikų lietuvių I grupės serumų turinčių Ak prieš HPyV12 ir NJPyV VP1 VPD buvo nustatyta 18,66 % ir 18,97 % (3.8 lentelė), t.y. mažiausias kiekis iš visų tirtų HPyV VP1 tipų. Kai kuriose konkurencinėse IFA nustatytas gausus kiekis kryžminių Ak prieš visas kitas HPyV, kuomet HPyV12 (3.27 pav) ir NJPyV (3.29 pav) VPD naudotos kaip analizuojamas antigenas padengiant IFA plokšteles. Taigi, nors kai kurie kraujo serumai identifikuojami kaip turintys Ak prieš HPyV12 ir NJPyV VP1 VPD atliekant netiesioginę IFA, nustatyti Ak gali būti nespecifiniai pagal konkurencinės IFA duomenis, todėl netiesioginės IFA rezultatai gali nevisai tiksliai atspindėti PyV paplitimą.

4. Rezultatų aptarimas

Šio tyrimo metu, siekiant iš mielių *S.cerevisiae* ląstelių išgryninti vienuolika virusinių VP1 kapsidės baltymų buvo susidurta su įvairiomis baltymų sintezės problemomis, tokiomis kaip nepakankamas kai kurių genų raiškos lygis ir išgryninto baltymo išeigos (STPyV, KIPyV, HPyV10 VP1), mielių ląstelių flokuliacija (MCPyV, HPyV10 ir STLPyV VP1), netipiško dydžio VPD formavimasis (WUPyV, KIPyV, HPyV6 VP1). Norint optimizuoti *S.cerevisiae* ląstelėse PyV VP1 baltymų sintezę, buvo ištirtos kai kurios šios sintezės ypatybės mielėse: mielių šaperonų poreikis HPyV VP1 sintezei, mielių ląstelių flokuliacijos, sukeltos PyV VP1 biosintezės, priežastys, galimybės padidinti VP1 baltymo sintezės lygį ar VPD formavimosi efektyvumą sustiprinant VP1 NLS seką. Šių tyrimų svarba buvo susijusi ir su pastebėjimais, kad mielių ląstelių kultūros augimo sąlygos bei VPD gryninimo sąlygos gali lemti struktūrinių baltymų savybes ir po to susiformavusių VPD imunogeniškumą bei antigeniškumą (Mach ir kt., 2006).

Rekombinantinių PyV VP1 baltymų biosintezei dažniausiai yra naudojamos *Escherichia coli*, mielių arba bakulovirusų - vabzdžių raiškos sistemos. Parodyta, kad *E.coli* ląstelėse PyV VP1 baltymai paprastai formuoja pentamerus ir susirenka į VPD *in vitro* gryninimo metu (Erickson ir kt., 2009), nors JCPyV ir HaPyV gali formuoti VPD ir bakterijų ląstelėse (Ou ir kt., 1999; Voronkova ir kt., 2007). VP1 baltymai iš *E. coli* dažniausiai gryninami afininės chromatografijos metodu, po to pašalinant gliutinationo S-transferazės (GST) ar kitokį inkarą, todėl VPD formavimosi išeiga nėra didelė (Teunissen ir kt., 2013). HPyV12, KIPyV, WUPyV, MCPyV, TSPyV VP1 baltymai išgryninti iš bakterijų ląstelių su 6His inkaru denatūruojančiomis sąlygomis (Korup ir kt., 2013) arba su GST inkaru (Kean ir kt., 2009; van der Meijden ir kt., 2011) formuoja pentamerus, o kapsidžių susirinkimo efektyvumas net ir po gryninimo pašalinus inkarą nėra aukštas. Jeigu VP1 baltymas naudojamas tyrimams su nepašalintu inkaru, nėra žinoma, kaip jis paveikia VPD formavimąsi ir serologinį atsaką. Vykstant HPyV VP1 biosintezei

eukariotinėse ląstelėse, VPD visiškai ar iš dalies susirenka branduolyje, įprastoje PyV kapsidžių formavimosi aplinkoje (Teunissen ir kt., 2013). Be to, eukariotinių ląstelių šaperonai, ypač Hsp70 šeimos, prisideda prie VP1 potransliacinio transporto, apsaugo nuo spontaninio dalinio VPD formavimosi, vykstančio tik dėl kalcio jonų (Chromy ir kt., 2003). Žinduolių ląstelės VPD sintezei paprastai nenaudojamos dėl didelių kaštų, mažos išeigos, galimų ląstelių šeimininkų DNR ar kitų virusų priemaišų (Teunissen ir kt., 2013), bet įvairių VP1 baltymų formuojamos VPD buvo sėkmingai gautos vabzdžių ląstelėse (Nicol ir kt., 2013, 2014; Kumar ir kt., 2012). Iki šiol MCPyV VP1 VPD buvo išgrynintos iš žinduolių ir vabzdžių ląstelių (Pastrana ir kt., 2009; Tolstov ir kt., 2009; Touze ir kt., 2010), o HPyV6, HPyV7, TSPyV, HPyV9 ir HPyV10 VP1 baltymų formuojamos VPD sėkmingai gautos vabzdžių ląstelėse (Nicol ir kt., 2013, 2014; Kumar ir kt., 2012). Mielinių ląstelės yra tinkamas organizmas PyV VPD produkcijai dėl GRAS (angl. generally recognized as safe) statuso bei dėl gerai iširtos jų fiziologijos, biochemijos ir genetikos. Tai leidžia mielių raiškos sistemas greitai pritaikyti efektyviai rekombinantinių baltymų sintezei. Iš mielių ląstelių išgrynintos pelės PyV VP1 VPD yra stabilesnės, *in vitro* efektyviau pakartotinai susirenka į kapsidės struktūrą, nei pelės PyV VP1 VPD, susiformavusios iš bakterijų išskirtų pentamerų (Simon ir kt., 2014).

Šiame darbe naujai identifikuotų HPyV VP1 VPD buvo pirmą kartą susintetintos mielių ląstelėse, o rekombinantinės STLPyV, HPyV12 ir NJPyV VP1 VPD iki šiol dar nebuvo susintetintos jokioje raiškos sistemoje. Rekombinantinių VP1 baltymų raiškai buvo panaudoti genai, kurių sudėtyje parinkti tiek natyvūs virusiniai, tiek ir mielėms palankūs sinoniminiai kodonai. Vis dėlto gauti rezultatai rodo, kad nors daugeliu atvejų mielėms palankių sinoniminių kodonų naudojimas buvo efektyvesnis, pvz., HPyV12 VP1 atveju panaudojus geną su mielėms palankiais kodonais baltymo išeigos padidėjo 2,5 karto, lyginant su genu su natyviais virusiniais kodonais, tačiau rekombinantinių baltymų išeigos priklauso ne tik nuo geno sekos (3.5 lentelė). HPyV10 VP1 baltymo išeigos buvo vienos mažiausių panaudojus geną su

natyviais viruso kodonais (0.4 mg iš 1 g šlapios mielių biomasės), tačiau panaudojus optimizuotą mielėms geną nepavyko gauti jokios tikslinio baltymo raiškos (rezultatai neparodyti). Gali būti, kad šiuo atveju nuo optimizuoto geno transkribuota mRNR buvo nestabili arba formavo nepalankias transliacijai antrines struktūras. KIPyV, WUPyV, HPyV6, HPyV7 ir STLPyV VP1 baltymų susintetintų nuo optimizuotų mielėms genų išeigos buvo tik nežymiai didesnės (0,5-0.6 mg iš 1 gramo šlapios mielių biomasės) už HPyV10 VP1 baltymo išeigas. Be to, reikia pažymėti, kad VP1 baltymų išeigos priklausė ne tik nuo baltymo sintezės lygio, bet ir nuo gryninimo efektyvumo, o jį gali lemti VP1 baltymų stabilumas, atsparumas proteazėms ir tirpumas, todėl labai tirpių TSPyV, HPyV9 ir HPyV12 VP1 baltymų išeigos buvo bent dvibugai geresnės (apie 1 mg iš 1 gramo šlapios mielių biomasės), negu mažiau tirpių.

Nors yra žinoma, kad PyV VP1 baltymai gali spontaniškai formuoti VPD, tačiau rekombinantinių VP1 baltymų atveju šis spontaniškas susirinkimo procesas nėra toks efektyvus ir homogeniškas, kaip ląstelėje šeimininkėje. Kokie mechanizmai reguliuoja viruso kapsidžių susirinkimą ląstelėje šeimininkėje nėra iki galo aišku, tačiau neabejotina, kad kapsidės susirinkimas yra esminis veiksnys viruso išgyvenamumui, o teisingam bei homogeniškam PyV virusų VPD susirinkimui yra reikalinga ląstelės šeimininkės pagalba. Literatūros duomenimis, spontaniškas viruso kapsidės susirinkimą esant tinkamoms sąlygoms papildomai kontroliuoja (1) VP1 baltymo sąveika su ląstelės RNR ar DNR kapsidėms susirenkant branduolyje, (2) ląstelės šaperonai, baltymų izomerazės ir (3) sąveika su citoskeleto bei branduolio matrikso baltymais (Palkova ir kt., 2000).

Visi naujų 11 žmogaus PyV VP1 baltymai mielėse formavo VPD, tačiau KIPyV, WUPyV ir HPyV6 VP1 baltymai rinkosi dažniausiai į mažesnes VPD (3.16 pav). Mažesnės negu 45-50 nm HPyV6 VP1 VPD buvo gautos ir išgryninus iš žinduolių 293TT ląstelių (Schowalter ir kt., 2010) ir iš vabzdžių ląstelių (Nicol ir kt., 2013). Tuo tarpu HPyV9 VP1 mielėse formavo tipiškas PyV VPD (3.22 pav), nors išgryninus iš vabzdžių ląstelių buvo gautos mažos VPD (Nicol ir kt., 2013). Kitų VPD mėginiuose taip pat galima rasti ir

mažesnio dydžio VPD, nors dominuoja 45-50 nm dalelės. Priežastys, kodėl VP1 baltymai formuoja mažesnes ar įvairaus dydžio VPD nėra iki galo žinomos. Pvz., SV40 atveju gali būti, kad skirtingo dydžio VPD susiformuoja dėl galimų skirtingų sąveikų kombinacijų tarp pentamerų su skirtingomis geometrijomis (Kler ir kt., 2013). Šių sąveikų skaičių ir VPD dydžių įvairovę gali reguliuoti ir galimai mažinti įvairūs veiksniai, pavyzdžiui, nukleorūgštys ir kt. Kitas pavyzdys yra pelių PyV VP1 baltymas, kuris renkasi į 26, 32 ir 50 nm diametro VPD (Salunke ir kt., 1989). Teigiama, kad VP1 baltymo N-galas formuoja segtuką, kurio pagalba palaiko iš gretimų kapsomerų išsikišusius C galus reikiamoje vietoje (Stehle ir kt., 1996) bei sujungia N-galus iš skirtingų kapsomerų per tarpkapsomerines disulfidines jungtis (Simon ir kt., 2014). Šis kapsomerų susijungimo mechanizmas leidžia joms formuoti tiek pentamerus, tiek ir heksamerus (Salunke ir kt., 1986; Rayment ir kt., 1982), o iš jų susirenka polimorfines PyV VP1 VPD (Salunke ir kt., 1989, Nilsson ir kt., 2005). Įdomu, kad augalų ląstelėse MPyV VP1 formavo labai homogeniškas ir tipiško dydžio VPD, kai jo N gale buvo pašalinta NLS seka (Catrice ir Sainsbury, 2015). Kita vertus, kartais net vienos ar. pakeitimas VP1 baltymo sekoje gali lemti VPD dydį. Žiurkėno PyV VP1 C galo sekoje pakeitus vieną ar. iš alanino į gliciną (A336G) formavosi tik mažos 20 nm diametro VPD (Gedvilaite ir al, 2006). Šiame darbe pavyko pakeisti WUPyV VP1 formuojamų VPD dydį modifikavus VP1 N galo seką ir sustiprinus VP1 baltymo NLS signalą. Šis rezultatas visiškai priešingas augalų ląstelėse gautoms MPyV VP1 VPD. Mažai tikėtina, kad VP1 transportas į branduolį įtakojo VPD dydžio pokyčius, greičiau tai galėtų būti efektyvesnė N galo segtuko forma, palaikanti C galo, sujungiančio pentamerus dalelėje, teisingą poziciją VPD.

Šaperonų atliekamas struktūrinių baltymų sulankstymas ar/ir išlankstymas taip pat labai svarbus VPD susirinkimui ir išėigoms (Lampel ir kt., 2013). Jų poreikis sintetinant rekombinantinius VP1 baltymus be LT ar ST antigenų, kurie turi šaperonų J domeną, pritraukiantį Hsp70 šaperonus turėtų būti ypač jaučiamas. Kadangi šaperonų veikimas yra glaudžiai susijęs su

ląstelės atsaku į aplinkos ir vidinį stresą bei ląstelių augimo stadijomis (Palotai ir kt., 2008; Morano ir kt., 2012), jų sudėtis ir aktyvumas kinta mielių ląstelių fermentacijos metu, oksidacinio ir temperatūrinio šoko metu (Gonzalez-Siso ir kt., 2009; Ayer ir kt., 2014). Ląstelių baltymų-baltymų sąveikų tinklas yra kompaktiškas, centrinės tinklų grupės persidengia. Streso sąlygomis tinklų grupės išsiskiria, tampa specifiškesnės, atsiranda naujų tinklų modulių. Kompiuteriniais metodais lyginant streso atsako mielių ir žmogaus šaperonų pokyčius pastebėtas jų evoliucinis konservatyvumas (Palotai ir kt., 2008), todėl šiame darbe pasinaudojant mielių tiksline genetinė analize buvo ištirtas mielių šaperonų indėlis PyV kapsidės pagrindinio baltymo VP1 biosintezėi. Rezultatai parodė, kad daugumos iš tirtų šaperonų trūkumas neigiamai veikė tirtų rekombinantinių baltymų (VP1 ir UK114) sintezės lygį sumažindamas jį nuo 10 iki 50 %. Kadangi šaperonai dalyvauja ne tik baltymų sulankstyme, bet ir daugelyje kitų ląstelės procesų, kaip baltymų translokacija, ar makromolekulinių kompleksų susirinkimas ir išsirinkimas, šis rezultatas rodo, kad nepažeista ląstelės fiziologinė būseną yra labai svarbi efektyviai visų rekombinantinių baltymų sintezei. Šalia bendro neigiamo šaperonų trūkumo poveikio abiem baltymams buvo aptikti ir kai kurie tik virusiniams baltymams būdingi šaperonų poreikio skirtumai.

Apie citoplazmos ir ir Hsp70 šaperonų reikalingumą PyV kapsidės baltymų sintezei (Cripe ir kt., 1995; Chromy ir kt., 2003; Geiger ir kt., 2011, Goodwin ir kt., 2011) buvo žinoma ir iki šiol, ir šiame darbe gauti rezultatai patvirtino Hsp 70 šaperonų poreikį PyV VP1 baltymų sintezei. Hsp70 šaperonų SSB1, SSB2, SSE1 ir SSE2 genų iškritos per pusę sumažino VP1-EGFP produkciją (3.1 pav A). Dėl Ssa šeimos baltymų funkcinio panašumo, šių šaperonų poreikis geriau atsispindėjo dvigubuose $\Delta ssa1\Delta ssa2$ ir $\Delta ssa3\Delta ssa4$ mielių mutantuose ir atskleidė Ssa1 ir Ssa2 šaperonų svarbą VP1 VPD sintezei mielėse (3.1 pav B). Didžiausią teigiamą poveikį PyV VP1 biosintezės lygiui turėjo šaperono Ssz1 ir jo partnerio RAC komplekse košaperono Zuo1 pašalinimas. Bet kurio iš RAC komplekso partnerių pašalinimas padidino VP1 baltymo lygį 2,5-3 kartus, tuo tarpu mažo UK114-EGFP baltymo sintezės lygis

sumažėjo daugiau nei 30 % (3.1 pav A; 3.6 pav A). RAC kompleksas yra Ssz1 ir Zuo1 (Hsp40 šeimos) šaperonų heterodimeras, būdingas eukariotams ir svarbus sąveikai su citozolio Hsp70 (mielėse Ssb) šaperonais (Huang ir kt., 2005). Kartu su kitu NAC kompleksu RAC prisideda prie *de novo* sintetinamų baltymų sulankstymo, kol kas nežinomų mechanizmų pagalba reguliuoja ribosomų biogenezės procesus, yra svarbus baltymų translokacijai per membranas, t.y., kontroliuoja *de novo* baltymų sintezę. Zuo1 jungiasi su abiem ribosomos subvienetais stabilizuodamas mielių RAC kompleksą, polipeptido transliacijos greitį, transliuojamo baltymo susilankstymą (Zhang ir kt., 2014). Įdomu, kad RAC komponentų nepriteklus kelis kartus padidino virusinių baltymų sintezės lygį, nors kitų Hsp70 ir Hsp40 šaperonų (išskyrus Zuo1) šeimų ar NAC subvienetų trūkumas baltymų sintezei turėjo neigiamą poveikį. Panašų teigiamą poveikį Zuo1 ir Ssz1 šaperonų pašalinimas turėjo ir kitų PyV VP1, kai kurių tirtų *Parvoviridae* bei tymų viruso baltymų sintezės lygiui (Goda K., 2017), *Nodaviridae* šeimos viruso RNR replikacijos efektyvumui (Weeks ir kt., 2010). *Nodaviridae* žymėtos virusinės RNR kiekiai $\Delta zuo1$ ir $\Delta ssz1$ mielių kamienuose išaugo iki kelių dešimčių kartų dėl padidėjusio viruso RNR polimerazės sintezės lygio (Weeks ir kt., 2010). Mūsų rezultatai parodė, kad Ssz1 ir Zuo1 šaperonų trūkumo sukeltas virusinių baltymų kiekio padidėjimas mielėse nebuvo susijęs su pakitusiu transliacijos tikslumu BY4741 $\Delta ssz1$ ir BY4741 $\Delta zuo1$ kamienuose, nes iš jų išgrynintos HaPyV VP1 VPD išliko nepakitusios (3.8 pav). Galimai, šis poveikis susijęs su kitomis arba su dar nežinomomis RAC funkcijomis, nesusietomis su Ssb šeimos šaperonais. Neseniai K. Godos atlikti tyrimai parodė, kad virusinių baltymų kiekio padidėjimas BY4741 $\Delta ssz1$ ir BY4741 $\Delta zuo1$ mutantinių kamienų ląstelėse buvo susijęs su pokyčiais persidengiančiose Zuo1 ir kito šaperono Jjj1 funkcijose, iš kurių viena galėtų būti ribosomų brendimas (Goda K., 2017). Įdomu, kad nedideli Ssz1 ir Zuo1 šaperonų kiekiai BY4741 $\Delta ssz1$ ir BY4741 $\Delta zuo1$ kamienų ląstelėse panaikino šių kamienų augimo defektus, bet nesumažino rekombinantinių virusinių baltymų išeigos, ir padarė šiuos kamienus tinkamus biotechnologiniams tikslams (Goda K., 2017).

Visų šiame darbe analizuotų mielių Hsp40 šaperonų šeimos genų išskirtos, išskyrus *ZUO1*, sumažino rekombinantinio poliomos VP1 baltymo sintezę (3.6 pav A). Hsp40 šaperonai dar vadinami košaperonais ar J baltymais dėl savo J domeno, svarbaus jų sąveikoms su savo partneriais Hsp70 šaperonais ir kitais baltymais. Evoliucijos metu J domeną turintys baltymai įgavo gebėjimą sąveikauti su dideliu kiekiu kitų baltymų, ne tik nukreipiant Hsp70 prie substratų, stimuliuojant jų ATP-azinį aktyvumą, bet ir integruojant juos į šaperonų palaikomą homeostazės tinklą, diferenciacijos ir reguliacinius kelius (Craig ir Marszalek, 2017). Rekombinantinių PyV VP1 baltymų biosintzei Hsp40 J baltymai galėjo būti svarbūs ir dėl didžiojo T antigeno, kuris taip pat turi funkcionuojantį J domeną, trūkumo. Ypač ženkliai VP1 sintezės lygis sumažėjo mielių $\Delta ydj1$ ir $\Delta caj1$ kamienuose (3.6 pav A), o padidinta šių *YDJI* ar *CAJI* šaperonų sintezė tėviniame BY4741 kamienne akivaizdžiai pagerino VP1 produkcijos lygį (3.6 pav B; 3.7 pav 31-34 takeliai). Mielių *Ydj1* šaperonas pasižymi labai plačiu specifiskumu įvairiems substratams, prisideda prie polipeptidų migravimo per membranas proceso, yra tiesioginis citozolinių Hsp70 šaperonų *Ssa1* ir *Ssa2*, galimai ir paralogų *Ssa3* ir *Ssa4*, partneris bei sąveikauja su Hsp90 (Cyr ir kt., 1992; Cyr ir Douglas, 1994; Gong ir kt., 2009). *Ydj1* šaperono bendras poreikis VP1 sintezės lygiui yra tikėtinas ir dėl *Ydj1* svarbos susikaupusių baltymų resursų asimetriško perskirtymo ir mielių pumpuravimosi metu (Saarikangas ir kt., 2017) ir dėl dalyvavimo sulankstytų baltymų kokybės kontrolėje sąveikaujant su ubikvitino ligaze (Lee do ir kt., 2016). Tuo tarpu, *Caj1* šaperono poreikis buvo labiau specifiskas virusinių VP1 baltymų sintzei. Mielių $\Delta caj1$ kamienne VP1-EGFP fluorescencija bei VP1 sintezės lygis reikšmingai sumažėjo (3.6 pav A; 3.7 pav 15, 16 takeliai), o padidinus *CAJI* geno raišką tėviniame kamienne – padidėjo (3.6 pav B; 3.7 pav 31, 32 takeliai). *Caj1* šaperonai lokalizuoti nukleopazmoje, o jų funkcija priklauso nuo kalcio jonų (Walsh ir kt., 2004; Mukai ir kt., 1994), nors pagal kitus šaltinius *Caj1* gali dalyvauti ir transkripcijoje (Gillies ir kt., 2012). Kadangi VP1 VPD formavimuisi kalcio jonai yra labai svarbūs (Stehle ir kt., 1994), o bent dalis VP1 VPD mielėse yra transportuojamos į branduolį,

aptiktas specifinis Caj1 šaperono poreikis rekombinantinio VP1 baltymo sintezei yra labai tikėtinas.

Nustatyta, kad infekcijos metu PyV kapsidės į citoplazmą keliauja per ET membraną (Qian ir kt., 2009). SV40 ir BKPyV infekcijos metu SGTA, Hsp70 šaperonų ir J baltymų B12-B14 kompleksas dalyvauja viruso perkėlime per membraną į citoplazmą (Walczak ir kt., 2014). Nors VP1 sąveikauja su SGTA infekcijos metu, bet, ar VP1 baltymo transliacija ir/ar brendimas kaip nors susijęs su transportu per ET, nėra aišku. Šis tyrimas parodė, kad VP1-EGFP ir VP1 biosintzei šaperonų genų iškritos turėjo reikšmingą neigiamą poveikį, mielių $\Delta jem1$, $\Delta erj5$, $\Delta lhs1$ mutantuose VP1-EGFP fluorescencija sumažėjo apie 60-70 %, kaip ir natyvaus VP1 baltymo lygis (3.7 pav 17-20 takeliai; 3.4 pav 15-16 takeliai), o UK114 baltymo sintezės lygis sumažėjo tik šiek tiek (3.6 pav A; 3.1 pav A). Kituose mielių kamienuose su šaperonų genų iškritomis, $\Delta scj1$, $\Delta hlj1$, VP1-EGFP sintezė sumažėjo 50 % (3.6 pav A). Šie rezultatai rodo, jog šaperonai tiesiogiai ar netiesiogiai vaidina svarbų vaidmenį rekombinantinių PyV VP1 VPD sintezėje mielse.

Mielių Hsp104 šaperonai dalyvauja didelių baltyminių agregatų ardyje po šiluminio šoko ir pasižymi gebėjimu katalizuoti baltymų agregaciją esant specifinėms sąlygoms (Griminger-Marquardt ir Lashuel, 2010). Nors rekombinantinių VP1 baltymų sintezė kelia papildomą stresą mielių ląstelėms formuojantis VPD, bet gauti rezultatai atskleidė, kad Hsp104 nebuvo reikalingi nei VP1-EGFP, nei nemodifikuoto VP1 produkcijai mielių ląstelėse (3.1 pav). Netgi priešingai, Hsp104 šaperono trūkumas šiek tiek padidino VP1 baltymų sintezės lygį. Hsp90 šaperonų šeimos poreikį kapsidės baltymų produkcijai parodė 75 ir 50 % sumažėjusi VP1-EGFP sintezė atitinkamai $\Delta hsc82$ ir $\Delta hsp82$ mielių kamienuose (3.1 pav A, 3.3 pav A), bei teigiama tėviniame kamene padidintos *HSP82* ir *HSC82* genų raiškos įtaka VP1 biosintzei (3.1 pav B, 3.3 pav B). Tuo tarpu mažo UK114-EGFP baltymo sintezės lygis trūkstant Hsp90 šaperonų sumažėjo tik 25 % (3.1 pav A). Kadangi Hsp90 molekuliniai šaperonai yra daugelio esminių ląstelės procesų dalyviai, gali būti, kad poliomos virusai panaudoja Hsp90 šaperonų savybes virusinių baltymų

lankstymui ir stabilizacijai. Panašus Hsp90 poreikis buvo parodytas ir hepatito C viruso (HCV) nukleokapsidės susirinkimui mielėse (Kubota ir kt., 2012). Nustatyta, kad kepenų ląstelių kultūrose formuojantis hepatito B viruso (HBV) nukleokapsidei Hsp90 šaperonai ne tik stabilizuoja kapsidės dimerinius baltymus, bet ir galimai susipakuoja HBV kapsidėje (Shim ir kt., 2011). Hsp90 pagalba yra esminė ir vaccinia viruso kapsidės išsiardymui prieš replikaciją bei vėliau susirenkant šerdinės dalelės baltymams ląstelių kultūrose (Hung ir kt., 2002). Iki šiol Hsp90 šaperonų poreikis PyV nebuvo tyrinėtas nors neseniai buvo pademonstruota, kad į kapsidės struktūras nesujungti VP1 baltymai dalyvaujant Hsp90 šaperonams sąveikauja su mikrovamzdeliais bei sukelia α -tubulino acetilinimą (Hornikova ir kt., 2017). Šie kitų autorių ir mūsų rezultatai rodo, kad Hsp90 šaperonai galėtų būti svarbus taikinyš gydant nuo PyV sukiamų komplikacijų imunosupresijos sąlygomis, nes medikamentai inhibuojantys Hsp90 šaperonus yra bandomi ir kitų virusų infekcijos sustabdymui.

Bandymai susintetinti HPyV12 VP1 baltymą mielėse parodė, kad teoriškai nustatyta šio VP1 geno pradžia gali būti neteisinga, nes VP1 baltymo transliacija turėtų prasidėti ne nuo pirmo, o nuo antro rėmelyje esančio ATG kodono. Šešiolikos aminorūgščių, koduojamų nuo pirmo ATG, pašalinimas VP1 N gale labai pagerino VP1 sintezės lygį, išėigas ir VPD formavimosi efektyvumą mielėse. Iki šiol buvo žinomi keli tokie atvejai kitų PyV genomuose. HaPyV, JCPyV ir SV40 virusai VP1 baltymų sintezei naudoja antrą, o ne pirmą ATG kodonus (Siray ir kt., 1999). PyV panašų baltymų transliacijos būdą naudoja ir VP3 baltymo sintezei: VP3 baltymas transliuojamas nuo VP2 geno transkripto tik kito pradžios kodono (Imperiale ir Major, 2013).

Žinoma, kad virusų su mažu genomu, genų produktai yra daugiafunkciniai. Pavyzdžiui, PyV LT antigenas yra pRb ir p53 reguliatorius, transkripcijos faktorius, replikacijos iniciatorius. HCV kapsidės baltymai prisideda prie transliacijos iniciacijos (Boni ir kt., 2005), o HBV kapsidės baltymas epigenetiškai reguliuoja savo transkripciją ir replikaciją (Guo ir kt.,

2011). *Enterovirus* rūšies B viruso VP1 baltymas sukelia ląstelės šeimininkės ciklo reguliacijas (Wang ir kt., 2012). Parodyta, kad PyV kapsidės baltymai taip pat gali dalyvauti viruso patogenezėje tiesiogiai arba netiesiogiai keisdami ląstelės fenotipą VP1 baltymui kaupiantis bei migruojant branduolyje. Buvo parodyta, kad MPyV VP1 baltymas jungiasi su mitotine dalinimosi verpste ir kol susiformuoja nauja verpstė sulėtina mielių augimą (Palkov ir kt., 2000). Žinduolių ląstelių ciklas sustoja S ir G2 fazėje po PyV infekcijos (Schlegel ir Benjamin, 1978) ir šiam ląstelės ciklo G2/M fazėje sustabdymui, kuris vyksta dėl VP1 susijungimo su mikrovazdeliais, užtenka tik MPyV VP1 baltymo sintezės žinduolių ląstelėse (Hornikova ir kt., 2017). Panašu, kad VP1 baltymas taip prisideda prie ląstelės ciklo stabdymo tam, kad būtų baigtas viruso dalelių susirinkimas, nes su mikrovamzdeliais sąveikauja ir α -tubulino acetilimą sukelia tik neįsijungę į kapsides VP1 baltymai (Hornikova ir kt., 2017). Šio tyrimo metu analizuojama kai kurių PyV VP1 baltymų sintezės sukeliama mielių ląstelių flokuliacija taip pat gali būti susijusi su šių baltymų dalyvavimu virusų patogenezėje. Kaip žinia, paukščių poliomos virusai, kurių VP1 sintezė mielėse sukelia flokuliaciją, pasižymi ir tuo, kad jų infekcija, ypač jauniems paukščiams, dažnai yra mirtina. Mielėse ląstelių flokuliacija yra svarbi mielių streso tolerancijos savybė, kuri yra naudojama kaip epigenetinių mutagenų testas mielėse, kuomet *FLO1* promotoriaus nukleosomos pokyčiai tiesiogiai įjungia GFP fluorescenciją (Sugiyama ir kt., 2017). *FLO1* transkripcijos mechanizmo valdymas svarbus visam ląstelių populiacijos išgyvenimui. Mielėse flokuliacija naudinga alaus, bioetanolio pramonės naudojamuose kamieniuose, bet visai nepatinka daugumai pramoninių procesų, klinikoje ir laboratorijoje. Tyrinėjant rekombinantinių PyV VP1 baltymų sintezės sukeltos flokuliacijos priežastis mielėse paaiškėjo, kad už tai atsakinga *FLO1* geno raiška, nes $\Delta flo1$ mielių mutante APyV ir kitų PyV VP1 baltymo sintezės sukeliama mielių flokuliacija išnyko. Flokuliacija sumažina rekombinantinių baltymų gryninimo išėigą, o jų produkcijai naudoti $\Delta flo1$ mielių kamieną nėra paranku dėl jo jautrumo, lėtesnio augimo.

Priešingai nei eksperimentinės evoliucijos tyrime, kai *TUP1* geno funkcijos praradimo mutacijos buvo priskirtos prie pagrindinių ir dažniausių genetinių mechanizmų, įjungiančių flokuliaciją (Hope ir kt., 2017), šiame tyrime, parodėme, kad už APyV VP1 baltymo sukeliama flokuliaciją atsakingas Cyc8 baltymo trūkumas, o padidinta *CYC8* geno raiška šią flokuliaciją efektyviai slopina. Abu minėti baltymai formuoja Tup1-Cyc8 kompleksą, kuris prisijungęs *FLO1* geno promotoriuje, kooperuojasi su histonų deacetilazėmis (Fleming ir kt., 2014). Cyc8-Tup1 yra universalus streso sąlygojamas reguliatorinis kompleksas, kuris greitai perjungia genų veiklą iš užslopinotos į aktyvuotą būklę (Wong ir Struhl, 2011). Jis reguliuoja apie 200 mielių genų raišką (Green ir Johnson, 2004). Tup1p yra *Caenorhabditis elegans* Groucho ir žinduolių TLE (Transducino tipo) šeimų represorių homologas. Gerai išnagrinėti *Drosophila melanogaster* Groucho baltymai dalyvauja labai įvairiuose vystymosi procesuose, pavyzdžiui, segmentacijoje, kūno poliškumo ir lyties formavime. Žinduolių TLE baltymai taip pat funkcionuoja embriogenezėje. Cyc8-Tup1 veikia kaip antagonistinis transkripcijos reguliatorius, kurio veikimas priklauso nuo mielių ląstelių fiziologinės būklės (Kliewe ir kt., 2017). Daugelio tyrimų duomenimis Cyc8-Tup1 komplekse Tup1p yra atsakingas už represiją, o Cyc8p sąveikauja su prie DNR prisijungiančiais baltymais. Vienas pats Cyc8p genų transkripcijos nerepresuoja (Keleher ir kt., 1992; Tzamarias ir Struhl, 1995). Mielų Cyc8p (SSN6) sugebėjimas sąveikauti ir sukelti transkripcijos represiją kartu su žinduolių TLE1 baltymu, labai panašiu į TUP1, atskleidžia Cyc8p konservatyvumą (Grbavec ir kt., 1999). Cyc8 baltymo N-gale yra 10 TPR pasikartojimų (tetratrikopeptido) domenai (Tzamarias ir Struhl, 1995), kuriuo jis jungiasi su ant DNR esančiais baltymais (nesijungia tiesiogiai su DNR). Su histonų deacetilazėmis Cyc8-Tup1 jungiasi kartu (Davie at el., 2003). Cyc8p gali formuoti agregatus ir daugintis kaip prionas (Patel ir kt., 2009), kaip ir transkripcijos reguliatorius Swi1 (Du ir kt., 2008). Cyc8 ir Swi1 prionizacija suteikia papildomą kontrolės lygį ir dinamiką chromatino permodeliavimo procesui (Patel ir kt., 2009). Šių agregatų suardymui reikalingi šaperonai

Hsp104 ir Sis1. Įdomu, kad PyV VP1 baltymų sintezės lygį Hsp104 perteklius veikė neigiamai, tačiau Sis1 perteklius buvo palankus ir padidino VP1-GFP baltymo fluorescenciją iki 150 % (3.6 pav B).

Mielių Cyc8 (SSN6) yra TPR (tetratrikopeptidinių pasikartojimų turinčių baltymų) šeimos baltymas (Schultz ir kt., 1990). Jo *Homo sapiens* ortologai KDM6A (koduoja lizino demetilazę 6A), UTY (ubikvitino baltymas turintis TPR motyvą), KDM6B (lizino demetilazė 6B) (pagal Alliance of genome resources duomenų bazę). Lizino demetilazės specifiškai demetilina di- ir tri- metilintą histono H3 27-tąją liziną (H3K27me2 ar H3K27me3). H3K27me3 yra represinis epigenetinis žymuo kontroliuojantis chromatino organizaciją ir genų nutildymą. Lizino demetilazė 6B demetilina ir ne histonų baltymus, pavyzdžiui, pRb baltymą (Kang ir kt., 2017). KDM6B turi du klasikinius NLS N-gale. Demetilavimo aktyvumas įtakoja genų aktyvumą susijusį su ląstelių diferenciacija, uždegiminiais, neurodegeneratyviniais procesais. Naujausių tyrimų duomenimis KDM6B (Jmjd3) reguliuoja prieš uždegiminių genų raišką (De Santa ir kt., 2009) ir dalyvauja CD4⁺ T pagalbinių ląstelių diferenciacijoje nustatant jų vystymosi kryptį (Li ir kt., 2014; Kang ir kt., 2017). Ląstelėms senstant ir susiduriant su oksidaciniu stresu, DNR pažaidomis ar hyperonkogeniniu spaudimu KDM6B (Jmjd3) demetilina pRb (K810 vietoje), taip apsaugant pRb nuo CDK4 prisijungimo ir fosforilavimo (Nijwening ir kt., 2011; Zhao ir kt., 2015). KDM6B (Jmjd3) yra vienas iš veiksmingų įjungiant pRb/E2F kelią, o E2F reguliuojamų genų (Ciklinų A1 ir B1, CCNA2) raiškos represija yra būtina auglių supresijai, senstančių ląstelių heterochromatino pertvarkai (Uchida, 2016). Kadangi Cyc8 ortologai žinduoliuose taip pat neabejotinai svarbūs chromatinos organizacijos ir genų raiškos reguliacijoje, nustatymas, kad kai kurių PyV VP1 baltymų sintezė mielėse tiesiogiai ar netiesiogiai sumažina Cyc8 baltymo kiekį arba sulaiko jį nuo transporto į branduolį ir taip paveikia Tup1-Cyc8 komplekso vykdomą genų raiškos reguliaciją, galėtų reikšti, kad ir žinduolių ląstelėse jie gali veikti panašiai sumažindami kažkurios/ių iš lizino demetilazių lygį. Kokį pranašumą virusui suteiktų toks VP1 VPD veikimas dar reikia išsiaiškinti, nes šiuo atveju

Cyc8 kiekio sumažėjimui svarbu, kad VP1 baltymas formuotų VPD ar bent jau pentamerus bei nebūtų efektyviai transportuojamas į branduolį. Įdomu, kad Cyc8 ortologas žmogaus ląstelėse KDM6B (Jmjd3) kaupiasi citoplazmoje senstant diploidiniams fibroblastams WI38 (Zhao ir kt., 2015).

Pirminė besimtomė HPyV infekcija įvyksta kūdikystėje arba vaikystėje, bet viremija sveikuose žmonėse aptinkama labai retai, tad pirminei PyV infekcijos diagnostikai serologiniai metodai yra tinkama strategija (Chen ir kt., 2014). Nemodifikuotos PyV VPD pasižymi tokia pat struktūra, tropizmu, imunogeniškumu ir transdukcijos efektyvumu kaip ir PyV (Teunissen ir kt., 2013). Per daugiau nei 40 metų BKPyV ir JCPyV infekcijų tyrimui buvo pritaikyti imunoblotingo, hemagliutinacijos, viruso neutralizacijos (Pastrana ir kt., 2013), imunoelektroosomoforezės, netiesioginis fluorescuojančiųjų antikūnų ir imunofermentinės analizės metodai. Ne visi minėti metodai gali būti tinkami naujų PyV tyrimams dėl sudėtingumo ir nepraktiškumo dirbant su didelėmis mėginių imtimis (Knowles, 2006). Šio darbo metu pirmą kartą buvo atlikas hemagliutinacijos testas su visų šiuo metu žinomų HPyV VP1 VPD naudojant jūrų kiaulytės ir žmogaus eritrocitus. Nustačius, kad MCPyV, TSPyV, HPyV9, HPyV10 ir HPyV12 kaip ir BKPyV bei JCPyV VP1 VPD hemagliutina jūrų kaulyčių bei žmogaus eritrocitus galima naudoti šias VPD ne tik fermentiniuose serologiniuose metoduose, bet ir specifiskesniuose hemagliutinacijos inhibicijos tyrimuose, aptinkant anti-HPyV Ak (Knowles ir Sasnauskas, 2003). Be to, hemagliutinacijos testo rezultatai prisideda prie viruso ir ląstelės jungimosi sąvybių tyrimų. Yra žinoma, kad JCPyV kapsidė infekcijos metu jungiasi prie gangliozidų receptorių sialinės rūgšties liekanų (N-acetilneuramininės rūgšties, NANA) (O'Hara ir kt., 2014), o, pavyzdžiui, SV40 neturi šio aktyvumo ir jungiasi prie MHC I receptoriaus (Breau ir kt., 1992). Kristalografiniais metodais įrodyta, kad sėkmingai MCPyV infekcijai yra svarbios ląstelės glikanų (glikolipidų) sialinės rūgšties liekanos, kurių mutacijos pablogina MCPyV VP1 kapsidžių sukeltą hemagliutinaciją ir galimai stabdo MCPyV infekciją (Neu ir kt., 2012). Mūsų atlikti hemagliutinacijos testo rezultatai patvirtino, kad skirtingų naujųjų HPyV VP1

baltymo formuojamos kapsidės jungiasi su skirtingais receptoriais. TSPyV, HPyV9, HPyV10 ir HPyV12 VP1 VPD sugebėjimas hemagliutinuoti žmogaus ar jūrų kiaulytės eritrocitus sufleruoja apie sialo rūgšties liekanų jungimosi svarbą šių virusų infekcijos metu. O KIPyV, WUPyV, HPyV6, HPyV7, STLPyV ir NJPyV VP1 VPD nesugebėjimas hemagliutinuoti eritrocitų rodo, kad šie virusai naudoja kitus receptorius. Pvz., didelės skiriamosios gebos kristalografijos ir glikanų mikrogardelės atrankos eksperimentai patvirtino, kad HPyV9 VP1 sudaro kompleksą su trim trumpomis sialo rūgšties oligosacharidų liekanomis (Khan ir kt., 2014). Tuo tarpu HPyV6 ir HPyV7 VP1 baltymų struktūrinė analizė parodė, kad jie turėtų prie sialo rūgšties jungtis neefektyviai, o eksperimentuose jie nesąveikavo su sialo grupės turinčiais komponentais tirpale ar su kultivuojamomis žmogaus ląstelėmis (Stroh ir kt., 2014). Kadangi šių virusų VP1 VPD susintetintos mielėse nehemagliutino eritrocitų, mūsų rezultatai prisideda prie įrodymų, kad HPyV6 ir HPyV7 virusai jungiasi ne prie sialo rūgšties receptorių. KIPyV ir WUPyV, priklausančių *Wukipolyomavirus* šeimai, VP1 VPD taip pat nehemagliutino eritrocitų, o šių virusų VP1 kristalografijos duomenys patvirtino, jog kapsidžių paviršinės kilpos, dalyvaujančios prisijungiant ląstelės sialo receptoriui, neturi konservatyvių SV40, JCPyV ar MPyV VP1 baltymų ar liekanų reikalingų šiam prisijungimui (Neu ir kt., 2011). Taigi, naujųjų HPyV VP1 VPD susintetintos mielių ląstelėse gali būti naudingos ne tik šių virusų diagnostikai bei epidemiologijai, bet ir kaip infekcijos strategijos ir audinių tropizmo ir patogeniškumo tyrimų įrankis.

Šiame darbe panaudojant visų trylikos žmogaus PyV VP1 baltymų formuojamas VPD buvo atlikta antikūnų prieš atitinkamus PyV paieška dviejose kraujo serumo mėginių grupėse. Didžioji dalis analizuotų kraujo serumo mėginių turėjo antikūnų bent prieš vieną HPyV (3.26 pav). Nustatyti anti-PyV antikūnų kiekiai buvo nuo 16,49 % (prieš JCPyV VP1) iki 88,72 % (prieš MCPyV VP1) aukštos rizikos grupės asmenų kraujo serumo mėginių ir nuo 18,66 % (prieš HPyV12 VP1) iki 66,82 % (prieš MCPyV VP1) sveikų asmenų kraujo serumo mėginių (3.8 lentelė). Iki šiol daugiausia serologinių tyrimų atlikta su BKPyV ir JCPyV, kurie yra labai plačiai paplitę ir, kai

kuriuose populiacijose iki 90 % serumo mėginių aptinkami antikūnai prieš šiuos virusus (Moens ir kt., 2013). Taip pat parodyta, kad antikūnų, atpažįstančių abu BKPyV ir JCPyV, titras su amžiumi mažėja (Kean ir kt., 2009). Šis fenomenas aiškinamas imuninės sistemos senėjimu, sulėtėjusiu imuniniu atsaku arba retesniu virusų poveikiu, jų reaktyvacija. Laikoma, kad iš naujųjų HPyV labiausiai paplitę yra MCPyV ir TSPyV (Nicol ir kt., 2013). Paprastai anti-TSPyV Ak kryžminis aktyvumas su MCPyV ar kitomis HPyV nėra nustatomas (Fukumoto ir kt., 2015). Šio darbo rezultatai taip pat parodė didelį Ak prieš MCPyV ir TSPyV paplitimą: sveikų asmenų grupėje atitinkamai 66,82 % ir 62,51 %, tačiau prie labiausiai paplitusių PyV leido priskirti ir WUPyV (anti-WUPyV Ak aptikti 56,77 % serumo mėginių pirmojoje grupėje ir 84,34 % serumo mėginių antrojoje tirtoje grupėje, žr. 3.8 lentelėje). Panašų WU PyV paplitimą (69-98 % serumo mėginių buvo aptikti Ak prieš WUPyV VP1) nustatė kiti tyrėjai atlikę serologinius tyrimus (Kean ir kt., 2009; Nguyen ir kt., 2009). Tirtų Lietuvoje surinktų kraujo serumo mėginių grupėje IFA duomenimis buvo nustatytas mažesnis negu Australijoje HPyV6 (28 %) ir HPyV7 (30 %) bet didesnis HPyV9 (29 % Ak) paplitimas (van der Meijden ir kt., 2013), Australijos kraujo serumo mėginiuose IFA metodu HPyV9 aptinkamas gana retai - tik mažiau negu penktadalis tirtų kraujo serumų buvo serologiškai teigiami (van der Meijden ir kt., 2013). Kituose tyrimuose anti-HPyV9 Ak buvo rasti 25-47 % kraujo serumo mėginių ir pastebėta tendencija, kad šių Ak titras, priešingai nei BKPyV ar JCPyV atvejais, su amžiumi didėja (Trusch ir kt., 2012; Nicol ir kt., 2013, Gossai ir kt., 2016). Rečiausiai žmogaus kraujo serume aptinkama Ak prieš HPyV12 (23-33 %) (Ehlers ir Wieland, 2013; Korup ir kt., 2013). Paprastai Ak titras prieš HPyV12 yra gana žemas. Šiame tyrime Ak prieš HPyV12 titrai taip pat buvo neaukšti ir jie buvo aptikti tik 18,66 % Lietuvoje surinktų sveikų asmenų bei 48,43 % Bulgarijoje surinktų aukštos rizikos asmenų kraujo serumų. Be to, Ak prieš HPyV12 dažnai kryžmiškai reagavo beveik su visų HPyV VP1 VPD. Šiuos rezultatus galėtų paaiškinti neseniai paskelbti duomenys, kad HPyV12 greičiausiai yra ne žmonių, o kirstukų PyV, kurie gali zoonozijų keliu užkėsti ir žmones

(Gedvilaite ir kt., 2017). Kol kas nėra duomenų ir apie NJPyV paplitimą kitose šalyse, o šiame tyrime Ak prieš NJPyV VP1 buvo aptikti 18,97 % serumo mėginių pirmoje ir 48,43 % mėginių antroje grupėse.

Suskaičiavus, prieš kiek skirtingų HPyV buvo aptikti Ak kiekviename tirtame kraujo serume pasirodė, kad HPyV koinfekcijos yra plačiai paplitęs fenomenas. Pirmojoje grupėje viename kraujo serume vidutiniškai buvo Ak prieš 2,5 skirtingų tipų HPyV VP1 VPD, o antrojoje grupėje - vidutiniškai prieš 6 skirtingas HPyV VP1 VPD. Panašiam JAV kraujo serumo tyrime su dešimt skirtingų HPyV VP1 baltymų nebuvo rastas nė vienas serumas, kuriame nebūtų Ak bent prieš vieną HPyV: viename serume vidutiniškai buvo Ak prieš 7 skirtingus PyV (Gossai ir kt. 2016). Kol kas, neatsižvelgiant į jau seniai tiriamų BKPyV ir JCPyV epidemiologinius rezultatus, naujų HPyV tyrimų rezultatai gana fragmentiški. Juos sunku lyginti dėl įvairių imčių, nevienodai paruoštų antigenų (VP1 baltymai arba VPD), dėl kontrolinių grupių, kurios kiekvienu atveju pasirenkamos savarankiškai ir įtakoja ribinės reikšmės vertes, o gal ir dėl skirtingose populiacijose cirkuliuojančių skirtingų HPyV.

Dar viena problema, vertinant HPyV paplitimą iš serologinių tyrimų duomenų, yra didelis skirtingų HPyV skaičius, VP1 baltymų panašumas ir galimas kryžminis reaktyvumas. Iš visų žinomų HPyV labiausiai homologiškos (78 %) yra BKPyV ir JCPyV VP1 baltymų ar. sekos, ir mūsų atlikta konkurencinė IFA su šiais virusų VP1 baltymais kaip antigenu taip pat daugumoje tirtų serumų rodė kryžminį reaktyvumą, o nustatytas bendrų Ak kiekis sudarė 30-60 % (3.25 pav). Kai bendrų Ak kiekis yra tik apie 30 % netiesioginėje IFA sunku tokį kryžminį reaktyvumą nustatyti, ypač kai Ak titrai prieš šiuos virusus yra gana žemi, todėl yra nemažai duomenų, kuomet imunofermeninėje analizėje Ak prieš BKPyV ir JCPyV VP1 baltymus kryžminis reaktyvumas neužfiksuojamas (Kean ir kt., 2009; Hamilton ir kt., 2000; Viscidi ir kt., 2003). Tai galėtų būti paaiškinama ir nevienoda VPD, kaip antigeno, susirinkimo kokybe ar daline denatūracija, kuomet pakinta VPD erdvinė struktūra arba tiramosios imties charakteristikomis. Bendrų B ląstelių epitopų galimybę palaiko ir tai, kad MAk sukurti prieš JCPyV VP1 reaguoja su

BKPyV VP1 VPD atliekant IFA (Randhawa ir kt., 2009). Galimas Ak kryžminis reaktyvumas buvo nustatytas su kitais HPyV VP1 baltymais: tarp HPyV6 ir HPyV7 VP1 (van der Meijden ir kt., 2013; Nicol ir kt., 2013; Sroller ir kt., 2016), tarp WUPyV ir KIPyV VP1 (Moens ir kt., 2013) ir tarp MCPyV ir HPyV9 VP1 (Gossai ir kt., 2016). Šio darbo metu atliktos konkurencinės IFA rezultatai patvirtino antikūnų prieš HPyV6 ir HPyV7 (3.29 pav), bei WUPyV ir KIPyV VP1 (3.27, 3.28, 3.29 pav) tačiau ne MCPyV ir HPyV9 galimą kryžminį aktyvumą, nors viename iš tirtų serumų Ak prieš HPyV9 visiškai sutapo su Ak prieš HPyV10 (3.28 pav). Kryžmiškai reaguojantys Ak buvo aptikti ne visuose serumo mėginiuose ir dažniausiai nesiekė 100 %, todėl gali būti, kad teisūs ir kiti tyrimai kryžminio reaktyvumo tarp HPyV6 ir HPyV7 VP1 ar tarp WUPyV ir KIPyV VP1 nenustatę IFA metodu (Kean ir kt., 2009; Nguyen ir kt., 2009; Showalter ir kt., 2010). Minėtų HPyV VP1 baltymų sekų panašumas yra 69 % (HPyV6 ir HPyV7), 66 % (WUPyV ir KIPyV), 54 % (MCPyV ir HPyV9), 51 % (HPyV9 ir HPyV10) todėl dalis imunogeniškų paviršiaus epitopų gali sutapti ir susidaryti kryžmiškai reaguojančių Ak. Gali būti, kad IFA naudojamo antigeno kokybė, ypač paviršiaus kilpų erdvinė struktūra taip pat yra svarbi Ak kryžminėms reakcijoms. Palyginus tų pačių kraujo serumų IFA rezultatus naudojant iš vabzdžių ląstelių išgrynintas HPyV6 ir HPyV7 VP1 VPD su HPyV6-GST ir HPyV7-GST VP1 išskirtas iš bakterijų ląstelių, pasirodė, kad IFA su HPyV6 ir HPyV7 VP1 VPD buvo specifiškesnė (Sroller ir kt., 2016). Taigi, interpretuojant IFA metodu ištirtų serumų tyrimų rezultatus reikia atsižvelgti, kad jie gali būti netikslūs dėl galimo Ak prieš kitų tipų HPyV, dar neidentifikuotų HPyV arba ne žmogaus PyV (pvz.: SV40, LPV) kryžminio aktyvumo poveikio.

Žmonės evoliucijos metu prisitaikė prie nuolatinio kontakto su įvairiais virusais, todėl besimptomės infekcijos ir efektyvus Ak susidarymas yra laikoma norma. Palyginus dviejų skirtingų kartų (Japonijos populiacijoje 1980 ir 2012 metų surinktų kraujo serumų) IFA rezultatus, tirtose amžiaus grupėse TSPyV titrai išliko tokie pat, tik kūdikių grupėje išaugo nuo 0 iki 11 % (Fukumoto ir kt., 2015). Prie šios amžiaus grupės (iki 1 metų) bendro Ak titro

prisideda iš motinos gaunami anti-PyV Ak (van der Meijden ir kt., 2013; Boldorini ir kt., 2011) bei HPyV infekcijos šeimos narių tarpe dėl dažno artimo kontakto (Pedergnana ir kt., 2017). Nors nauji susidūrimai su skirtingais HPyV ir koinfekcijos (Gossai ir kt., 2016) vyksta ir vėlesniame amžiuje (Chen ir kt., 2014), bet pagal serologinius duomenis nuo pat vaikų gimimo dienos iki 4 metų, nustatytas didžiausias HPyV ir Herpes virusų (HSV) pirminių infekcijų dažnis (Karachaliou ir kt., 2016). Pagal populiarią higienos teoriją pirminės HPyV, HSV ir kitų virusų infekcijos prisideda prie efektyvesnio imuniteto brendimo. Tačiau tam pagrįsti reikia ilgesnių kompleksinių epidemiologinių tyrimų.

IŠVADOS

1. Naujų žmogaus poliomos virusų VP1 baltymai efektyviai formavo VPD mielių *S.cerevisiae* raiškos sistemoje.
2. Hsp90, Hsp70 ir Hsp40 šaperonų genų iškritos sumažino rekombinantinių PyV VP1 baltymų sintezės lygį mielėse nuo 10 % iki 50 %.
3. Kai kurių PyV VP1 baltymų biosintezė sukelia mielių ląstelių nuo Flo1 priklausančią flokuliaciją, už kurią atsakingas Cyc8 baltymo trūkumas, VP1 baltymo seka, erdvinė struktūra ir lokalizacija ląstelėje.
4. Mielių raiškos sistemos panaudojimas leido patikslinti HPyV12 VP1 transliacijos iniciacijos vietą.
5. Ištyrus 1106 asmenų kraujo serumo mėginius, IgG klasės antikūnai prieš įvairius HPyV aptikti 18-67 % Lietuvoje surinktų kraujo serumo mėginių, o aukštos rizikos Bulgarijos grupėje šių virusų paplitimas buvo nuo 6 % iki 30 % didesnis.
6. Dėl didelio skirtingų HPyV skaičiaus ir VP1 baltymų panašumo kraujo serumo mėginiuose aptinkama nuo 10 % iki 100 % kryžmiškai reaguojančių IgG antikūnų.

Disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas

1. **Norkiene M**, Stonyte J, Ziogiene D, Mazeike E, Sasnauskas K, Gedvilaite A. Production of recombinant VP1-derived virus-like particles from novel human polyomaviruses in yeast. 2015, 15:68, BMC Biotechnology;
2. Valaviciute M, **Norkiene M**, Goda K, Slibinskas R, Gedvilaite A. Survey of molecular chaperone requirement for the biosynthesis of hamster polyomavirus VP1 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. 2016, 161(7):1807-19, Archives of Virology;
3. **Norkiene M**, Gedvilaite A. Influence of codon bias on heterologous production of human papillomavirus type 16 major structural protein 11 in yeast. 2012, 979218, ScientificWorldJournal.

Kitos publikacijos nesusijusios su disertacijos tema

1. Lasickiene R, Gedvilaite A, **Norkiene M**, Simanaviciene V, Sezaite I, Dekaminaviciute D, Shikova E, Zvirbliene A. The use of recombinant pseudotype virus-like particles harbouring inserted target antigen to generate antibodies against cellular marker p16INK4A. ScientificWorldJournal. 2012, 10.1100/2012/263737;
2. Gedvilaite A, Jomantiene R, Dabrisius J, **Norkiene M**, Davis RE. Functional analysis of a lipolytic protein encoded in phytoplasma phage based genomic island. 2014, 169(5-6):388-94. Microbiological research.

Pranešimai mokslinėse konferencijose

1. 2016.06.28-30, „XIVth International Conference of Lithuanian Biochemical Society“, Druskininkai, Lietuva. “Studies on the seroprevalence of human polyomaviruses using yeast-generated VP1-derived virus-like particles”, (stendinis pranešimas).
2. 2015.06.8-10, Global Virus Network conference of virologists for the Scandinavia-Baltic-Ukraine region, Švedija. “Expression in yeast of novel human polyomaviruses VP1-derived virus-like particles, their purification and application in serology”, (žodinis pranešimas).
3. 2014.11.13-16, 16th European Congress on Biotechnology, Edinburgas, Jungtinė karalystė. Gedvilaitė A. Norkienė M, Lasickiene R, „The employment of a heterologous yeast expression system for production of VP1-derived virus-like particles originated from novel human polyomaviruses”, (stendinis pranešimas).
4. 2012.06.28-30, XII Lietuvos Biochemikų Draugijos konferencija "Biochemijos studijoms Lietuvoje – 50 metų", Kernavė, Lietuva. “HPV rekombinantinių baltymų taikymas serologiniams tyrimams”, (žodinis pranešimas).
5. 2012.04.11, V nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“, Kaunas, Lietuva. „HPV 6, 16, 18, 31 ir 33 L1 baltymų formuojamų į virusus panašių dalelių susintetintų mielėse panaudojimas serologiniams diagnostiniams tyrimams“, (žodinis pranešimas).

Finansinė parama

Disertacijoje aprašyti darbai buvo iš dalies finansuoti Europos Socialinio fondo NKP “Biotechnologija ir biofarmacija: fundamentiniai ir taikomieji tyrimai” ir dotacijos “Genominio masto analizės pritaikymas naujų mielių kamienų, pasižyminčių padidinta heterologine raiška, kūrimui” projektu (finansavimo ir administravimo sutarčių Nr. VP1-3.1-SMM-08-K01-005 ir VP1-3.1-SMM-07-K-02-038).

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abe H, Tomimoto K, Fujita Y, Iwaki T, Chiba Y, Nakayama KI, Nakajima Y. Development of N- and O-linked oligosaccharide engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Glycobiology* 2016; 26: 1248-1256.
2. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98: 5301-5317.
3. An P, Saenz Robles MT, Pipas JM. Large T antigens of polyomaviruses: amazing molecular machines. *Annu Rev Microbiol* 2012; 66: 213-236.
4. Andrei G, Topalis D, De Schutter T, Snoeck R. Insights into the mechanism of action of cidofovir and other acyclic nucleoside phosphonates against polyoma- and papillomaviruses and non-viral induced neoplasia. *Antiviral Res* 2015; 114: 21-46.
5. Angeletti PC, Kim K, Fernandes FJ, Lambert PF. Stable replication of papillomavirus genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 2002; 76: 3350-3358.
6. Antonsson A, Green AC, Mallitt KA, O'Rourke PK, Pawlita M, Waterboer T, Neale RE. Prevalence and stability of antibodies to the BK and JC polyomaviruses: a long-term longitudinal study of Australians. *J Gen Virol* 2010; 91: 1849-1853.
7. Ardiani A, Higgins JP, Hodge JW. Vaccines based on whole recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Res* 2010; 10: 1060-1069.
8. Aron R, Higurashi T, Sahi C, Craig EA. J-protein co-chaperone Sis1 required for generation of [RNQ+] seeds necessary for prion propagation. *EMBO J* 2007; 26: 3794-3803.
9. Aun A, Tamm T, Sedman J. Dysfunctional mitochondria modulate cAMP-PKA signaling and filamentous and invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2013; 193: 467-481.
10. Ausubel Frederick BR, Kingston Robert, Moore David. Short Protocols in Molecular Biology : A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons; 1999.
11. Ayer A, Gourlay CW, Dawes IW. Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2014; 14: 60-72.
12. Backovic A, Cervelli T, Salvetti A, Zentilin L, Giacca M, Galli A. Capsid protein expression and adeno-associated virus like particles assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 2012; 11: 124.
13. Bagchi P, Inoue T, Tsai B. EMC1-dependent stabilization drives membrane penetration of a partially destabilized non-enveloped virus. *Elife* 2016; 5.
14. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* 2016; 353: aac4354.
15. Barajas D, Aponte-Ubillus JJ, Akeefe H, Cinek T, Peltier J, Gold D. Generation of infectious recombinant Adeno-associated virus in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 2017; 12: e0173010.
16. Bardwell L, Cook JG, Voora D, Baggott DM, Martinez AR, Thorner J. Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev* 1998; 12: 2887-2898.

17. Barua S, Li L, Lipke PN, Dranginis AM. Molecular Basis for Strain Variation in the *Saccharomyces cerevisiae* Adhesin Flo11p. *mSphere* 2016; 1.
18. Berke Z, Dalianis T. Persistence of polyomavirus in mice infected as adults differs from that observed in mice infected as newborns. *J Virol* 1993; 67: 4369-4371.
19. Berke Z, Mellin H, Heidari S, Wen T, Berglof A, Klein G, Dalianis T. Adult X-linked immunodeficiency (XID) mice, IGM^{-/-} single knockout and IGM^{-/-}CD8^{-/-} double knockout mice do not clear polyomavirus infection. *In Vivo* 1998; 12: 143-148.
20. Berrios C, Jung J, Primi B, Wang M, Pedomallu C, Duke F, Marcelus C, Cheng J, Garcea RL, Meyerson M, DeCaprio JA. Malawi polyomavirus is a prevalent human virus that interacts with known tumor suppressors. *J Virol* 2015; 89: 857-862.
21. Biemans R, Thines D, Gheysen D, Rutgers T, Cabezon T. Subcellular localization of recombinant truncated Gag precursor proteins of HIV expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *AIDS* 1992; 6: 541-546.
22. Bill RM. Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes: a role for yeast? *J Pharm Pharmacol* 2015; 67: 319-328.
23. Blanco R, Carrasco L, Ventoso I. Cell killing by HIV-1 protease. *J Biol Chem* 2003; 278: 1086-1093.
24. Bodaghi S, Comoli P, Bosch R, Azzi A, Gosert R, Leuenberger D, Ginevri F, Hirsch HH. Antibody responses to recombinant polyomavirus BK large T and VP1 proteins in young kidney transplant patients. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2577-2585.
25. Bolivar F, Backman K. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol* 1979; 68: 245-267.
26. Bonander N, Darby RA, Grgic L, Bora N, Wen J, Brogna S, Poyner DR, O'Neill MA, Bill RM. Altering the ribosomal subunit ratio in yeast maximizes recombinant protein yield. *Microb Cell Fact* 2009; 8: 10.
27. Bonander N, Hedfalk K, Larsson C, Mostad P, Chang C, Gustafsson L, Bill RM. Design of improved membrane protein production experiments: quantitation of the host response. *Protein Sci* 2005; 14: 1729-1740.
28. Boni S, Lavergne JP, Boulant S, Cahour A. Hepatitis C virus core protein acts as a trans-modulating factor on internal translation initiation of the viral RNA. *J Biol Chem* 2005; 280: 17737-17748.
29. Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Straif K, Group WHOIAfRoCMW. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol* 2012; 13: 339-340.
30. Brade L, Muller-Lantzsch N, zur Hausen H. B-lymphotropic papovavirus and possibility of infections in humans. *J Med Virol* 1981; 6: 301-308.
31. Breau WC, Atwood WJ, Norkin LC. Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. *J Virol* 1992; 66: 2037-2045.
32. Brew BJ, Davies NW, Cinque P, Clifford DB, Nath A. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other forms of JC virus disease. *Nat Rev Neurol* 2010; 6: 667-679.
33. Brodsky JL, Skach WR. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Curr Opin Cell Biol* 2011; 23: 464-475.

34. Bruckner S, Mosch HU. Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36: 25-58.
35. Bryan JT. Developing an HPV vaccine to prevent cervical cancer and genital warts. *Vaccine* 2007; 25: 3001-3006.
36. Buck CB, Van Doorslaer K, Peretti A, Geoghegan EM, Tisza MJ, An P, Katz JP, Pipas JM, McBride AA, Camus AC, McDermott AJ, Dill JA, Delwart E, Ng TF, Farkas K, Austin C, Kraberger S, Davison W, Pastrana DV, Varsani A. The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS Pathog* 2016; 12: e1005574.
37. Bundy BC, Swartz JR. Efficient disulfide bond formation in virus-like particles. *J Biotechnol* 2011; 154: 230-239.
38. Carbone M, Rizzo P, Pass HI. Simian virus 40, poliovaccines and human tumors: a review of recent developments. *Oncogene* 1997; 15: 1877-1888.
39. Carter JJ, Daugherty MD, Qi X, Bheda-Malge A, Wipf GC, Robinson K, Roman A, Malik HS, Galloway DA. Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 12744-12749.
40. Carter JJ, Madeleine MM, Wipf GC, Garcea RL, Pipkin PA, Minor PD, Galloway DA. Lack of serologic evidence for prevalent simian virus 40 infection in humans. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1522-1530.
41. Carter JJ, Paulson KG, Wipf GC, Miranda D, Madeleine MM, Johnson LG, Lemos BD, Lee S, Warcola AH, Iyer JG, Nghiem P, Galloway DA. Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 1510-1522.
42. Catrice EV, Sainsbury F. Assembly and Purification of Polyomavirus-Like Particles from Plants. *Mol Biotechnol* 2015; 57: 904-913.
43. Cervelli T, Backovic A, Galli A. Formation of AAV single stranded DNA genome from a circular plasmid in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 2011; 6: e23474.
44. Chen DH, Huang Y, Liu C, Ruan Y, Shen WH. Functional conservation and divergence of J-domain-containing ZUO1/ZRF orthologs throughout evolution. *Planta* 2014; 239: 1159-1173.
45. Chen T, Mattila PS, Jartti T, Ruuskanen O, Soderlund-Venermo M, Hedman K. Seroepidemiology of the newly found trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *J Infect Dis* 2011; 204: 1523-1526.
46. Chen T, Tanner L, Simell V, Hedman L, Mäkinen M, Sadeghi M, Veijola R, Hyöty H, Ilonen J, Knip M, Toppari J, Simell O, Soderlund-Venermo M, Hedman K. Diagnostic methods for and clinical pictures of polyomavirus primary infections in children, Finland. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 689-692.
47. Chen Y, Sharp PM, Fowkes M, Kocher O, Joseph JT, Koranik IJ. Analysis of 15 novel full-length BK virus sequences from three individuals: evidence of a high intra-strain genetic diversity. *J Gen Virol* 2004; 85: 2651-2663.
48. Chen Y, Xu Y, Bao Q, Xing Y, Li Z, Lin Z, Stock JB, Jeffrey PD, Shi Y. Structural and biochemical insights into the regulation of protein phosphatase 2A by small t antigen of SV40. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 527-534.
49. Cheng J, DeCaprio JA, Fluck MM, Schaffhausen BS. Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Semin Cancer Biol* 2009; 19: 218-228.
50. Chernoff YO. Stress and prions: lessons from the yeast model. *FEBS Lett* 2007; 581: 3695-3701.

51. Chittick P, Williamson JC, Ohl CA. BK virus encephalitis: case report, review of the literature, and description of a novel treatment modality. *Ann Pharmacother* 2013; 47: 1229-1233.
52. Cho EY, Cheon SA, Kim H, Choo J, Lee DJ, Ryu HM, Rhee SK, Chung BH, Kim JY, Kang HA. Multiple-yapsin-deficient mutant strains for high-level production of intact recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 2010; 149: 1-7.
53. Chromy LR, Pipas JM, Garcea RL. Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10477-10482.
54. Church M, Smith KC, Alhussain MM, Pennings S, Fleming AB. Sas3 and Ada2(Gcn5)-dependent histone H3 acetylation is required for transcription elongation at the de-repressed FLO1 gene. *Nucleic Acids Res* 2017; 45: 4413-4430.
55. Ciplys E, Sasnauskas K, Slibinskas R. Overexpression of human calnexin in yeast improves measles surface glycoprotein solubility. *FEMS Yeast Res* 2011; 11: 514-523.
56. Claro FB, Rijsbrack K, Soares EV. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. *J Appl Microbiol* 2007; 102: 693-700.
57. Clayson ET, Brando LV, Compans RW. Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *J Virol* 1989; 63: 2278-2288.
58. Colombo I, Ceciliani F, Ronchi S, Bartorelli A, Berra B. cDNA cloning and *Escherichia coli* expression of UK114 tumor antigen. *Biochimica et biophysica acta* 1998; 1442: 49-59.
59. Craig EA, Marszalek J. How Do J-Proteins Get Hsp70 to Do So Many Different Things? *Trends Biochem Sci* 2017; 42: 355-368.
60. Cripe TP, Delos SE, Estes PA, Garcea RL. In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *J Virol* 1995; 69: 7807-7813.
61. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 1998; 79: 129-168.
62. Cyr DM, Douglas MG. Differential regulation of Hsp70 subfamilies by the eukaryotic DnaJ homologue YDJ1. *J Biol Chem* 1994; 269: 9798-9804.
63. Cyr DM, Lu X, Douglas MG. Regulation of Hsp70 function by a eukaryotic DnaJ homolog. *J Biol Chem* 1992; 267: 20927-20931.
64. Dalianis T, Ramqvist T, Andreasson K, Kean JM, Garcea RL. KI, WU and Merkel cell polyomaviruses: a new era for human polyomavirus research. *Semin Cancer Biol* 2009; 19: 270-275.
65. Dang-Tan T, Mahmud SM, Puntoni R, Franco EL. Polio vaccines, Simian Virus 40, and human cancer: the epidemiologic evidence for a causal association. *Oncogene* 2004; 23: 6535-6540.
66. Daniels R, Sadowicz D, Hebert DN. A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *PLoS Pathog* 2007; 3: e98.
67. Davie JK, Edmondson DG, Coco CB, Dent SY. Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *J Biol Chem* 2003; 278: 50158-50162.
68. Dawe CJ, Freund R, Mandel G, Ballmer-Hofer K, Talmage DA, Benjamin TL. Variations in polyoma virus genotype in relation to tumor induction in mice.

- Characterization of wild type strains with widely differing tumor profiles. *Am J Pathol* 1987; 127: 243-261.
69. De Gascun CF, Carr MJ. Human polyomavirus reactivation: disease pathogenesis and treatment approaches. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 373579.
 70. De Santa F, Narang V, Yap ZH, Tusi BK, Burgold T, Austenaa L, Bucci G, Caganova M, Notarbartolo S, Casola S, Testa G, Sung WK, Wei CL, Natoli G. Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated macrophages. *EMBO J* 2009; 28: 3341-3352.
 71. De Wilde M, Cabezon T, Harford N, Rutgers T, Simoen E, Van Wijnendaele F. Production in yeast of hepatitis B surface antigen by R-DNA technology. *Dev Biol Stand* 1985; 59: 99-107.
 72. DeCaprio JA. Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2017; 372.
 73. Dehority WN, Eickman MM, Schwalm KC, Gross SM, Schroth GP, Young SA, Dinwiddie DL. Complete genome sequence of a KI polyomavirus isolated from an otherwise healthy child with severe lower respiratory tract infection. *J Med Virol* 2017; 89: 926-930.
 74. Dela Cruz FN, Jr., Li L, Delwart E, Pesavento PA. A novel pulmonary polyomavirus in alpacas (*Vicugna pacos*). *Vet Microbiol* 2017; 201: 49-55.
 75. Delbue S, Comar M, Ferrante P. Review on the role of the human Polyomavirus JC in the development of tumors. *Infect Agent Cancer* 2017; 12: 10.
 76. Demengeot J, Jacquemier J, Torrente M, Blangy D, Berebbi M. Pattern of polyomavirus replication from infection until tumor formation in the organs of athymic nu/nu mice. *J Virol* 1990; 64: 5633-5639.
 77. Du Z, Park KW, Yu H, Fan Q, Li L. Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet* 2008; 40: 460-465.
 78. Dugan AS, Gasparovic ML, Tsomaia N, Mierke DF, O'Hara BA, Manley K, Atwood WJ. Identification of amino acid residues in BK virus VP1 that are critical for viability and growth. *J Virol* 2007; 81: 11798-11808.
 79. Dupzyk A, Williams JM, Bagchi P, Inoue T, Tsai B. SGTA-Dependent Regulation of Hsc70 Promotes Cytosol Entry of Simian Virus 40 from the Endoplasmic Reticulum. *J Virol* 2017; 91.
 80. Eddy BE, Borman GS, Grubbs GE, Young RD. Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell culture as simian virus 40. *Virology* 1962; 17: 65-75.
 81. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* 2009; 199: 837-846.
 82. Ehlers B, Wieland U. The novel human polyomaviruses HPyV6, 7, 9 and beyond. *APMIS* 2013; 121: 783-795.
 83. El-Kirat-Chatel S, Beaussart A, Vincent SP, Abellan Flos M, Hols P, Lipke PN, Dufrene YF. Forces in yeast flocculation. *Nanoscale* 2015; 7: 1760-1767.
 84. el-Sherbeini M, Bostian KA. Viruses in fungi: infection of yeast with the K1 and K2 killer viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 4293-4297.
 85. Erickson KD, Garcea RL, Tsai B. Ganglioside GT1b is a putative host cell receptor for the Merkel cell polyomavirus. *J Virol* 2009; 83: 10275-10279.
 86. Falcon V, Garcia C, de la Rosa MC, Menendez I, Seoane J, Grillo JM. Ultrastructural and immunocytochemical evidences of core-particle formation

- in the methylotrophic *Pichia pastoris* yeast when expressing HCV structural proteins (core-E1). *Tissue Cell* 1999; 31: 117-125.
87. Fang CY, Lin PY, Ou WC, Chen PL, Shen CH, Chang D, Wang M. Analysis of the size of DNA packaged by the human JC virus-like particle. *J Virol Methods* 2012; 182: 87-92.
 88. Fauquet CM, Mayo MA. The 7th ICTV report. *Arch Virol* 2001; 146: 189-194.
 89. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008; 319: 1096-1100.
 90. Fernandez E, Toledo JR, Mansur M, Sanchez O, Gil DF, Gonzalez-Gonzalez Y, Lamazares E, Fernandez Y, Parra F, Farnos O. Secretion and assembly of calicivirus-like particles in high-cell-density yeast fermentations: strategies based on a recombinant non-specific BPTI-Kunitz-type protease inhibitor. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99: 3875-3886.
 91. Fleming AB, Beggs S, Church M, Tsukihashi Y, Pennings S. The yeast Cyc8-Tup1 complex cooperates with Hda1p and Rpd3p histone deacetylases to robustly repress transcription of the subtelomeric FLO1 gene. *Biochimica et biophysica acta* 2014; 1839: 1242-1255.
 92. Floer M, Bryant GO, Ptashne M. HSP90/70 chaperones are required for rapid nucleosome removal upon induction of the GAL genes of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2975-2980.
 93. Fukumoto H, Li TC, Kataoka M, Hasegawa H, Wakita T, Saeki H, Suzuki T, Katano H. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in Japan. *J Clin Virol* 2015; 65: 76-82.
 94. Galao RP, Scheller N, Alves-Rodrigues I, Breinig T, Meyerhans A, Diez J. *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile eukaryotic system in virology. *Microb Cell Fact* 2007; 6: 32.
 95. Gasser SM, Cockell MM. The molecular biology of the SIR proteins. *Gene* 2001; 279: 1-16.
 96. Gautschi M, Mun A, Ross S, Rospert S. A functional chaperone triad on the yeast ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 4209-4214.
 97. Gedvilaite A, Aleksaite E, Staniulis J, Ulrich R, Sasnauskas K. Size and position of truncations in the carboxy-terminal region of major capsid protein VP1 of hamster polyomavirus expressed in yeast determine its assembly capacity. *Arch Virol* 2006; 151: 1811-1825.
 98. Gedvilaite A, Frommel C, Sasnauskas K, Micheel B, Ozel M, Behrsing O, Staniulis J, Jandrig B, Scherneck S, Ulrich R. Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology* 2000; 273: 21-35.
 99. Gedvilaite A, Kucinskaite-Kodze I, Lasickiene R, Timinskas A, Vaitiekaite A, Ziogiene D, Zvirbliene A. Evaluation of Trichodysplasia Spinulosa-Associated Polyomavirus Capsid Protein as a New Carrier for Construction of Chimeric Virus-Like Particles Harboring Foreign Epitopes. *Viruses* 2015; 7: 4204-4229.
 100. Gedvilaite A, Tryland M, Ulrich RG, Schneider J, Kurmauskaite V, Moens U, Preugschas H, Calvignac-Spencer S, Ehlers B. Novel polyomaviruses in shrews (Soricidae) with close similarity to human polyomavirus 12. *J Gen Virol* 2017.
 101. Geiger R, Andritschke D, Friebe S, Herzog F, Luisoni S, Heger T, Helenius A. BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 1305-1314.

102. Geoghegan EM, Welch NL, Yabsley MJ, Church ME, Pesavento PA, Buck CB. Identification of a Second Raccoon-Associated Polyomavirus. *Genome Announc* 2017; 5.
103. Geoghegan JL, Duchene S, Holmes EC. Comparative analysis estimates the relative frequencies of co-divergence and cross-species transmission within viral families. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006215.
104. Gheuens S, Wuthrich C, Korálnik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy: why gray and white matter. *Annu Rev Pathol* 2013; 8: 189-215.
105. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 1995; 11: 355-360.
106. Gillies AT, Taylor R, Gestwicki JE. Synthetic lethal interactions in yeast reveal functional roles of J protein co-chaperones. *Mol Biosyst* 2012; 8: 2901-2908.
107. Goda K. Ribosominių šaperonų poreikio virusinių baltymų sintezei *Saccharomyces cerevisiae* mielėse tyrimas. Chemijos ir geomokslų fakultetas. Magistrinis darbas: Vilniaus Universitetas; 2017.
108. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. Life with 6000 genes. *Science* 1996; 274: 546, 563-547.
109. Goloubinoff P, De Los Rios P. The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. *Trends Biochem Sci* 2007; 32: 372-380.
110. Gong Y, Kakihara Y, Krogan N, Greenblatt J, Emili A, Zhang Z, Houry WA. An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. *Mol Syst Biol* 2009; 5: 275.
111. Gonzalez-Siso MI, Garcia-Leiro A, Tarrío N, Cerdan ME. Sugar metabolism, redox balance and oxidative stress response in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *Microb Cell Fact* 2009; 8: 46.
112. Goodwin EC, Lipovsky A, Inoue T, Magaldi TG, Edwards AP, Van Goor KE, Paton AW, Paton JC, Atwood WJ, Tsai B, DiMaio D. BiP and multiple DNAJ molecular chaperones in the endoplasmic reticulum are required for efficient simian virus 40 infection. *MBio* 2011; 2: e00101-00111.
113. Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, Egli A, Ramos E, Drachenberg CB, Hirsch HH. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med* 2008; 205: 841-852.
114. Gossai A, Waterboer T, Nelson HH, Michel A, Willhauck-Fleckenstein M, Farzan SF, Hoen AG, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ, Pawlita M, Karagas MR. Seroepidemiology of Human Polyomaviruses in a US Population. *Am J Epidemiol* 2016; 183: 61-69.
115. Grbavec D, Lo R, Liu Y, Greenfield A, Stifani S. Groucho/transducin-like enhancer of split (TLE) family members interact with the yeast transcriptional co-repressor SSN6 and mammalian SSN6-related proteins: implications for evolutionary conservation of transcription repression mechanisms. *Biochem J* 1999; 337 (Pt 1): 13-17.
116. Green SR, Johnson AD. Promoter-dependent roles for the Srb10 cyclin-dependent kinase and the Hda1 deacetylase in Tup1-mediated repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 4191-4202.

117. Grimminger-Marquardt V, Lashuel HA. Structure and function of the molecular chaperone Hsp104 from yeast. *Biopolymers* 2010; 93: 252-276.
118. Gross L. Attempt to recover filterable agent from x-ray induced leukemia. *Acta Haematol* 1958; 19: 353-361.
119. Guo B, Styles CA, Feng Q, Fink GR. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12158-12163.
120. Guo YH, Li YN, Zhao JR, Zhang J, Yan Z. HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics* 2011; 6: 720-726.
121. Halme A, Bumgarner S, Styles C, Fink GR. Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* 2004; 116: 405-415.
122. Hamilton RS, Gravell M, Major EO. Comparison of antibody titers determined by hemagglutination inhibition and enzyme immunoassay for JC virus and BK virus. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 105-109.
123. Harmsen MM, Bruyne MI, Raue HA, Maat J. Overexpression of binding protein and disruption of the PMR1 gene synergistically stimulate secretion of bovine prochymosin but not plant thaumatin in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 1996; 46: 365-370.
124. Hatwell JN, Sharp PM. Evolution of human polyomavirus JC. *J Gen Virol* 2000; 81: 1191-1200.
125. Hedges SB, Marin J, Suleski M, Paymer M, Kumar S. Tree of life reveals clock-like speciation and diversification. *Mol Biol Evol* 2015; 32: 835-845.
126. Helle F, Brochot E, Handala L, Martin E, Castelain S, Francois C, Duverlie G. Biology of the BKPyV: An Update. *Viruses* 2017; 9.
127. Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Frohlich KU, Wissing S, Buttner S, Fehr M, Sigrist S, Madeo F. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 2004; 164: 501-507.
128. Hershberg R, Petrov DA. Selection on codon bias. *Annu Rev Genet* 2008; 42: 287-299.
129. Hesbacher S, Pfitzer L, Wiedorfer K, Angermeyer S, Borst A, Haferkamp S, Scholz CJ, Wobser M, Schrama D, Houben R. RB1 is the crucial target of the Merkel cell polyomavirus Large T antigen in Merkel cell carcinoma cells. *Oncotarget* 2016; 7: 32956-32968.
130. Hirsch HH. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 354-360.
131. Ho J, Jedrych JJ, Feng H, Natalie AA, Grandinetti L, Mirvish E, Crespo MM, Yadav D, Fasanella KE, Proksell S, Kuan SF, Pastrana DV, Buck CB, Shuda Y, Moore PS, Chang Y. Human polyomavirus 7-associated pruritic rash and viremia in transplant recipients. *J Infect Dis* 2015; 211: 1560-1565.
132. Hodgson NC. Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J Surg Oncol* 2005; 89: 1-4.
133. Hope EA, Amorosi CJ, Miller AW, Dang K, Heil CS, Dunham MJ. Experimental Evolution Reveals Favored Adaptive Routes to Cell Aggregation in Yeast. *Genetics* 2017; 206: 1153-1167.
134. Hornikova L, Fraiberk M, Man P, Janovec V, Forstova J. VP1, the major capsid protein of the mouse polyomavirus, binds microtubules, promotes their acetylation and blocks the host cell cycle. *FEBS J* 2017; 284: 301-323.

135. Huang P, Gautschi M, Walter W, Rospert S, Craig EA. The Hsp70 Ssz1 modulates the function of the ribosome-associated J-protein Zuo1. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 497-504.
136. Hung JJ, Chung CS, Chang W. Molecular chaperone Hsp90 is important for vaccinia virus growth in cells. *J Virol* 2002; 76: 1379-1390.
137. Hurdiss DL, Morgan EL, Thompson RF, Prescott EL, Panou MM, Macdonald A, Ranson NA. New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure* 2016; 24: 528-536.
138. Idiris A, Tohda H, Kumagai H, Takegawa K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 86: 403-417.
139. Imperiale MJ, Major E.O. In *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007.
140. Imperiale MJ ME. *Fields Virology*. 2013: 1633-1661.
141. Inoue T, Tsai B. A large and intact viral particle penetrates the endoplasmic reticulum membrane to reach the cytosol. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002037.
142. Janda M, Ahlquist P. RNA-dependent replication, transcription, and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*. *Cell* 1993; 72: 961-970.
143. Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, Major EO, Ramqvist T, Norkin LC. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol* 2011; 156: 1627-1634.
144. Johne R, Muller H. Avian polyomavirus in wild birds: genome analysis of isolates from Falconiformes and Psittaciformes. *Arch Virol* 1998; 143: 1501-1512.
145. Johnston JR. *Molecular Genetics of Yeast. A Practical Approach.*: IRL Press at Oxford University Press; 1994.
146. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 1984; 39: 499-509.
147. Kang MK, Mehrazarin S, Park NH, Wang CY. Epigenetic gene regulation by histone demethylases: emerging role in oncogenesis and inflammation. *Oral Dis* 2017; 23: 709-720.
148. Karachaliou M, Waterboer T, Casabonne D, Chalkiadaki G, Roumeliotaki T, Michel A, Stiakaki E, Chatzi L, Pawlita M, Kogevinas M, de Sanjose S. The Natural History of Human Polyomaviruses and Herpesviruses in Early Life--The Rhea Birth Cohort in Greece. *Am J Epidemiol* 2016; 183: 671-679.
149. Karunanithi S, Joshi J, Chavel C, Birkaya B, Grell L, Cullen PJ. Regulation of mat responses by a differentiation MAPK pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 2012; 7: e32294.
150. Karunanithi S, Vadaie N, Chavel CA, Birkaya B, Joshi J, Grell L, Cullen PJ. Shedding of the mucin-like flocculin Flo11p reveals a new aspect of fungal adhesion regulation. *Curr Biol* 2010; 20: 1389-1395.
151. Kazem S, Lauber C, van der Meijden E, Kooijman S, Kravchenko AA, TrichSpin N, Feltkamp MC, Gorbalenya AE. Limited variation during circulation of a polyomavirus in the human population involves the COCO-VA toggling site of Middle and Alternative T-antigen(s). *Virology* 2016; 487: 129-140.
152. Kazem S, van der Meijden E, Wang RC, Rosenberg AS, Pope E, Benoit T, Fleckman P, Feltkamp MC. Polyomavirus-associated Trichodysplasia

- spinulosa involves hyperproliferation, pRB phosphorylation and upregulation of p16 and p21. *PLoS One* 2014; 9: e108947.
153. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000363.
 154. Keleher CA, Redd MJ, Schultz J, Carlson M, Johnson AD. Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 1992; 68: 709-719.
 155. Keller EX, Delbue S, Tognon M, Provenzano M. Polyomavirus BK and prostate cancer: a complex interaction of potential clinical relevance. *Rev Med Virol* 2015; 25: 366-378.
 156. Kelley WL, Georgopoulos C. The T/t common exon of simian virus 40, JC, and BK polyomavirus T antigens can functionally replace the J-domain of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3679-3684.
 157. Kenan DJ, Mieczkowski PA, Latulippe E, Cote I, Singh HK, Nickeleit V. BK Polyomavirus Genomic Integration and Large T Antigen Expression: Evolving Paradigms in Human Oncogenesis. *Am J Transplant* 2017; 17: 1674-1680.
 158. Khan ZM, Liu Y, Neu U, Gilbert M, Ehlers B, Feizi T, Stehle T. Crystallographic and glycan microarray analysis of human polyomavirus 9 VP1 identifies N-glycolyl neuraminic acid as a receptor candidate. *J Virol* 2014; 88: 6100-6111.
 159. Kim HJ, Kim HJ. Yeast as an expression system for producing virus-like particles: what factors do we need to consider? *Lett Appl Microbiol* 2017; 64: 111-123.
 160. Kim KY, Levin DE. Mpk1 MAPK association with the Paf1 complex blocks Sen1-mediated premature transcription termination. *Cell* 2011; 144: 745-756.
 161. Kliewe F, Engelhardt M, Aref R, Schuller HJ. Promoter recruitment of corepressors Sin3 and Cyc8 by activator proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 2017; 63: 739-750.
 162. Knipe DM HP. Virology. Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
 163. Knowles WA. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv Exp Med Biol* 2006; 577: 19-45.
 164. Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DW, Miller E. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol* 2003; 71: 115-123.
 165. Knowles WA, Sasnauskas K. Comparison of cell culture-grown JC virus (primary human fetal glial cells and the JCI cell line) and recombinant JCV VP1 as antigen for the detection of anti-JCV antibody by haemagglutination inhibition. *J Virol Methods* 2003; 109: 47-54.
 166. Koplín A, Preissler S, Ilina Y, Koch M, Scior A, Erhardt M, Deuerling E. A dual function for chaperones SSB-RAC and the NAC nascent polypeptide-associated complex on ribosomes. *J Cell Biol* 2010; 189: 57-68.
 167. Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, Trusch F, Hofmann J, Moens U, Sauer I, Voigt S, Schmuck R, Ehlers B. Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PLoS One* 2013; 8: e58021.
 168. Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M, Yanagawa H. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem* 2009; 284: 478-485.

169. Kubota N, Inayoshi Y, Satoh N, Fukuda T, Iwai K, Tomoda H, Kohara M, Kataoka K, Shimamoto A, Furuichi Y, Nomoto A, Naganuma A, Kuge S. HSC90 is required for nascent hepatitis C virus core protein stability in yeast cells. *FEBS Lett* 2012; 586: 2318-2325.
170. Kumar A, Kantele A, Jarvinen T, Chen T, Kavola H, Sadeghi M, Hedman K, Franssila R. Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSV) and Merkel cell polyomavirus: correlation between humoral and cellular immunity stronger with TSV. *PLoS One* 2012; 7: e45773.
171. Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* 2012; 31: 58-83.
172. Kwun HJ, Shuda M, Camacho CJ, Gamper AM, Thant M, Chang Y, Moore PS. Restricted protein phosphatase 2A targeting by Merkel cell polyomavirus small T antigen. *J Virol* 2015; 89: 4191-4200.
173. Kwun HJ, Wendzicki JA, Shuda Y, Moore PS, Chang Y. Merkel cell polyomavirus small T antigen induces genome instability by E3 ubiquitin ligase targeting. *Oncogene* 2017.
174. Lafferty SL, Fudge AM, Schmidt RE, Wilson VG, Phalen DN. Avian polyomavirus infection and disease in a green aracarid (*Pteroglossus viridis*). *Avian Dis* 1999; 43: 577-585.
175. Lauber C, Kazem S, Kravchenko AA, Feltkamp MC, Gorbalenya AE. Interspecific adaptation by binary choice at de novo polyomavirus T antigen site through accelerated codon-constrained Val-Ala toggling within an intrinsically disordered region. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: 4800-4813.
176. Lee do H, Sherman MY, Goldberg AL. The requirements of yeast Hsp70 of SSA family for the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 475: 100-106.
177. Lehn H, Muller H. Cloning and characterization of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus. *Virology* 1986; 151: 362-370.
178. Leuenberger D, Andresen PA, Gosert R, Binggeli S, Strom EH, Bodaghi S, Rinaldo CH, Hirsch HH. Human polyomavirus type 1 (BK virus) agnoprotein is abundantly expressed but immunologically ignored. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 959-968.
179. Li J, Soroka J, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochimica et biophysica acta* 2012; 1823: 624-635.
180. Li Q, Zou J, Wang M, Ding X, Chepelev I, Zhou X, Zhao W, Wei G, Cui J, Zhao K, Wang HY, Wang RF. Critical role of histone demethylase Jmjd3 in the regulation of CD4+ T-cell differentiation. *Nat Commun* 2014; 5: 5780.
181. Lilyestrom W, Klein MG, Zhang R, Joachimiak A, Chen XS. Crystal structure of SV40 large T-antigen bound to p53: interplay between a viral oncoprotein and a cellular tumor suppressor. *Genes Dev* 2006; 20: 2373-2382.
182. Lim ES, Meinerz NM, Primi B, Wang D, Garcea RL. Common exposure to STL polyomavirus during childhood. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1559-1561.
183. Lipke PN, Ovalle R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* 1998; 180: 3735-3740.
184. Literak I, Smid B, Dubska L, Bryndza L, Valicek L. An outbreak of the polyomavirus infection in budgerigars and cockatiels in Slovakia, including a genome analysis of an avian polyomavirus isolate. *Avian Dis* 2006; 50: 120-123.

185. Lopez-Bueno A, Mavian C, Labella AM, Castro D, Borrego JJ, Alcamí A, Alejo A. Concurrence of Iridovirus, Polyomavirus, and a Unique Member of a New Group of Fish Papillomaviruses in Lymphocystis Disease-Affected Gilthead Sea Bream. *J Virol* 2016; 90: 8768-8779.
186. Lundstig A, Dillner J. Serological diagnosis of human polyomavirus infection. *Adv Exp Med Biol* 2006; 577: 96-101.
187. Lunsdorf H, Gurramkonda C, Adnan A, Khanna N, Rinas U. Virus-like particle production with yeast: ultrastructural and immunocytochemical insights into *Pichia pastoris* producing high levels of the hepatitis B surface antigen. *Microb Cell Fact* 2011; 10: 48.
188. Mach H, Volkin DB, Troutman RD, Wang B, Luo Z, Jansen KU, Shi L. Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs). *J Pharm Sci* 2006; 95: 2195-2206.
189. Madinda NF, Ehlers B, Wertheim JO, Akoua-Koffi C, Bergl RA, Boesch C, Akonkwa DB, Eckardt W, Fruth B, Gillespie TR, Gray M, Hohmann G, Karhemere S, Kujirakwinja D, Langergraber K, Muyembe JJ, Nishuli R, Pauly M, Petrzalkova KJ, Robbins MM, Todd A, Schubert G, Stoinski TS, Wittig RM, Zuberbuhler K, Peeters M, Leendertz FH, Calvignac-Spencer S. Assessing Host-Virus Codivergence for Close Relatives of Merkel Cell Polyomavirus Infecting African Great Apes. *J Virol* 2016; 90: 8531-8541.
190. Magnuson B, Rainey EK, Benjamin T, Baryshev M, Mkrtchian S, Tsai B. ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol Cell* 2005; 20: 289-300.
191. Major EO, Neel JV. The JC and BK human polyoma viruses appear to be recent introductions to some South American Indian tribes: there is no serological evidence of cross-reactivity with the simian polyoma virus SV40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15525-15530.
192. Malanchi I, Accardi R, Diehl F, Smet A, Androphy E, Hoheisel J, Tommasino M. Human papillomavirus type 16 E6 promotes retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle progression. *J Virol* 2004; 78: 13769-13778.
193. Malave TM, Dent SY. Transcriptional repression by Tup1-Ssn6. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 437-443.
194. Masek T, Vopalensky V, Horvath O, Vortelova L, Feketova Z, Pospisek M. Hepatitis C virus internal ribosome entry site initiates protein synthesis at the authentic initiation codon in yeast. *J Gen Virol* 2007; 88: 1992-2002.
195. Matthews MR, Wang RC, Reddick RL, Saldivar VA, Browning JC. Viral-associated trichodysplasia spinulosa: a case with electron microscopic and molecular detection of the trichodysplasia spinulosa-associated human polyomavirus. *J Cutan Pathol* 2011; 38: 420-431.
196. Mayer MP. Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2005; 153: 1-46.
197. Moens U, Calvignac-Spencer S, Lauber C, Ramqvist T, Feltkamp MCW, Daugherty MD, Verschoor EJ, Ehlers B, Ictv Report C. ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *J Gen Virol* 2017; 98: 1159-1160.
198. Moens U, Krumbholz A, Ehlers B, Zell R, Johne R, Calvignac-Spencer S, Lauber C. Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infect Genet Evol* 2017; 54: 18-38.
199. Moens U, Van Ghelue M, Song X, Ehlers B. Serological cross-reactivity between human polyomaviruses. *Rev Med Virol* 2013; 23: 250-264.

200. Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2012; 190: 1157-1195.
201. Mukai H, Shuntoh H, Chang CD, Asami M, Ueno M, Suzuki K, Kuno T. Isolation and characterization of CAJ1, a novel yeast homolog of dnaJ. *Gene* 1994; 145: 125-127.
202. Munoz LJ, Ludena D, Gedvilaite A, Zvirbliene A, Jandrig B, Voronkova T, Ulrich RG, Lopez DE. Lymphoma outbreak in a GASH:Sal hamster colony. *Arch Virol* 2013; 158: 2255-2265.
203. Nainys J, Timinskas A, Schneider J, Ulrich RG, Gedvilaite A. Identification of Two Novel Members of the Tentative Genus Wukipolyomavirus in Wild Rodents. *PLoS One* 2015; 10: e0140916.
204. Nakanishi A, Clever J, Yamada M, Li PP, Kasamatsu H. Association with capsid proteins promotes nuclear targeting of simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 96-100.
205. Neske F, Prifert C, Scheiner B, Ewald M, Schubert J, Opitz A, Weissbrich B. High prevalence of antibodies against polyomavirus WU, polyomavirus KI, and human bocavirus in German blood donors. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 215.
206. Neu U, Hengel H, Blaum BS, Schowalter RM, Macejak D, Gilbert M, Wakarchuk WW, Imamura A, Ando H, Kiso M, Arnberg N, Garcea RL, Peters T, Buck CB, Stehle T. Structures of Merkel cell polyomavirus VP1 complexes define a sialic acid binding site required for infection. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002738.
207. Neu U, Wang J, Macejak D, Garcea RL, Stehle T. Structures of the major capsid proteins of the human Karolinska Institutet and Washington University polyomaviruses. *J Virol* 2011; 85: 7384-7392.
208. Neu U, Woellner K, Gauglitz G, Stehle T. Structural basis of GM1 ganglioside recognition by simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5219-5224.
209. Nguyen KD, Lee EE, Yue Y, Stork J, Pock L, North JP, Vandergriff T, Cockerell C, Hosler GA, Pastrana DV, Buck CB, Wang RC. Human polyomavirus 6 and 7 are associated with pruritic and dyskeratotic dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 2017; 76: 932-940 e933.
210. Nguyen NL, Le BM, Wang D. Serologic evidence of frequent human infection with WU and KI polyomaviruses. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1199-1205.
211. Nicol JT, Leblond V, Arnold F, Guerra G, Mazzoni E, Tognon M, Coursaget P, Touze A. Seroprevalence of human Malawi polyomavirus. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 321-323.
212. Nicol JT, Robinot R, Carpentier A, Carandina G, Mazzoni E, Tognon M, Touze A, Coursaget P. Age-specific seroprevalences of merkel cell polyomavirus, human polyomaviruses 6, 7, and 9, and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20: 363-368.
213. Nicol JT, Touze A, Robinot R, Arnold F, Mazzoni E, Tognon M, Coursaget P. Seroprevalence and cross-reactivity of human polyomavirus 9. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1329-1332.
214. Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered* 2013; 4: 207-211.
215. Nijwening JH, Geutjes EJ, Bernardis R, Beijersbergen RL. The histone demethylase Jarid1b (Kdm5b) is a novel component of the Rb pathway and associates with E2f-target genes in MEFs during senescence. *PLoS One* 2011; 6: e25235.

216. Nilsson J, Miyazaki N, Xing L, Wu B, Hammar L, Li TC, Takeda N, Miyamura T, Cheng RH. Structure and assembly of a T=1 virus-like particle in BK polyomavirus. *J Virol* 2005; 79: 5337-5345.
217. Norkiene M, Gedvilaite A. Influence of codon bias on heterologous production of human papillomavirus type 16 major structural protein L1 in yeast. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012: 979218.
218. Norkiene M, Stonyte J, Ziogiene D, Mazeike E, Sasnauskas K, Gedvilaite A. Production of recombinant VP1-derived virus-like particles from novel human polyomaviruses in yeast. *BMC Biotechnol* 2015; 15: 68.
219. Norkin LC, Anderson HA, Wolfrom SA, Oppenheim A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol* 2002; 76: 5156-5166.
220. O'Hara SD, Stehle T, Garcea R. Glycan receptors of the Polyomaviridae: structure, function, and pathogenesis. *Curr Opin Virol* 2014; 7: 73-78.
221. Ou WC, Wang M, Fung CY, Tsai RT, Chao PC, Hseu TH, Chang D. The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in *Escherichia coli* is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells. *J Gen Virol* 1999; 80 (Pt 1): 39-46.
222. Palkova Z, Adamec T, Liebl D, Stokrova J, Forstova J. Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Lett* 2000; 478: 281-289.
223. Palotai R, Szalay MS, Csermely P. Chaperones as integrators of cellular networks: changes of cellular integrity in stress and diseases. *IUBMB Life* 2008; 60: 10-18.
224. Panavas T, Nagy PD. Yeast as a model host to study replication and recombination of defective interfering RNA of Tomato bushy stunt virus. *Virology* 2003; 314: 315-325.
225. Panavas T, Nagy PD. Mechanism of stimulation of plus-strand synthesis by an RNA replication enhancer in a tombusvirus. *J Virol* 2005; 79: 9777-9785.
226. Pastrana DV, Tolstov YL, Becker JC, Moore PS, Chang Y, Buck CB. Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000578.
227. Patel BK, Gavin-Smyth J, Liebman SW. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 344-349.
228. Pederagnana V, Martel-Jantin C, Nicol JTJ, Leblond V, Tortevoeye P, Coursaget P, Touze A, Abel L, Gessain A. Trichodysplasia Spinulosa Polyomavirus Infection Occurs during Early Childhood with Intrafamilial Transmission, Especially from Mother to Child. *J Invest Dermatol* 2017; 137: 1181-1183.
229. Peisker K, Chiabudini M, Rospert S. The ribosome-bound Hsp70 homolog Ssb of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 2010; 1803: 662-672.
230. Peretti A, FitzGerald PC, Bliskovsky V, Pastrana DV, Buck CB. Genome Sequence of a Fish-Associated Polyomavirus, Black Sea Bass (*Centropristis striata*) Polyomavirus 1. *Genome Announc* 2015; 3.
231. Perrod S, Gasser SM. Long-range silencing and position effects at telomeres and centromeres: parallels and differences. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 2303-2318.

232. Phalen DN, Radabaugh CS, Dahlhausen RD, Styles DK. Viremia, virus shedding, and antibody response during natural avian polyomavirus infection in parrots. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217: 32-36.
233. Polyomaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of V, Calvignac-Spencer S, Feltkamp MC, Daugherty MD, Moens U, Ramqvist T, Johne R, Ehlers B. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch Virol* 2016; 161: 1739-1750.
234. Preissler S, Deuerling E. Ribosome-associated chaperones as key players in proteostasis. *Trends Biochem Sci* 2012; 37: 274-283.
235. Price BD, Rueckert RR, Ahlquist P. Complete replication of an animal virus and maintenance of expression vectors derived from it in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9465-9470.
236. Qian M, Cai D, Verhey KJ, Tsai B. A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000465.
237. Raghavan V, Malik PS, Choudhury NR, Mukherjee SK. The DNA-A component of a plant geminivirus (Indian mung bean yellow mosaic virus) replicates in budding yeast cells. *J Virol* 2004; 78: 2405-2413.
238. Ramamoorthy S, Devaraj B, Miyai K, Luo L, Liu YT, Boland CR, Goel A, Carethers JM. John Cunningham virus T-antigen expression in anal carcinoma. *Cancer* 2011; 117: 2379-2385.
239. Randhawa P, Viscidi R, Carter JJ, Galloway DA, Culp TD, Huang C, Ramaswami B, Christensen ND. Identification of species-specific and cross-reactive epitopes in human polyomavirus capsids using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 2009; 90: 634-639.
240. Rausch JW, Miller JT, Le Grice SF. Reverse Transcription in the *Saccharomyces cerevisiae* Long-Terminal Repeat Retrotransposon Ty3. *Viruses* 2017; 9.
241. Ravindran MS, Bagchi P, Inoue T, Tsai B. A Non-enveloped Virus Hijacks Host Disaggregation Machinery to Translocate across the Endoplasmic Reticulum Membrane. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1005086.
242. Rayment I, Baker TS, Caspar DL, Murakami WT. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 1982; 295: 110-115.
243. Rennspiess D, Pujari S, Keijzers M, Abdul-Hamid MA, Hochstenbag M, Dingemans AM, Kurz AK, Speel EJ, Haugg A, Pastrana DV, Buck CB, De Baets MH, Zur Hausen A. Detection of human polyomavirus 7 in human thymic epithelial tumors. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 360-366.
244. Rigatti LH, Toptan T, Newsome JT, Moore PS, Chang Y. Identification and Characterization of Novel Rat Polyomavirus 2 in a Colony of X-SCID Rats by P-PIT assay. *mSphere* 2016; 1.
245. Rodriguez-Limas WA, Tyo KE, Nielsen J, Ramirez OT, Palomares LA. Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 2011; 10: 33.
246. Roohvand F, Shokri M, Abdollahpour-Alitappeh M, Ehsani P. Biomedical applications of yeast- a patent view, part one: yeasts as workhorses for the production of therapeutics and vaccines. *Expert Opin Ther Pat* 2017; 27: 929-951.
247. Rubino L, Navarro B, Russo M. Cymbidium ring spot virus defective interfering RNA replication in yeast cells occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes in the absence of peroxisomes. *J Gen Virol* 2007; 88: 1634-1642.

248. Russell I SG, Reader HP, Johnston JR, Martin PA. Revised nomenclature of genes that control yeast flocculation. *J Inst Brew* 1980; 86: 120-121.
249. Saarikangas J, Caudron F, Prasad R, Moreno DF, Bolognesi A, Aldea M, Barral Y. Compartmentalization of ER-Bound Chaperone Confines Protein Deposit Formation to the Aging Yeast Cell. *Curr Biol* 2017; 27: 773-783.
250. Saccardo P, Rodriguez-Carmona E, Villaverde A, Ferrer-Miralles N. Effect of the DnaK chaperone on the conformational quality of JCV VP1 virus-like particles produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 2014; 30: 744-748.
251. Sakuragi S, Goto T, Sano K, Morikawa Y. HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 7956-7961.
252. Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 1986; 46: 895-904.
253. Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL. Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys J* 1989; 56: 887-900.
254. Sambrook JaR, D. W. Molecular Cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
255. Saribas AS, Coric P, Hamazaspyan A, Davis W, Axman R, White MK, Abou-Gharbia M, Childers W, Condra JH, Bouaziz S, Safak M. Emerging From the Unknown: Structural and Functional Features of Agnoprotein of Polyomaviruses. *J Cell Physiol* 2016; 231: 2115-2127.
256. Sasnauskas K, Bulavaite A, Hale A, Jin L, Knowles WA, Gedvilaite A, Dargeviciute A, Bartkeviciute D, Zvirbliene A, Staniulis J, Brown DW, Ulrich R. Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Intervirology* 2002; 45: 308-317.
257. Sasnauskas K, Jomantiene R, Januska A, Lebediene E, Lebedys J, Janulaitis A. Cloning and analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1992; 122: 207-211.
258. Schelhaas M, Malmstrom J, Pelkmans L, Haugstetter J, Ellgaard L, Grunewald K, Helenius A. Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* 2007; 131: 516-529.
259. Schlegel R, Benjamin TL. Cellular alterations dependent upon the polyoma virus Hr-t function: separation of mitogenic from transforming capacities. *Cell* 1978; 14: 587-599.
260. Schultz J, Marshall-Carlson L, Carlson M. The N-terminal TPR region is the functional domain of SSN6, a nuclear phosphoprotein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4744-4756.
261. Scuda N, Madinda NF, Akoua-Koffi C, Adjogoua EV, Wevers D, Hofmann J, Cameron KN, Leendertz SA, Couacy-Hymann E, Robbins M, Boesch C, Jarvis MA, Moens U, Mugisha L, Calvignac-Spencer S, Leendertz FH, Ehlers B. Novel polyomaviruses of nonhuman primates: genetic and serological predictors for the existence of multiple unknown polyomaviruses within the human population. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003429.
262. Seth P, Diaz F, Tao-Cheng JH, Major EO. JC virus induces nonapoptotic cell death of human central nervous system progenitor cell-derived astrocytes. *J Virol* 2004; 78: 4884-4891.
263. Shah K, Nathanson N. Human exposure to SV40: review and comment. *Am J Epidemiol* 1976; 103: 1-12.

264. Sharp PM, Simmonds P. Evaluating the evidence for virus/host co-evolution. *Curr Opin Virol* 2011; 1: 436-441.
265. Shen PS, Enderlein D, Nelson CD, Carter WS, Kawano M, Xing L, Swenson RD, Olson NH, Baker TS, Cheng RH, Atwood WJ, Johne R, Belnap DM. The structure of avian polyomavirus reveals variably sized capsids, non-conserved inter-capsomere interactions, and a possible location of the minor capsid protein VP4. *Virology* 2011; 411: 142-152.
266. Shim HY, Quan X, Yi YS, Jung G. Heat shock protein 90 facilitates formation of the HBV capsid via interacting with the HBV core protein dimers. *Virology* 2011; 410: 161-169.
267. Shouval D. Hepatitis B vaccines. *J Hepatol* 2003; 39 Suppl 1: S70-76.
268. Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, Moore PS, Chang Y. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 16272-16277.
269. Siebrasse EA, Nguyen NL, Willby MJ, Erdman DD, Menegus MA, Wang D. Multiorgan WU Polyomavirus Infection in Bone Marrow Transplant Recipient. *Emerg Infect Dis* 2016; 22: 24-31.
270. Siebrasse EA, Pastrana DV, Nguyen NL, Wang A, Roth MJ, Holland SM, Freeman AF, McDyer J, Buck CB, Wang D. WU polyomavirus in respiratory epithelial cells from lung transplant patient with Job syndrome. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 103-106.
271. Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JI, Wang D. Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *J Virol* 2012; 86: 10321-10326.
272. Sieiro C, Reboredo NM, Blanco P, Villa TG. Cloning of a new FLO gene from the flocculating *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b strain. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 146: 109-115.
273. Simon C, Klose T, Herbst S, Han BG, Sinz A, Glaeser RM, Stubbs MT, Lilie H. Disulfide linkage and structure of highly stable yeast-derived virus-like particles of murine polyomavirus. *J Biol Chem* 2014; 289: 10411-10418.
274. Singh RS, Bhari R, Kaur HP. Characteristics of yeast lectins and their role in cell-cell interactions. *Biotechnol Adv* 2011; 29: 726-731.
275. Siqueira JD, Ng TF, Miller M, Li L, Deng X, Dodd E, Batac F, Delwart E. Endemic Infection of Stranded Southern Sea Otters (*Enhydra lutris nereis*) with Novel Parvovirus, Polyomavirus, and Adenovirus. *J Wildl Dis* 2017; 53: 532-542.
276. Siray H, Ozel M, Jandrig B, Voronkova T, Jia W, Zocher R, Arnold W, Scherneck S, Kruger DH, Ulrich R. Capsid protein-encoding genes of hamster polyomavirus and properties of the viral capsid. *Virus Genes* 1999; 18: 39-47.
277. Slibinskas R, Samuel D, Gedvilaite A, Staniulis J, Sasnauskas K. Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 2004; 107: 115-124.
278. Smith RA, Duncan MJ, Moir DT. Heterologous protein secretion from yeast. *Science* 1985; 229: 1219-1224.
279. Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C, Vinces MD, Jansen A, Prevost MC, Latge JP, Fink GR, Foster KR, Verstrepen KJ. FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell* 2008; 135: 726-737.
280. Sroller V, Hamsikova E, Ludvikova V, Musil J, Nemeckova S, Salakova M. Seroprevalence rates of HPyV6, HPyV7, TSPyV, HPyV9, MWPyV and

- KIPyV polyomaviruses among the healthy blood donors. *J Med Virol* 2016; 88: 1254-1261.
281. Stehle T, Harrison SC. Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 1996; 4: 183-194.
 282. Stehle T, Harrison SC. High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J* 1997; 16: 5139-5148.
 283. Stehle T, Yan Y, Benjamin TL, Harrison SC. Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* 1994; 369: 160-163.
 284. Stewart SE, Eddy BE, Borgese N. Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J Natl Cancer Inst* 1958; 20: 1223-1243.
 285. Stratford M. Yeast flocculation: receptor definition by mnn mutants and concanavalin A. *Yeast* 1992; 8: 635-645.
 286. Stratford M. Lectin-mediated aggregation of yeasts--yeast flocculation. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1992; 10: 283-341.
 287. Strittmatter AW, Fischer C, Kleinschmidt M, Braus GH. FLO11 mediated filamentous growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends on the expression of the ribosomal RPS26 genes. *Mol Genet Genomics* 2006; 276: 113-125.
 288. Stroh LJ, Neu U, Blaum BS, Buch MH, Garcea RL, Stehle T. Structure analysis of the major capsid proteins of human polyomaviruses 6 and 7 reveals an obstructed sialic acid binding site. *J Virol* 2014; 88: 10831-10839.
 289. Stutz F, Kantor J, Zhang D, McCarthy T, Neville M, Rosbash M. The yeast nucleoporin rip1p contributes to multiple export pathways with no essential role for its FG-repeat region. *Genes Dev* 1997; 11: 2857-2868.
 290. Stutz F, Rosbash M. A functional interaction between Rev and yeast pre-mRNA is related to splicing complex formation. *EMBO J* 1994; 13: 4096-4104.
 291. Sugiyama KI, Furusawa H, Gruz P, Honma M. Detection of epigenetic mutagens including anthracene-derived compounds using yeast FLO1 promoter GFP reporter gene assay. *Mutagenesis* 2017.
 292. Sullivan CS, Pipas JM. T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 179-202.
 293. Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000801.
 294. Sweet BH, Hilleman MR. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960; 105: 420-427.
 295. Takemoto KK, Segawa K. A new monkey lymphotropic papovavirus: characterization of the virus and evidence of a related virus in humans. *Prog Clin Biol Res* 1983; 105: 87-96.
 296. Teunissen AW, Holub E, van der Hucht J, van den Berg JA, Steensma HY. Sequence of the open reading frame of the FLO1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1993; 9: 423-427.
 297. Teunissen AW, Steensma HY. Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* 1995; 11: 1001-1013.

298. Teunissen AW, van den Berg JA, Steensma HY. Physical localization of the flocculation gene FLO1 on chromosome I of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1993; 9: 1-10.
299. Teunissen EA, de Raad M, Mastrobattista E. Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses. *J Control Release* 2013; 172: 305-321.
300. Tolstov YL, Pastrana DV, Feng H, Becker JC, Jenkins FJ, Moschos S, Chang Y, Buck CB, Moore PS. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int J Cancer* 2009; 125: 1250-1256.
301. Toptan T, Yousem SA, Ho J, Matsushima Y, Stabile LP, Fernandez-Figueras MT, Bhargava R, Ryo A, Moore PS, Chang Y. Survey for human polyomaviruses in cancer. *JCI Insight* 2016; 1.
302. Touze A, Gaitan J, Arnold F, Cazal R, Fleury MJ, Combelas N, Sizaret PY, Guyetant S, Maruani A, Baay M, Tognon M, Coursaget P. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1767-1770.
303. Tremolada S, Delbue S, Larocca S, Carloni C, Elia F, Khalili K, Gordon J, Ferrante P. Polymorphisms of the BK virus subtypes and their influence on viral in vitro growth efficiency. *Virus Res* 2010; 149: 190-196.
304. Trusch F, Klein M, Finsterbusch T, Kuhn J, Hofmann J, Ehlers B. Seroprevalence of human polyomavirus 9 and cross-reactivity to African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Gen Virol* 2012; 93: 698-705.
305. Tuck AC, Tollervey D. An RNA reset button. *Mol Cell* 2012; 45: 435-436.
306. Tzamarias D, Struhl K. Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev* 1995; 9: 821-831.
307. Uchida C. Roles of pRB in the Regulation of Nucleosome and Chromatin Structures. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 5959721.
308. Upadhyaya B, Manjunath R. Baker's yeast expressing the Japanese encephalitis virus envelope protein on its cell surface: induction of an antigen-specific but non-neutralizing antibody response. *Yeast* 2009; 26: 383-397.
309. Valaviciute M, Norkiene M, Goda K, Slibinskas R, Gedvilaite A. Survey of molecular chaperone requirement for the biosynthesis of hamster polyomavirus VP1 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Virol* 2016; 161: 1807-1819.
310. van der Meijden E, Bialasiewicz S, Rockett RJ, Tozer SJ, Sloots TP, Feltkamp MC. Different serologic behavior of MCPyV, TSPyV, HPyV6, HPyV7 and HPyV9 polyomaviruses found on the skin. *PLoS One* 2013; 8: e81078.
311. van der Meijden E, Horvath B, Nijland M, de Vries K, Racz EK, Diercks GF, de Weerd AE, Claahsen-van Groningen MC, van der Blij-de Brouwer CS, van der Zon AJ, Kroes ACM, Hedman K, van Kampen JJA, Riezebos-Brilman A, Feltkamp MCW. Primary Polyomavirus Infection, Not Reactivation, as the Cause of Trichodysplasia Spinulosa in Immunocompromised Patients. *J Infect Dis* 2017; 215: 1080-1084.
312. van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1001024.

313. van der Meijden E, Kazem S, Burgers MM, Janssens R, Bouwes Bavinck JN, de Melker H, Feltkamp MC. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1355-1363.
314. Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *J Biotechnol* 2001; 88: 21-35.
315. Ventoso I, Navarro J, Munoz MA, Carrasco L. Involvement of HIV-1 protease in virus-induced cell killing. *Antiviral Res* 2005; 66: 47-55.
316. Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, Delvaux FR. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 61: 197-205.
317. Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* 2006; 60: 5-15.
318. Viscidi RP, Clayman B. Serological cross reactivity between polyomavirus capsids. *Adv Exp Med Biol* 2006; 577: 73-84.
319. Viscidi RP, Rollison DE, Viscidi E, Clayman B, Rubalcaba E, Daniel R, Major EO, Shah KV. Serological cross-reactivities between antibodies to simian virus 40, BK virus, and JC virus assessed by virus-like-particle-based enzyme immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10: 278-285.
320. Voronkova T, Kazaks A, Ose V, Ozel M, Scherneck S, Pumpens P, Ulrich R. Hamster polyomavirus-derived virus-like particles are able to transfer in vitro encapsidated plasmid DNA to mammalian cells. *Virus Genes* 2007; 34: 303-314.
321. Voynov V, Verstrepen KJ, Jansen A, Runner VM, Buratowski S, Fink GR. Genes with internal repeats require the THO complex for transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 14423-14428.
322. Walczak CP, Ravindran MS, Inoue T, Tsai B. A cytosolic chaperone complexes with dynamic membrane J-proteins and mobilizes a nonenveloped virus out of the endoplasmic reticulum. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004007.
323. Walker JM. The Protein Protocols, Handbook. New Jersey: Humana Press; 2002.
324. Walsh D, Mathews MB, Mohr I. Tinkering with translation: protein synthesis in virus-infected cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a012351.
325. Walsh P, Bursac D, Law YC, Cyr D, Lithgow T. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep* 2004; 5: 567-571.
326. Wang T, Yu B, Lin L, Zhai X, Han Y, Qin Y, Guo Z, Wu S, Zhong X, Wang Y, Tong L, Zhang F, Si X, Zhao W, Zhong Z. A functional nuclear localization sequence in the VP1 capsid protein of coxsackievirus B3. *Virology* 2012; 433: 513-521.
327. Watari J, Takata Y, Ogawa M, Sahara H, Koshino S, Onnela ML, Airaksinen U, Jaatinen R, Penttila M, Keranen S. Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene FLO1. *Yeast* 1994; 10: 211-225.
328. Weeks SA, Shield WP, Sahi C, Craig EA, Rospert S, Miller DJ. A targeted analysis of cellular chaperones reveals contrasting roles for heat shock protein 70 in flock house virus RNA replication. *J Virol* 2010; 84: 330-339.
329. Welsch S, Muller B, Krausslich HG. More than one door - Budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Lett* 2007; 581: 2089-2097.

330. Werner-Washburne M, Stone DE, Craig EA. Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2568-2577.
331. Wiedinger K, Bitsaktsis C, Chang S. Reactivation of human polyomaviruses in immunocompromised states. *J Neurovirol* 2014; 20: 1-8.
332. Wolf JJ, Dowell RD, Mahony S, Rabani M, Gifford DK, Fink GR. Feed-forward regulation of a cell fate determinant by an RNA-binding protein generates asymmetry in yeast. *Genetics* 2010; 185: 513-522.
333. Wong KH, Struhl K. The Cyc8-Tup1 complex inhibits transcription primarily by masking the activation domain of the recruiting protein. *Genes Dev* 2011; 25: 2525-2539.
334. Xu EY, Zawadzki KA, Broach JR. Single-cell observations reveal intermediate transcriptional silencing states. *Mol Cell* 2006; 23: 219-229.
335. Zahid M, Lunsdorf H, Rinas U. Assessing stability and assembly of the hepatitis B surface antigen into virus-like particles during down-stream processing. *Vaccine* 2015; 33: 3739-3745.
336. Zhang Y, Ma C, Yuan Y, Zhu J, Li N, Chen C, Wu S, Yu L, Lei J, Gao N. Structural basis for interaction of a cotranslational chaperone with the eukaryotic ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 2014; 21: 1042-1046.
337. Zhao KN, Frazer IH. Replication of bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) DNA in *Saccharomyces cerevisiae* following infection with BPV-1 virions. *J Virol* 2002; 76: 3359-3364.
338. Zhao L, Zhang Y, Gao Y, Geng P, Lu Y, Liu X, Yao R, Hou P, Liu D, Lu J, Huang B. JMJD3 promotes SAHF formation in senescent WI38 cells by triggering an interplay between demethylation and phosphorylation of RB protein. *Cell Death Differ* 2015; 22: 1630-1640.
339. Zhao RY. Yeast for virus research. *Microb Cell* 2017; 4: 311-330.
340. Zhao RY, Elder RT. Viral infections and cell cycle G2/M regulation. *Cell Res* 2005; 15: 143-149.
341. Zielonka A, Gedvilaite A, Reetz J, Rosler U, Muller H, Johne R. Serological cross-reactions between four polyomaviruses of birds using virus-like particles expressed in yeast. *J Gen Virol* 2012; 93: 2658-2667.
342. Zielonka A, Gedvilaite A, Ulrich R, Luschow D, Sasnauskas K, Muller H, Johne R. Generation of virus-like particles consisting of the major capsid protein VP1 of goose hemorrhagic polyomavirus and their application in serological tests. *Virus Res* 2006; 120: 128-137.
343. Zvirbliene A, Kucinskaite I, Sezaite I, Samuel D, Sasnauskas K. Mapping of B cell epitopes in measles virus nucleocapsid protein. *Arch Virol* 2007; 152: 25-39.
344. Zvirbliene A, Samonskyte L, Gedvilaite A, Voronkova T, Ulrich R, Sasnauskas K. Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles. *J Immunol Methods* 2006; 311: 57-70.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo vadovei Dr. Almai Gedvilaitei už įdomų tyrimų objektą, idėjas, perduotą patirtį, galimybę atlikti šį darbą ir neišmatuojamą indėlį ruošiant disertaciją. Taip pat dėkoju Biotechnologijos instituto EGIS darbuotojams už patarimus ir gerą atmosferą.

Ypatingai dėkoju Monikai Valavičiūtei už jos neišsemiamą pagalbą analizuojant mielių kolekciją bei Dr. Danguolei Žiogienei už palaikymą ir patarimus.

Studentams Juozui Nainiui, Karoliui Godai, Jomantei Stonytei ir Emilijai Vasiliūnaitei už produktyvų darbą drauge ir gerą nuotaiką.

Biotechnologijos instituto ILBS kolektyvui dėkoju už didelius kiekius įvairiausių antikūnų, ypač skyriaus vadovei Prof. Dr. Aurelijai Žvirblienei už vertingas pastabas, bei Dr. Indrei Kučinskaitei-Kodzei už konsultacijas.

Dr. Albertui Timinskui dėkoju už APyV VP1 tretinės struktūros modelį.

Ačiū šeimai ir draugams už paramą ir kantrybę.