



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Vilius Tarutis

**Naujo poliomos viruso, pasižyminčio nekanonine genomo
organizacija, įvairovės ir struktūrinių baltymų gebėjimo susirinkti į
virusus panašias daleles tyrimas**

Magistro baigiamasis darbas

Molekulinės biologijos studijų programa

Darbo vadovė

Dr. Milda Norkienė

Konsultantės

J. m. d. Emilija Vasiliūnaitė

Habil. Dr. Alma Gedvilaitė

Darbas atliktas

GMC Biotechnologijos instituto Eukariotų genų
inžinerijos skyriuje

Vilnius 2025

Turinys

Santrumpos.....	4
Įvadas.....	6
1. Literatūros apžvalga	8
1.1 Poliomos virusai	8
1.2 Poliomos virusų genomo organizacija, genai ir jų koduojamų baltymų funkcijos	9
1.3 Poliomos virusų viriono struktūra ir sąveikos kapsidėje.....	18
1.4 Poliomos virusų taksonomija	22
1.5 Poliomos virusų infekcinis ciklas	24
1.6 Poliomos virusų plitimo keliai, organų tropizmas ir sukeltos ligos	27
1.7 Poliomos virusų kilmė ir filogenezę.....	29
1.8 Poliomos virusų evoliucijos modelis.....	31
1.9 Poliomos virusų serologiniai tyrimai	34
1.10 Į poliomos virusus panašių dalelių sintezė	36
2. Medžiagos ir metodai	39
2.1 Bioinformatinė analizė	39
2.2 Bakterijų ir mielių kamienai.....	39
2.3 Plazmidės.....	40
2.4 Plazmidžių konstravimas.....	40
2.5 Diagnostinė PGR AagraPyV paplitimo nustatymui	43
2.6 Plazmidinių vektorių transformacija į kompetentines <i>S. cerevisiae</i> mielių ląsteles.....	43
2.7 <i>S. cerevisiae</i> mielių auginimas ir rekombinantinių poliomos virusų baltymų raiškos indukcija 44	
2.8 <i>S. cerevisiae</i> mielių ląstelių lizatų mėginių paruošimas.....	45
2.9 Į virusus panašių dalelių gryninimas naudojant jodiksanolio tankio gradientą.....	47
2.10 Baltymų elektroforezė natrio dodecil sulfato-poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis.....	48
3. Rezultatai	49
3.1 AagraPyV paplitimas Apodemus agrarius pelėse	49
3.2 AagraPyV genomo sekų analizė.....	50
3.3 AagraPyV VP1-Pilnas1 ORF ir jo prognozuotų splaisingo variantų koduojamų baltymų susirinkimo į VPD tyrimas.....	55
3.3.1 Potencialių AagraPyV VP1-Pilnas1 ORF splaisingo variantų nustatymas.....	55
3.3.2 VP1-Pilnas1 ORF ir jo prognozuotų splaisingo variantų raiškos vektorių konstravimas.....	57
3.3.3 VP1-Pilnas1 ORF ir jo prognozuotų splaisingo variantų koduojamų baltymų raiškos ir susirinkimo į VPD įvertinimas.....	58

3.4 VP1-930 variantu ko-raiřkos su kitais poliomos virusų baltymais ir susirinkimo į VPD tyrimas	62
3.4.1 VP1-930 variantu ir kitų poliomos virusų baltymus koduojančių ORF ko-raiřkos vektorių konstravimas.....	62
3.4.2 VP1-930 variantu ko-raiřkos su kitais poliomos virusų baltymais ir susirinkimo į VPD tyrimas	63
4. Rezultatų aptarimas	66
Iřvados.....	72
SANTRAUKA	73
ABSTRACT	74
Padėka	75
Literatūros sąrašas	76
Priedai.....	95

Santrumpos

AagraPyV – *Apodemus agrarius* pelių poliomos virusas

AagraPyV-ref – Pirmoji *A. agrarius* pelių inkstų mėginiuose nustatyta AagraPyV seka

ALTO – Alternatyvus didžiojo T antigeno ORF (angl. *Alternative Large Tumor ORF*)

APyV – Paukščių poliomos virusas (angl. *Avian Polyomavirus*)

Aps./min. – Apsisukimai per minutę

Ar. – Aminorūgštys

BKPyV – BK poliomos virusas (angl. *BK Polyomavirus*)

CglPyV – *Clethrionomys glareolus* rudojo pelėno poliomos virusas

CscPyV – *Apodemus sylvaticus* pelių metagenominių mėginių sekoskaitos duomenyse aptikta PyV seka

EGIS – Eukariotų genų inžinerijos skyrius

ET – Endoplazminis tinklas

HPyV – Žmogaus poliomos virusai (angl. *Human Polyomaviruses*)

ICTV – Tarptautinis Virusų Taksonomijos Komitetas (angl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*)

JCPyV – JC poliomos virusas (angl. *John Cunningham Polyomavirus*)

LTA_g – Didysis T antigenas (angl. *Large Tumor Antigen*)

MarPyV2 – *Microtus arvalis* paprastojo pelėno poliomos virusas 2

MCPyV – Merkelio ląstelių poliomos virusas (angl. *Merkel Cell Polyomavirus*)

MPyV – Pelių poliomos virusas (angl. *Murine polyomavirus*)

MTA_g – Vidurinis T antigenas (angl. *Middle Tumour Antigen*)

NDS-PAGE – Baltymų elektroforezė natrio dodecil sulfato-poliakrilamidiniame gelyje

NGO – Nekanoninė genomo organizacija

NLS – Nukreipimo į branduolį signalinė seka (angl. *Nuclear Localization Sequence*)

OBD – Replikacijos pradžios surišimo domenai (angl. *Origin-Binding Domain*)

ORF – Atviro skaitymo rėmelis (angl. *Open Reading Frame*)

PyV – Poliomos virusai (angl. *Polyomaviruses*)

PmoPyV – *Prunella modularis* erškėtžvirblio metagenominių mėginių sekoskaitos duomenyse aptikta PyV seka

PV – Papilomos virusai (angl. *Papillomaviruses*)

Rb – Retinoblastomos baltymas

RE – Restrikcijos endonukleazė

sTA_g – Mažasis T antigenas (angl. *small Tumor Antigen*)

SV40 – Beždžionių poliomos virusas (angl. *Simian Virus 40*)

TEM – Transmisinė elektroninė mikroskopija

TF – Transkripcijos veiksniai (angl. *Transcription Factor*)

VP1 – Pagrindinis struktūrinis poliomos virusų kapsidės baltymas (angl. *Viral Protein 1*)

VP2, VP3 – Mažieji struktūriniai poliomos virusų kapsidės baltymai (angl. *Viral Protein 2/3*)

VPD – Į virusus panašios dalelės (angl. *Virus-Like Particles*)

Ivadas

Poliomos virusai (PyV, angl. *Polyomaviruses*) yra maži, apvalkalėlio neturintys virusai, kurių genomą sudaro apie 5 kb ilgio žiedinė dvigrandinė DNR. Šie virusai gali infekuoti žinduolius, paukščius, žuvis ir, remiantis neseniai skorpionų vidiniuose organuose identifikuotomis PyV genomų sekomis, potencialiai nariuotakojus (Schmidlin et al., 2021).

PyV genomą sudaro ankstyvieji ir vėlyvieji genai. Ankstyvieji genai įprastai koduoja didįjį T antigeną (LTA_g, angl. *Large Tumor Antigen*) ir mažąjį T antigeną (sTA_g, angl. *small Tumor Antigen*), kurie yra reikalingi viruso DNR replikacijai ir šeimininko ląstelės ciklo sutrikdymui. Vėlyvieji genai koduoja VP1, VP2 ir VP3 struktūrinius baltymus, kurie formuoja kapsidę ir dalyvauja viriono patekime į ląstelę bei jo pernašoje į branduolį (Nakanishi et al., 2007; An et al., 2012; Moens et al., 2017). Įprastai PyV genome ankstyvieji ir vėlyvieji genai koduojami priešingomis kryptimis, tačiau 2024 m. Vilniaus Universiteto Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriuje (EGIS), naujos kartos sekoskaitos metodu tiriant dirvinių pelių (*Apodemus agrarius*) inkstų DNR mėginius, buvo nustatyta į PyV panaši seka, kuriai būdinga nekanoninė genomo organizacija (NGO): ankstyvųjų ir vėlyvųjų genų homologai joje koduojami ta pačia kryptimi (nepublikuoti duomenys). Mūsų žiniomis, tai pirmoji ir kol kas vienintelė NGO PyV seka, nustatyta konkretaus organizmo audinio mėginyje. Vis dėlto NGO pasižymintys PyV genomai buvo aptikti ir viešai prieinamuose įvairių organizmų bei aplinkos metagenominių mėginių sekoskaitos duomenyse (Buck et al., 2024).

A. agrarius pelėse aptikta NGO PyV seka (AagraPyV), vertinant pagal LTA_g baltymo filogeniją, yra labai nutolusi nuo kitų žinomų žinduolių PyV ir yra artimiausia anksčiau minėtoms metagenominiuose duomenyse nustatytoms NGO PyV sekoms, bei taip pat ir skorpionuose aptiktoms PyV sekoms. Remiantis šiais filogenetiniais duomenimis, buvo iškelta hipotezė, kad AagraPyV galėtų būti nariuotakojų, o ne pelių, virusas. Vis dėlto siekiant įvertinti galimybę, kad AagraPyV infekuoja *A. agrarius*, o ne nariuotakojus, šiame darbe buvo tiriamas šio viruso struktūrinių baltymų gebėjimas susirinkti į virusus panašias daleles (VPD) *S. cerevisiae* raiškos sistemoje. VPD susiformavimo atveju, jos ateityje galėtų būti panaudotos serologiniuose tyrimuose, nustatant galimai buvusią AagraPyV infekciją *A. agrarius* pelėse. Be to, atsižvelgiant į AagraPyV neįprastai pailgėjusį numanomą VP1 baltymą ir jame prognozuojamus papildomus struktūrinius elementus, VPD susiformavimo atveju toks tyrimas galėtų prisidėti prie naujų įžvalgų apie PyV virionų architektūros įvairovę. Šiame darbe taip pat buvo ištirtas AagraPyV paplitimas *A. agrarius* pelių inkstų DNR mėginiuose, o naujai nustatytos AagraPyV genomo sekos išanalizuotos.

Darbo tikslas:

Ištirti *A. agrarius* pelėse aptikto nekanoninės genomo organizacijos poliomos viruso įvairovę ir jo numanomų struktūrinių baltymų gebėjimą susirinkti į virusus panašias daleles *S. cerevisiae* mielėse.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti AagraPyV sekų paplitimą *A. agrarius* pelių inkstų DNR mėginiuose.
2. Mėginiuose, kuriuose aptikta AagraPyV DNR, nustatyti AagraPyV genomo sekas ir jas charakterizuoti.
3. Nustatyti AagraPyV numanomo VP1 atviro skaitymo rėmelio potencialius splaisingo variantus *in silico*.
4. Ištirti AagraPyV numanomų struktūrinių baltymų gebėjimą susirinkti į VPD *S. cerevisiae* mielių ląstelėse, taikant pavienę VP1 baltymo variantų raišką ir ko-raišką su kitais poliomos virusų baltymais.

1. Literatūros apžvalga

1.1 Poliomos virusai

Poliomos virusai (PyV, angl. *Polyomaviruses*) yra maži, apie 5 kb dydžio žiedinės DNR struktūros virusai, galintys infekuoti žinduolius, paukščius, žuvis ir potencialiai nariuotakojus, remiantis neseniai skorpionų vidiniuose organuose nustatytomis PyV genomų sekomis (Schmidlin et al., 2021).

Pelių poliomos virusas (MPyV, angl. *Murine polyomavirus*) yra pirmasis 1953 m. aptiktas PyV, iš pradžių identifikuotas kaip veiksnys, kuris eksperimentinėmis sąlygomis pelėse sukėlė seilių liaukų karcinomą (Gross, 1953). Vėlesni tyrimai parodė, kad šis veiksnys galėjo daugintis tiek in vivo, tiek in vitro bei indukuoti daugybinių navikų išsivystymą pelėse (Stewart et al., 1958). Iš to ir kilo poliomos virusų pavadinimas, sudarytas iš graikiškų žodžių „poly“, reiškiančiu daug, bei „oma“, reiškiančiu navikas.

Kitas svarbus postūmis PyV tyrimams įvyko, kai SV40 (angl. *Simian Virus 40*) beždžionių poliomos virusas buvo aptiktas ląstelių kultūrose, naudotose poliomielito vakcinų gamybai, kai šiomis vakcinomis jau buvo paskiepyti milijonai žmonių (Sweet ir Hilleman, 1960). Vėliau PyV tyrimų laukas dar labiau suaktyvėjo, kai 1971 m. buvo nustatyti pirmieji du žmogaus poliomos virusai (HPyV, angl. *Human Polyomaviruses*): iš inkstų transplantacijos recipientų, turinčio šlapimtakio stenozę, šlapimo buvo izoliuotas BK poliomos virusas (BKPyV, angl. *BK Polyomavirus*) (Gardner et al., 1971), o iš progresuojančia daugiažidinine leukoencefalopatija (PML, angl. *Progressive Multifocal Leukoencephalopathy*) sergančio paciento smegenų audinio – JC poliomos virusas (JCPyV, angl. *John Cunningham Polyomavirus*) (Padgett et al., 1971). Kiti HPyV buvo atrasti tik nuo 2007 m., kai atsiradus pažangioms DNR sekoskaitos technologijoms jos buvo pradėtos taikyti įvairių klinikinių mėginių analizei (Allander et al., 2007; Gaynor et al., 2007). Toks didelis laiko tarpas tarp naujų HPyV atradimo buvo nulemtas ne tik ankstesnių metodų ribotumo, bet ir pačių virusų biologijos. Jų infekcija sveikuose individuose įprastai yra besimptomė ir ilgalaikė, virusams replikuojantis labai žemu lygiu (White et al., 2013), o jų reaktyvacija dažniausiai pasireiškia tik esant sutrikusiam imunitetui – ypač, kai taikoma imunosupresija po organų transplantacijos ar limfoproliferacinių ir autoimuninių ligų gydymui, ar sergant ŽIV/AIDS (aptarta: Gascun ir Carr, 2013).

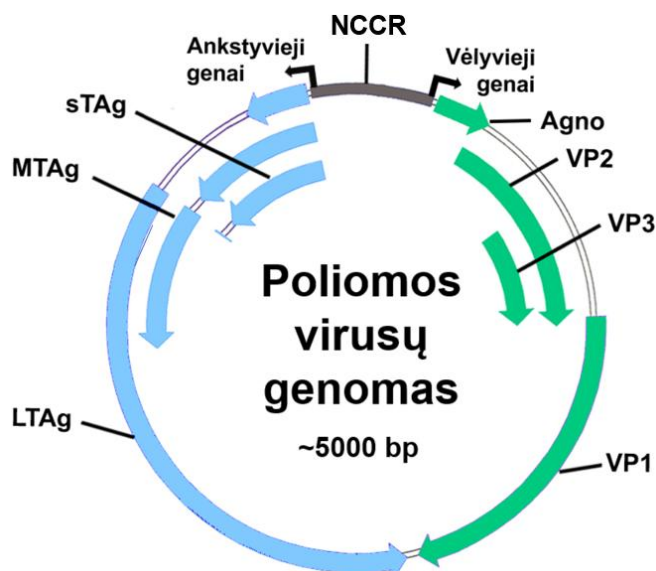
Remiantis serologiniais duomenimis, iš 13 patvirtintų HPyV rūšių daugumos paplitimas įvairiose žmonių populiacijose įprastai varijuoja tarp 50–90 % (Dalianis ir Hirsch, 2013; Gossai et

al., 2015; Kamminga et al., 2018). Išsamiausiai ištirti HPyV yra: BKPyV, JCPyV ir MCPyV. Jie turi aiškiausias asociacijas su tam tikromis ligomis. Sutrikus imunitetui ir esant PyV reaktyvacijai: BKPyV gali sukelti nefropatiją ar hemoraginę cistitą, JCPyV – PML, o Merkelio ląstelių poliomos virusas (MCPyV, angl. *Merkel Cell Polyomavirus*) – merkelio ląstelių karcinomą. MPyV infekcija eksperimentinėmis sąlygomis gali sukelti navikų išsivystymą suaugusiose imunodeficitinėse ir naujagimėse pelėse, tačiau, manoma, kad natūrali MPyV infekcija pelėse nesukelia vėžio (Gottlieb ir Villarreal et al., 2001). Tuo tarpu paukščių PyV (APyV, angl. *Avian Polyomavirus*) infekcija jaunuose paukščiuose dažnai sukelia ūmią sisteminę ligą, pasižyminčią dideliu mirtingumu (Johnė ir Müller, 2007).

1.2 Poliomos virusų genomo organizacija, genai ir jų koduojamų baltymų funkcijos

Poliomos virusų mažame DNR genome (~5 kb) genetinė informacija yra maksimaliai išnaudojama pasitelkiant persidengiančius atviro skaitymo rėmelius (ORF, angl. *Open Reading Frame*) ir alternatyvų splaisingą. Šie virusai viena genomo kryptimi koduoja ankstyvuosius genus, o priešinga kryptimi – vėlyvuosius genus (žr. 1 Pav.). Įprastai ankstyvieji genai koduoja didįjį T antigeną (LTA_g, angl. *Large Tumor Antigen*) ir mažąjį T antigeną (sTA_g, angl. *small Tumor Antigen*), kurie yra reikalingi viruso DNR replikacijai ir šeimininko ląstelės ciklo sutrikdymui, o vėlyvasis genų regionas koduoja VP1, VP2 ir VP3 baltymus (angl. *Viral Protein 1/2/3*), kurie yra atsakingi už viruso kapsidės ir viriono susiformavimą bei jo patekimą į ląstelę ir vėliau į branduolį (Nakanishi et al., 2007; An et al., 2012; Moens et al., 2017). Šias dvi transkripcines sritis skiria dvikryptis nekoduojantis kontrolės regionas (NCCR, angl. *Non-Coding Control Region*; ~250–650 bp), kuriame yra išsidėsčiusi replikacijos pradžios seka, stiprikliai bei ankstyvojo ir vėlyvojo regionų promotoriai (White et al., 2009; Moens et al., 2020). Šis regionas yra itin variabilus tiek tarp skirtingų PyV rūšių, tiek tarp tos pačios rūšies variantų (White et al., 2009). Jo variabilumą lemia įvairios iškritos, duplikacijos bei taškinės mutacijos, kurios manoma turi įtakos PyV transkripcijos reguliacijai, replikacijai bei patogenezei (White et al., 2009). NCCR esančios LTA_g baltymo prisijungimo sekos yra konservatyvios tarp SV40, JCPyV ir BKPyV virusų, tačiau NF-κB transkripcijos veiksnio (TF, angl. *Transcription Factor*) prisijungimo vieta šiame regione yra konservatyvi tik tarp žmogaus PyV – JCPyV ir BKPyV (White et al., 2009). NCCR regione prisijungiantys TF gali skirtis ir tarp tos pačios rūšies PyV variantų, pavyzdžiui JCPyV MH-1 variantas turi Sp1 TF prisijungimo vietą, o JCPyV Mad-1 variantas jos neturi (Henson, 1994).

Ankstyvųjų genų transkripte yra koduojami visi T antigenai, o jų mRNR susidaro alternatyvaus splaisingo būdu. Visi PyV koduoja LTA_g ir sTA_g baltymus, o kai kuriuose PyV yra koduojamas ir vidurinis T antigenas (MTA_g, angl. *Middle Tumour Antigen*), kuris yra randamas tiek graužikų – pelių ir žiurkėnų poliomos virusuose (MPyV ir HaPyV, angl. *Hamster Polyomavirus*) (Treisman et al., 1981; Schnerk et al., 2001), tiek žmonių – MCPyV (MCPyV MTA_g dar vadinamas ALTO, angl. *Alternative Large Tumor ORF*) (Carter et al., 2013) ir trichodysplasia spinulosa PyV (TSPyV) (Meijden et al., 2015). Ankstyvųjų genų koduojamų baltymų lokalizacija ląstelėje skiriasi: LTA_g aptinkamas branduolyje, sTA_g daugiausiai citoplazmoje, bet gali būti randamas ir branduolyje, o MTA_g jungiasi prie membranų (Cheng et al., 2010).



1 Pav. Poliomos virusų genomo organizacijos schema

Viršuje pilkai pavaizduotas nekoduojantis kontrolės regionas (NCCR). Kairėje pusėje šviesiai mėlynai pavaizduotas ankstyvųjų genų: LTA_g, sTA_g ir kai kuriuose PyV genomuose koduojamo MTA_g regionas. Dešinėje pusėje žaliai pavaizduotas vėlyvuosius genus: VP1, VP2, VP3 ir kai kuriuose PyV genomuose koduojamo Agno baltymo, regionas.

LTA_g genas yra sudarytas iš dviejų egzonų, o jo baltymo ilgis tarp šiuo metu žinomų PyV varijuoja nuo 587 aminorūgščių (ar.) (APyV) iki 817 ar. (MCPyV). LTA_g baltymo pagrindinė funkcija yra inicijuoti virusinės DNR replikaciją, kurią jis atlieka oligomerizuodamasis į aktyvų helikazės kompleksą (Wessel ir Stahl, 1992). Prie šio proceso jis taip pat prisideda pritraukdamas ir kitus šeimininko replikacijos baltymus (aptarta: Googins et al., 2025). Ląstelėje LTA_g sąveikauja ir

su šeimininko naviką slopinančiais baltymais (angl. *tumor suppressor proteins*), taip sutrikdydamas ląstelės ciklą ir skatindamas jo progresiją (Shahid et al., 2025.).

LTA_g baltymus sudaro N-gale esantis J-domenas, nestruktūrizuotas regionas (IDR, angl. *Intrinsically Disordered Region*), replikacijos pradžios surišimo domenas (OBD, angl. *Origin-Binding Domain*), helikazės domenas (HD) ir C-gale išsidėstęs VHRD domenas (angl. *Variable Host Range Domain*). Tarp skirtingų PyV šio baltymo ilgio skirtumai daugiausia kyla dėl variacijų IDR ir VHRD domenuose bei priklauso nuo pastarojo domeno buvimo ar nebuvimo LTA_g baltymų sudėtyje (Googins et al., 2025).

J-domeno struktūra panaši į DnaJ (Hsp40) ko-šaperono (angl. *co-chaperone*), o jo pagrindinė funkcija yra sąveikauti su šeimininko Hsp70 šaperonu bei skatinti jo ATPazės aktyvumą (Sullivan et al., 2001). IDR srityje, netoli Hsp70 surišimo motyvo, yra LXCXE motyvas prie kurio jungiasi retinoblastomos baltymas (Rb). Manoma, kad LTA_g baltymui prisijungus prie Hsp70 ir Rb baltymo, esančiame komplekse su E2F TF, dėl jų artimo erdvinio išsidėstymo Rb-E2F kompleksas disocijuoja, o tai sutrikdo ląstelės ciklą (Sullivan ir Pipas, 2002). Be LXCXE motyvo, IDR srityje yra aptinkama į branduolį nukreipianti signalinė seka (NLS, angl. *Nuclear Localization Sequence*). Šioje srityje Beta- ir Delta- PyV LTA_g baltymai taip pat turi WD/EXWW motyvą (Googins et al., 2025), kuriuo gali jungtis prie Bub1 kinazės ir ją slopinti, taip galimai skatindami virusinės DNR replikaciją per DNR pažaidų atsako aktyvaciją (Hein et al., 2009).

Kiti du LTA_g domenai: OBD ir helikazės domenas yra tiesiogiai atsakingi už virusinės DNR replikaciją. OBD atpažįsta ir jungiasi prie GAGGC sekos pasikartojimų žinduolių PyV virusinės DNR replikacijos pradžios srityje (Bochkareva et al., 2006), ar prie NCC(A/T)₆GGN palindrominės sekos APyV virusų DNR replikacijos pradžios srityje (John et al., 2006). OBD papildomai gali aktyvinti replikaciją prisijungdamas prie replikacijos baltymo A (Googins et al., 2025). Viena tyrime su SV40 taip pat buvo parodyta, kad šių virusų LTA_g OBD gali sąveikauti su DNR pažaidų atsake dalyvaujančiu Nbs1 baltymu ir taip padėti išvengti DNR replikacijos slopinimo (Wu et al., 2004).

Po OBD išsidėstęs HD domenas sudarytas iš dviejų dalių: cinką surišančio domeno (ZBD, angl. *Zinc-Binding Domain*) ir ATPazės domeno. ZBD yra atsakingas už LTA_g oligomerizaciją į heksamerą, kuris toliau jungiasi į dvigubo heksamero struktūrą, taip suformuodamas funkcionalią helikazę (Loeber et al., 1991). ATPazės domenas, surišdamas ir hidrolizuodamas ATP, suteikia energijos helikazei, kuri dėl pakitusios konformacijos išvynioja prisijungtą DNR ir perkelia ją per centrinį helikazės kanalą (Shahid et al., 2025). HD prisideda prie virusinės DNR replikacijos ir

netiesiogiai – jis sąveikauja su šeimininko replikacijos baltymais, pavyzdžiui su topoizomeraze I ir α -praimaze, kurie abu yra reikalingi šiam procesui (Murakami ir Hurwitz, 1993; Googins et al., 2025). Be to, HD funkcijos apima ne tik replikaciją, bet ir ląstelės ciklo sutrikdymą, vedantį į ląstelių transformaciją (apibrėžiama kaip ląstelės išplėstinio proliferacijos ir (arba) išgyvenimo potencialo įgijimas) (Ahuja et al., 2005). Prie ląstelių transformacijos HD prisideda prisijungdamas prie p53 naviką slopinančio baltymo p53, taip užkirsdamas kelią ląstelių ciklo sustabdymui ir apoptozei (An et al., 2012). Tyrimuose su MCPyV buvo nustatyta, kad LTag baltymas nesijungia su p53, tačiau jo sTag baltymas sąveikauja su MYCL TF, skatinančiu MDM2 ubikvitino ligazės sintezę, kuri specifiškai degraduoja p53 ir taip vietoj LTag slopina p53 funkciją (Park et al., 2019). MPyV LTag baltymas taip pat nesijungia su p53, tačiau šios sąveikos nebuvimą kompensuoja MTag baltymas, aktyvindamas įvairius signalinius kelius, kurie slopina apoptozę ir skatina ląstelių proliferaciją (Dilworth, 1990, Cheng et al., 2010).

Paskutinis LTag domenas – VHDR, yra mažiausiai konservatyvi ir ištirta LTag baltymo sritis. Nustatyta, kad SV40 ir JCPyV LTag baltymuose šios srities pašalinimas turėjo skirtingą poveikį transformacijos potencialui - VHDR pašalinimas SV40 transformacijos potencialą sumažino, o JCPyV – jį padidino (Seneca et al., 2014). Mechanizmai, lemiantys šiuos skirtingus poveikius, nėra aiškūs.

Kitas visiems žinduolių ir paukščių PyV būdingas ankstyvasis genas – sTag, priklausomai nuo viruso rūšies, gali turėti vieną introną (pvz., SV40 sTag) (Ge et al., 1990) arba jo neturėti (pvz., BKPyV sTag) (Helle et al., 2017), o jo koduojamo baltymo ilgis tarp žinomų PyV varijuoja nuo 145 ar. (APyV) iki 195 ar. (MPyV). Pagrindinė sTag funkcija yra skatinti infekuotų ląstelių transformaciją bei virusinės DNR replikaciją, tačiau jo svarba ir įtaka šiems procesams yra nevienoda skirtingose PyV rūšyse. Kaip ir LTag, sTag baltymas N-gale turi J-domeną, bet C-gale jis turi unikalų regioną, kurio geriausiai ištirta sąveika yra su šeimininko ląstelių PP2A fosfataze, kurią jis slopina (Viciano et al., 2006). Skirtingų PyV rūšių sTag sąveikos su PP2A poveikis šeimininko ląstelėms yra nevienodas, kadangi jų sTag baltymai gali jungtis prie skirtingų PP2A komplekso subvienetų arba prie skirtingo šio komplekso subvienetų kiekio (Moens ir Macdonald, 2019). SV40 ir MPyV virusų sTag baltymų sąveika su PP2A skatina ląstelių transformaciją (Chen et al., 2007). Manoma, kad JCPyV virusų sTag irgi tai būdinga (Biffi et al. 2024). Tuo tarpu MCPyV sTag transformacijos potencialui ši sąveika įtakos neturi, o BKPyV sTag baltymo įtaka ląstelių transformacijai nėra pakankamai ištirta (Zou ir Imperiale et al., 2023). Manoma, kad SV40 sTag baltymų dalyvavimas ląstelių transformacijoje vyksta per ląstelės ciklo reguliatorių - ciklino

A ir D transkripcijos aktyvinimą, taip skatinant ląstelės ciklo progresiją (Skoczylas et al., 2004). SV40 sTAg prisidėjimas prie ląstelių transformacijos buvo įrodytas ne tik *in vitro* (Yuan et al., 2002), bet ir *in vivo* – transgeninėse pelėse, kuriose vieno LTag raiška plaučių ir inkstų epitelio ląstelėse navikų nesukėlė, o papildoma sTAg ko-raiška keturioms iš šešių pelių sukėlė plaučių ir kepenų adenokarcinomą (Choi et al., 1988). JCPyV sTAg funkcija ląstelių transformacijoje nėra žinoma, tačiau manoma, kad sTAg gali prisidėti prie transformacijos skatindamas ląstelės ciklo progresiją per PI3K/Akt/mTOR signalinio kelio, reguliuojančio ląstelių augimą, proliferaciją bei metabolismą, aktyvaciją (Biffi et al. 2024). JCPyV sTAg baltymas taip pat turi didžiulę įtaką virusinės DNR replikacijai *in vivo* pirminėse žmogaus vaisiaus glijos ląstelėse, nes mutantuose su sTAg iškrita, DNR replikacijos aktyvumas nebuvo nustatytas (Bollag et al., 2010). Be to, ko-imuniprecipitacijos tyrimais buvo parodyta, kad JCPyV sTAg jungiasi su p107 ir p130 Rb šeimos baltymais, tačiau šios sąveikos įtaka ląstelių transformacijai dar nėra ištirta (Bollag et al., 2010). Įdomu, kad nors ir BKPyV, kaip ir JCPyV, sTAg sekos turi LXCXE motyvą (Bollag et al., 2010), kuris yra atsakingas už baltymo sąveiką su Rb šeimos baltymais, tačiau buvo nustatyta, kad BKPyV sTAg baltymas nesąveikauja su p107 (Rosen et al., 2012). Šiame tyrime taip pat buvo parodyta, kad BKPyV sTAg sąveikauja su Cdk2 kinaze, kuri fosforilina Rb baltymus, bet šios sąveikos įtaka ląstelių transformacijai dar nėra ištirta (Rosen et al., 2012). BKPyV sTAg sąveika su PP2A veikia priešingai lyginant su kitais žinomais PyV sTAg baltymais, nes ji dalinai slopina virusinės DNR replikaciją bei papildomai – LTag raišką (Zou ir Imperiale, 2023). Šio baltymo funkcijų išskirtinumas yra būdingas ir MCPyV, nes didžioji dalis šių virusų sukeltos ląstelių transformacijos priklauso nuo sTAg, o ne LTag ar kai kuriems PyV būdingo MTag baltymo. MCPyV sTAg vaidmuo ląstelių transformacijoje yra platus. Vienas iš būdų kaip jis prie to prisideda yra jo LT-stabilizuojančio domeno sugebėjimas slopinti SCFFbw7 E3 ubikvitino ligazę ir taip užblokuoti LTag ir kitų onkogeninių baltymų (c-myc ir ciklino E) proteosominę degradaciją, (Kwun et al., 2013). Šio baltymo transformacijos poveikis yra parodytas tiek *in vitro*, tiek *in vivo*, nes jo vieno raiškos pakanka sukelti graužikų ląstelių transformaciją ir navikų išsivystymą transgeninėse pelėse (Verhaegen et al., 2015). Nepaisant to, kad MCPyV sTAg-PP2A sąveika nedaro įtakos ląstelių transformacijai (Kwun et al., 2015), ji padidina virusinės DNR replikacijos efektyvumą. DNR replikacija buvo apie 10 kartų efektyvesnė 293 žinduolių ląstelių linijoje atlikus sTAg raišką kartu su LTag, lyginant su ląstelėmis, kuriose vyko tik vieno LTag raiška (Kwun et al., 2009).

Kitas, kai kuriuose PyV (MPyV, HaPyV, MCPyV, TSPyV) randamas T antigenas – MTag (arba „ALTO“ MCPyV virusuose), taip pat kaip ir LTag ir sTAg, yra sudarytas iš dviejų egzonų ir

baltymo N-gale turi J-domeną, o C-gale turi savo unikalų regioną, kuriame yra hidrofobinis transmembraninis domenas bei kitos baltymo sekos, sąveikaujančios su šeimininko ląstelių baltymais (Viciano et al., 2006; Zhou et al., 2011). Daugiausia tirtas MPyV MTag baltymas prisideda prie virusinės DNR replikacijos reguliacijos bei yra būtinas ląstelių transformacijai (Cheng et al., 2010). Prie ląstelių transformacijos jis prisideda sąveikaudamas su PP2A ir Src šeimos tirozino kinazėmis, kurios fosforilina MTag tirozino liekanas, o tai sukelia įvairių, kaip PI3K ir PLC γ 1, signalinių molekulių, kurios dalyvauja ląstelės augimo, išgyvenimo ir proliferacijos procesuose, aktyvaciją (Cheng et al., 2010). Vien tik MTag raiškos dažniausiai užtenka sukelti žiurkių ląstelių transformaciją *in vitro* (Treisman et al., 1981; Carmichael et al., 1982), o tokių ląstelių injekcija į žiurkę sukelia navikų išsivystymą (100 %, n = 4) (Treisman et al., 1981). Priešingai, MPyV variantai, turintys mutavusį/trumpesnę MTag baltymą, nesugeba sukelti navikų išsivystymo pelėse bei negali efektyviai replikuotis (Freund et al., 1992). Kai kurių PyV ankstyvasis regionas koduoja ir kitas T antigeno formas, kurios yra gaunamos alternatyvaus splaisingo būdu arba dėl alternatyvaus transliacijos kodono. Šios alternatyvios T antigeno formos yra: mažytis T (angl. *tiny T*; SV40), 17kT (SV40), 21kT (TSPyV), 57kT (MCPyV), ALTO (MCPyV ir TSPyV) (Riley et al., 1997; Cheng et al., 2010; Moens et al., 2022).

Vėlyvųjų genų regione įprastai yra koduojami VP1, VP2 ir VP3 baltymai, kurių genus sudaro vienas egzonas. MPyV naudoja alternatyvų splaisingą skirtingų vėlyvųjų genų baltymų generavimui (Kamen et al., 1980), o SV40 be jo taip pat naudoja ir alternatyvaus transliacijos starto kodoną, skirtą VP3 baltymo sintezei (Ghosh et al., 1978; Good et al., 1988). VP1 baltymų ilgis įprastai varijuoja tarp 360-380 ar. Tuo tarpu MCPyV VP1 baltymo ilgis yra 423 ar. – jo C-galas turi papildomas ar., kurių funkcija nežinoma (Bayer et al., 2020), o APyV VP1 (343 ar.) – priešingai, turi trumpesnę C-galą, kas lemia kapsidės dydžio variabilumą (Shen et al., 2011). Kiti du struktūriniai baltymai sutampa savo skaitymo rėmeliu: VP3 baltymas yra trumpesnė VP2 forma su toliau link 3' galo prasidedančiu N-galu. VP2 ir VP3 baltymų ilgis varijuoja tarp 320–350 ar. ir 220–240 ar. atitinkamai. MCPyV, kaip ir kiti kai kurie PyV, priklausantys Alfapoliomos virusų genčiai, neturi VP3 baltymo bei turi trumpesnę VP2 baltymą (241 ar.) (Schowalter ir Buck, 2013). Manoma, kad šios kilmės PyV genomuose atsirado iškrita VP2 gene, kas taip pat panaikino ir VP3 ORF (Schowalter ir Buck, 2013).

VP1, VP2 ir VP3 yra kapsidę sudarantys struktūriniai baltymai. VP1 baltymai sudaro visą jos išorinį sluoksnį, o VP2/VP3 baltymai jungiasi prie VP1 iš kapsidės vidaus (Chen et al., 1998) (plačiau apie sąveikas kapsidėje žr. 1.3). Be struktūrinės funkcijos, VP1 baltymai taip pat yra

atsakingi už prisijungimą prie ląstelių receptorių (Stehle ir Harrison, 1996), o VP2 ir VP3 virusui patekus į ląstelės vidų formuoja poras endoplazminio tinklo (ET) membranose, kaip parodyta *in vitro* eksperimentuose (Giorda et al., 2012) ir yra reikalingi virusinės DNR patekimui iš ET į branduolį (Huérfino et al., 2017). VP1 baltymai N-gale turi NLS bei DNR surišiantį domeną (DSD) (Chang et al., 1993), o VP2/VP3 baltymuose šie domenai yra jų C-gale (Clever et al., 1993; Bennett et al., 2015). VP1 baltymų centrinę dalį sudaro konservatyvios beta klostės, kurias tarpusavyje jungia kilpos (apie jų struktūrinę funkciją žr. 1.3). VP2 baltymų N-galo glicinas yra unikaliai modifikuojamas miristino rūgštimi (miristilinizimas) transliacijos metu (Krauzewicz et al., 1990). VP2 ir VP3 baltymai turi hidrofobinę sritį, kuri MPyV yra apibrėžiama kaip hidrofobinis domenas (MPyV VP2: 125–165 ar.), reikalingas baltymų įsiterpimui į membranas (Huérfino et al., 2017).

Visos trys SV40 struktūrinių baltymų NLS sritys jungiasi prie DNR nespecifiškai *in vitro* (Soussi, 1986; Clever et al., 1993). Nakanashi et al., (2002) tyrime su SV40 į virusus panašiomis dalelėmis (VPD, angl. *Virus-Like Particles*) buvo parodyta, kad VPD patekimas į branduolį priklauso nuo VP2/VP3 NLS sąveikos su importinu $\alpha 2/\beta$, dalyvaujančiu baltymų transporte į branduolį. Manoma, kad VP1 NLS su importinu ląstelėse nesąveikauja, nes VP1 DBD domenas, persidengiantis su NLS seka, susiriša su DNR ir neleidžia NLS kontaktuoti su importinu $\alpha 2/\beta$ (Nakanashi et al., 2002). Be to, tyrimas su BKPyV VP2/VP3 baltymais parodė, kad mutacijos jų NLS srityje sustabdė šių baltymų patekimą į branduolį (Bennett et al., 2015). Priešingai negu šiuose dviejuose minėtuose tyrimuose, su MPyV struktūriniais baltymais buvo parodyta, kad efektyviam virusinės DNR patekimui į branduolį užteko vienos, VP1 baltymų arba VP2/VP3 baltymų, funkcionalios NLS sekos (Soldatova et al., 2018). Manoma, kad šiuos skirtumus gali lemti tai, jog primatų PyV (pvz., BKPyV ir SV40) VP2/VP3 baltymai turi stipresnę NLS seką, kuriai būdingos papildomos bazinių aminorūgščių liekanos NLS regione, todėl gali skirtis skirtingų virusinių baltymų vaidmuo, susijęs su jų patekimu į ląstelių branduolį (Soldatova et al., 2018). Panašūs rezultatai buvo gauti ir su MCPyV struktūriniais baltymais. Šio PyV VP2 baltymas, turintis silpną NLS seką, vienas nepatekdavo į ląstelių branduolį, tačiau jo raiška kartu su VP1 baltymu, turinčiu pakankamai stiprią NLS seką, užtikrino sėkmingą VP1-VP2 komplekso patekimą į branduolį (vieno VP1 raiška taip pat lėmė VP1 lokalizaciją branduolyje) (Schowalter ir Buck, 2013).

VP1 baltymų kilpų struktūros, išsidėsčiusios šių baltymų paviršiuje, sąveikauja su ląstelių receptoriais ir pasižymi nemažu sekų variabilumu tarp skirtingų PyV (Neu et al., 2008). Didesnė variacija BKPyV VP1 paviršiaus kilpų sekose, manoma, yra susijusi su tuo, kad išorinis paviršius toleruoja daugiau variabilumo negu viduje esančios konservatyvios struktūros, be to, mutacijos

kilpose, manoma, gali prisidėti prie kai kurių BKPyV variantų efektyvesnio šeimininko humoralinio atsako išvengimo (Durairaj et al., 2024).

VP2 baltymų N-gale esančios glicino ar. modifikacija su miristino rūgštimi yra reikalinga efektyviam MPyV infektyvumui (angl. *infectivity*) (Sahli et al., 1993), o JCPyV –tinkamam virusinės DNR supakavimui (Gasparovic et al., 2006). Šiam procesui JCPyV atveju yra reikalingas ne tik VP2 baltymas su miristilintu N-galo glicinu, bet ir VP3 baltymas (Gasparovic et al., 2006), tačiau šių abiejų baltymų įtaka tinkamam PyV DNR supakavimui gali skirtis tarp skirtingų PyV rūšių. Pavyzdžiui, viename tyrime buvo parodyta, kad SV40 VP2 ir VP3 genų iškritos neturėjo neigiamos įtakos nei viruso kapsidės susirinkimo, nei virusinės DNR supakavimo ir įsiskverbimo į ląstelę efektyvumui (Nakanishi et al., 2007). VP2 išveiklinimas MCPyV taip pat neturėjo įtakos panašioms procesams, t.y., kapsidės susirinkimui, virusinės DNR supakavimui bei viriono prisijungimui prie ląstelių (Schowalter ir Buck, 2013).

Be VP1, VP2 ir VP3 struktūrinių baltymų, kai kurie PyV (SV40, BKPyV, JCPyV) vėlyvųjų genų regiono pradžioje koduoja mažą nestruktūrinį Agno baltymą. Šio baltymo ilgis geriausiai ištirtuose PyV įprastai siekia ~60-75 ar., tačiau kitų PyV rūšių genomuose aptinkami numanomi Agno baltymai, kurių ilgis gali varijuoti nuo 30 ar. (šikšnosparnių PyV) iki 154 ar. (*Mastomys natalensis* pelių PyV) (Gerits ir Moens, 2012). Ląstelėse Agno baltymas daugiausia lokalizuojasi aplink branduolį (angl. *perinuclear localization*), bet yra aptinkamas ir branduolyje (Safak et al., 2002). Vėlesnėse JCPyV ląstelinės infekcijos stadijose, buvo parodyta, kad šis baltymas kaupiasi prie plazminės membranos (Suzuki et al., 2010). Agno baltymo N ir C-galo regionai yra praturtinti bazinėmis ar. Juose esančios Arg ir Lys liekanos yra labai konservatyvios tarp BKPyV, JCPyV ir SV40 virusų (Saribas et al., 2016). Centrinėje Agno baltymo dalyje formuojasi amfipatinė α -spiralė, kuri tarp BKPyV, JCPyV ir SV40 virusų turi konservatyvų leucino/izoleucino/fenilalanino (Leu/Ile/Phe) motyvą, reikalingą Agno baltymų dimerų/oligomerų formavimuisi (Saribas et al., 2013; Saribas et al., 2016). Šių PyV Agno baltymo N-galas ir centrinė dalis yra gana konservatyvūs, o C-galas labiau variabilus (Saribas et al., 2016). Vis dėlto lyginant tarpusavyje ir kitų žinomų žinduolių PyV Agno baltymų sekas, ar. identiškumas gali varijuoti nuo 0 iki 90 % (Gerits ir Moens, 2012).

Nepaisant mažo Agno baltymo dydžio, jis turi nemažai įtakos daugeliui PyV dauginimosi ciklo procesų ir yra būtinas efektyviai šio ciklo eigai užtikrinti. Jis prisideda prie virusinės DNR replikacijos (Akan et al., 2006; Sariyer et al., 2011) ir virusinių genų raiškos reguliacijos (Akan et al., 2006; Johannessen et al., 2008), dalyvauja virionų susirinkime (Sariyer et al., 2011; Suzuki et

al., 2012) ir jų išėjime iš ląstelės (Panou et al., 2018). Be to, BKPyV Agno atveju parodyta, kad jis gali prisidėti prie įgimto imuninio atsako išvengimo, sutrikdydamas mitochondrijų tinklą ir membraninį potencialą bei taip slopindamas interferonų raišką ir skatindamas mitofagiją (Manzetti et al., 2020). Agno trūkumo poveikis virusinės DNR replikacijos efektyvumui ypač padidėja tolimesniuose viruso dauginimosi cikluose. Tai atskleidžia Sariyer et al., (2011) tyrimas, kuriame JCPyV Agno geno ATG pradžios kodono mutacija lėmė tai, kad viruso replikacijos efektyvumas praėjus 14 d. po transfekcijos sumažėjo apie 4,3 karto, o po 21 d. – apie 19 kartų, palyginus su laukinio tipo JCPyV. Tuo tarpu analogiška mutacija SV40 virusuose turėjo dar ryškesnį poveikį: praėjus 6 dienoms po transfekcijos virusinės DNR replikacija mutantuose buvo beveik neaptinkama, o po 9 dienų – maždaug 120 kartų mažesnė nei laukinio tipo SV40 (Sariyer et al., 2011). Manoma, kad viena iš BKPyV virusų Agno baltymo funkcijų virusinės DNR replikacijos reguliacijoje gali būti replikacijos sustabdymas vėlyvoje ląstelinės infekcijos stadijoje, kad būtų skatinamas perėjimas prie kapsidinių baltymų sintezės ir virionų susirinkimo (Gerits et al., 2015), nes buvo parodyta, kad BKPyV Agno baltymas sąveikauja su PCNA veiksmu (angl. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) ir *in vitro* slopina PCNA-polimerazės δ komplekso vykdomą DNR replikaciją (Gerits et al., 2015). Anksčiau minėtame Sariyer et al., tyrime buvo parodyta ne tik Agno baltymo reikšmė replikacijoje, bet ir virionų susirinkime: JCPyV ir SV40 mutantai, kuriuose trūko Agno baltymo, formavo virionus beveik neturinčius supakuotos virusinės DNR (Sariyer et al., 2011). Jo dalyvavimą šiame procese patvirtina ir kitas tyrimas, kuriame buvo parodyta, kad JCPyV Agno baltymas sąveikauja su VP1 ir skatina VP1 pentamerų formavimąsi, o jo nebuvimas lemia didesnę netaisyklingos formos virionų susiformavimo dažnį (Suzuki et al., 2012). JCPyV Agno baltymas taip pat gali jungtis prie membranų, padidinti plazminės membranos pralaidumą, o jo iškrita sutrikdo virusų išėjimą iš ląstelės (Suzuki et al., 2010). Kitame tyrime su BKPyV virusu, kuriame Agno genas buvo ne pašalintas, o mutuotas ATG pradžios kodono srityje, taip pat buvo parodyta, kad Agno geno mutantai nebegalėjo išeiti iš ląstelių (Panou et al., 2018). Priešingi rezultatai buvo gauti Sariyer et al. tyrime su SV40 ir JCPyV mutantais, kuriuose įvedus mutaciją Agno geno ATG pradžios kodone, mutantinių virusų sugebėjimo išeiti iš ląstelių efektyvumas išliko panašus kaip ir laukinio tipo virusų (Sariyer et al., 2011). Priežastys, lemiančios skirtingus tyrimų rezultatus, susijusius su Agno baltymo funkcija PyV išėjimo iš ląstelės procese, išlieka neaiškios.

APyV virusai vėlyvųjų genų regiono pradžioje koduoja ir kitą struktūrinį, jiems unikalų VP4 baltymą, prieš tai vadintą Agno baltymu 1a (176 ar.). Manoma, kad jis dalyvauja virionų formavime, kadangi jo iškrita lemia netaisyklingų viruso dalelių susidarymą (Johns et al., 2007). VP4 baltymas sąveikauja tiek su VP1, tiek gali nespecifiškai jungtis prie DNR su savo į leucino

užtrauktuką panašiu motyvu (angl. *leucine zipper-like motif*), todėl manoma, kad jis galbūt dalyvauja APyV genomo pakavime (Johnė ir Müller, 2001). Be to, VP4 baltymas galimai prisideda prie viruso išėjimo iš ląstelės, kadangi buvo parodyta, kad jo sintezė Sf9 vabzdžių ir vištos embrioninėse ląstelėse sukėlė ląstelių apoptozę (Johnė et al., 2000).

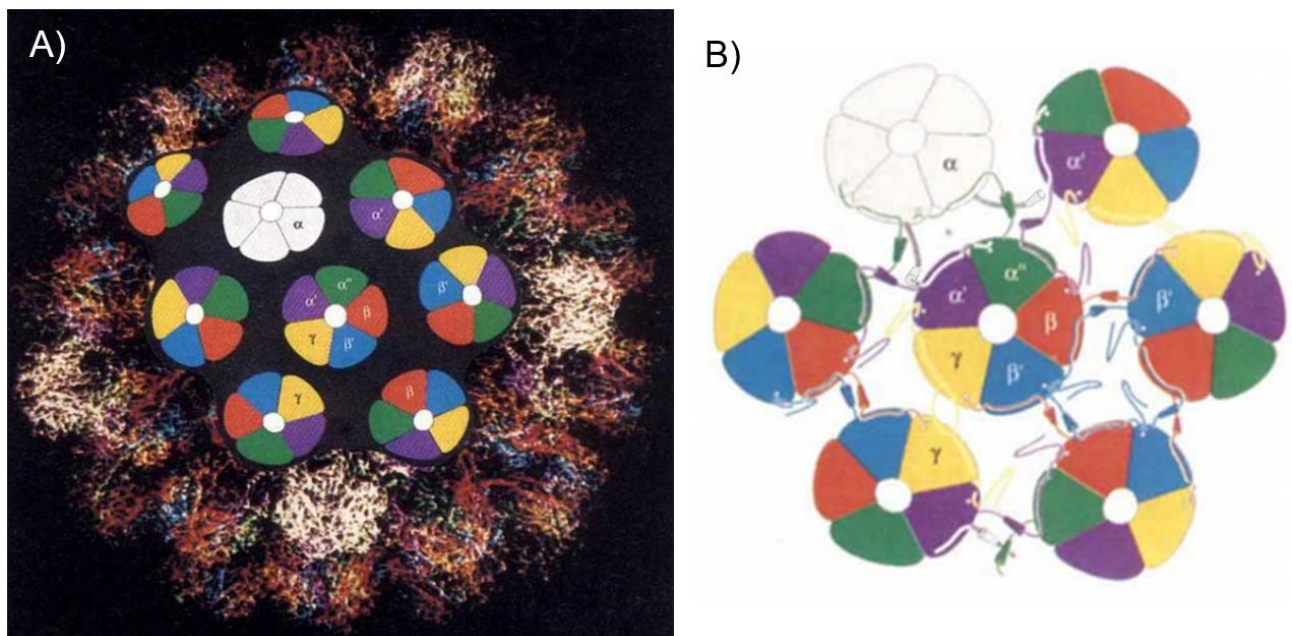
Visi daugiausia ištirti PyV (SV40, BKPyV, JCPyV, MPyV, MCPyV) genomuose koduoja mikro RNR (miRNR), kuri yra komplementari ankstyvojo regiono mRNR (Zou ir Imperiale, 2021). Skirtingų PyV miRNR geba jungtis prie skirtingų ankstyvųjų genų mRNR sričių ir taip reguliuoti jų raišką (Imperiale, 2015). Be to, jos gali atpažinti ir šeimininko ląstelių mRNR, kas manoma gali prisidėti prie imuninės sistemos atsako išvengimo (Zou ir Imperiale, 2021). Archetipiniame BKPyV variante (t.y. dažniausiai populiacijoje aptinkamas variantas) taip pat buvo parodyta miRNR įtaka virusinės DNR replikacijos reguliavime, kadangi mutacija panaikinus miRNR raišką, gerokai padidino BKPyV replikacijos efektyvumą (Broekema et al., 2013). Kituose PyV, jos įtaka virusinės DNR replikacijai gali skirtis, pvz., miRNR raiškos panaikinimas SV40 viruse neturėjo jokio poveikio jo replikacijos efektyvumui (Sullivan et al., 2005).

1.3 Poliomos virusų viriono struktūra ir sąveikos kapsidėje

PyV genominė DNR yra susijungusi su šeimininko ląstelės histonais: H2A, H2B, H3 ir H4, ir tai suformuoja į chromatiną panašią struktūrą, vadinamą minichromosoma (Pagano, 1984). Minichromosomos sudėtyje nėra H1 histono, dalyvaujančio chromatino kompaktizacijoje (Xiao et al., 2012), todėl manoma, kad minichromosoma nėra pilnai kompaktizuota. Ji yra aptinkama tiek infekuotoje ląstelėje, tiek subrendusio viriono viduje.

PyV virionai neturi lipidinio apvalkalo, o jų 40-45 nm kapsidę sudaro VP1, VP2 ir VP3 baltymai. Iki šiol rentgeno kristalografijos arba kriogeninės elektroninės mikroskopijos (krio-EM) metodais buvo ištirtos pelių MPyV (Rayment et al., 1982.; Stehle et al., 1994, Stehle ir Harrison, 1996), beždžionių SV40 (Baker ir Bina., 1988; Liddington et al., 1991; Stehle et al., 1996.), paukščių APyV (Shen et al., 2011), žmogaus BKPyV (Hurdiss et al., 2018) ir MCPyV (Bayer et al., 2020) kapsidžių struktūros. Visą PyV kapsidės išorinį sluoksnį suformuoja 360 VP1 baltymų, susijungusių į 72 pentamerus (žr. 2A Pav.). Susijungę VP1 pentamerai suformuoja ikosaedrinę struktūrą, kuri pasižymi T=7 dešinės pusės simetrija. Joje šešiasdešimt VP1 pentamerų užima šešiavalentes pozicijas – juos supa šeši pentamerai iš šonų, o dvylika pentamerų yra apsupti penkių pentamerų – jie užima penkiavalentes pozicijas (žr. 2A Pav.) (Liddington et al., 1991). Nuo

kiekvieno VP1 pentamero į šonus išsitiesia penkios C-galo „rankos“ (SV40 VP1 tai paskutiniųjų ~60 ar. liekanos), per kurias jie sąveikauja su kitais greta esančiais pentameriais (žr. 2B Pav.) (Liddington et al., 1991). Dėl penkiavalenčių–šešiavalenčių pentamerų išsidėstymo kapsidėje, VP1 monomerai atsiduria šešiose skirtingose sąveikų aplinkose (pagal tai monomerai pavadinti: α , α' , α'' , β , β' ir γ), kuriose jų C-galų rankos užima šešias skirtingas konformacijas. Ši C-galo rankų sritis yra skirstoma į tris regionus: C spiralę (SV40: 302-314 ar. liekanos), C intarpą (SV40: 315-344 ar. liekanos), ir C kilpą (SV40: 345-361 ar. liekanos). VP1 monomerų C spiralės ir C kilpos yra skirtingų konformacijų, o C intarpas visuose monomeruose sąveikauja vienodai (Liddington et al., 1991). Pagal tai, kaip VP1 monomerų C-galo rankos sąveikauja tarp pentamerų, galima išskirti tris sąveikų tipus. Vienoje sąveikoje dalyvauja α , α' , ir α'' VP1 monomerai (vienas penkiavalentis ir du šešiavalenčiai monomerai), kurių C spiralės cikliška išsidėsčiusios sąveikauja tarpusavyje (žr. 2B Pav.). Kitose dviejose sąveikose dalyvauja du šešiavalenčiai VP1 monomerai: vienoje β ir β' monomerai tarpusavyje sąveikauja su C spiralėmis (žr. 2B Pav.), o kitoje: γ monomerai sąveikauja per nestruktūrizuotus C-galo regionus (kapsidėje γ monomerai labai priartėja vienas prie kito ir todėl manoma, kad nesusiformuoja C spiralės).



2 Pav. SV40 poliomos viruso kapsidę sudarančių VP1 pentamerų išsidėstymo ir sąveikos tarp jų C-galo rankų schema

Penkiavalentėje pozicijoje esantis VP1 pentameras pažymėtas baltai, o esantis šešiavalentėje pozicijoje – spalvotai. Skirtingose pentamero-pentamero sąveikų aplinkose esantys VP1 monomerai pažymėti skirtingomis spalvomis ir pavadinti: α , α' , α'' , β , β' ir γ . B) Nuo pentamerų išsitiesiančios C-galo rankos prasideda C spiralėmis (pažymėtos cilindrais), tuomet formuoja C intarpus (linijas, įsiterpusios į kito pentamero VP1 monomerą) bei C kilpas (į kabliuką panašios struktūros tarp

pentamerų). Tarp α , α' ir α'' monomerų C spirālės sąveikauja išsidėsčiusios ratu, tarp β ir β' monomerų – jos sąveikauja poroje, o γ monomerai neturi C spiralių ir jie sąveikauja nestruktūrizuotomis C-galo grandinėmis. Redaguota pagal Liddington et al., 1991.

Sąveikas tarp pentamerų stabilizuoja Ca^{+2} jonai ir disulfidiniai ryšiai. SV40 VP1 pentamere buvo nustatytos dvi potencialios Ca^{+2} surišimo sritys (Stehle et al., 1996), o kitų eksperimentiškai tirtų PyV kapsidėse taip buvo nustatytos dvi potencialios Ca^{+2} surišimo sritys, analogiškos abiem SV40 sritims (MPyV; Stehle ir Harrison, 1996) arba - vienai iš SV40 sričių (BKPyV ir MCPyV) (Hurdiss et al., 2018; Bayer et al., 2020). Disulfidiniai ryšiai tarp gretimų VP1 pentamerų susiformuoja tarp Cys114 ar. liekanų SV40 ir BKPyV kapsidėje, tačiau pagal krio-EM duomenų elektronų tankį taip pat yra manoma, kad BKPyV kapsidėje tarp tam tikrų VP1 baltymų, esančių skirtinguose pentameruose, gali potencialiai susiformuoti Cys9-Cys104 disulfidinis ryšys. Tuo tarpu MPyV VP1 Cys114 ar. liekana (analogiška SV40 VP1 Cys104) sudaro disulfidinį ryšį su Cys19 liekana (SV40 VP1 baltyme šioje pozicijoje yra prolinas), kuri priklauso VP1 monomerui tame pačiame pentamere, o ne gretimame. Nepaisant to, šis ryšys taip pat prisideda prie VP1 pentamero-pentamero sąveikos, sutvirtindamas šalia įsiterpusią gretimą pentamero C-galo ranką. Disulfidiniai ryšiai pentamero viduje taip pat buvo rasti ir MCPyV struktūroje tarp VP1 baltymų Cys25 ir Cys117 ar. liekanų (Bayer et al., 2020). Šio ryšio Cys25 ar. liekana nėra analogiška MPyV VP1 Cys19 liekanai, sudarančiai Cys19-Cys114 disulfidinį ryšį, tačiau Cys117 ar. liekana yra analogiška MPyV VP1 Cys114 liekanai (bei SV40 Cys104). MCPyV struktūroje taip pat buvo aptikti tarp neįprastų Cys pozicijų (Cys18-Cys24) susiformuojantys disulfidiniai ryšiai tarp VP1 pentamerų (Bayer et al., 2020).

Gausius kontaktus pentamerų viduje tarp VP1 monomerų lemia specifinė šių baltymų struktūra. Jų centrinę dalį sudaro aštuonios konservatyvios antilygiagrečiai išsidėsčiusios β klostės (vienoje pusėje: B, I, D, G, kitoje: C, H, E, F), susilanksčiusios į superantrinę „jelly-roll“ struktūrą, plačiai paplitusią tarp virusinių kapsidinių baltymų (Cheng ir Brooks et al., 2013). Ne tik centrinės, o bendrai visos tarpusavyje sąveikaujančios antilygiagrečios β klostės SV40 struktūroje yra apibrėžtos kaip: AJBIDG2 ir CHEFG1⁻ (žr. 3 Pav.) (Stehle ir Harrison, 1996). Šioje struktūroje G β klostę sudaro G1 ir G2 segmentai, išsidėstę skirtingose plokštumose - BID arba CHEF (žr. 3 Pav.). BIDG2 sąveikauja su N-gale esančia A β klaste (SV40 VP1: 25-30 ar. liekanos), kuri šalia sutvirtina J β klostę (SV40 VP1: 330-336 ar. liekanos – priklauso C intarpui), įsiterpusią iš kito VP1 pentamero C-galo rankos (žr. 3 Pav.). Tuo tarpu CHEF struktūra sąveikauja su prieš laikrodžio rodyklės kryptimi (angl. *anticlockwise*) esančio VP1 monomero G1 segmentu. Ši sąveika

konservatyvi ir MPyV, todėl yra apibrėžta kaip: CHEFG1⁻ (su „-“ viršutiniu indeksu prie G1) (žr. 3 Pav.). Kiti kontaktai pentamerų viduje susidaro tarp struktūriškai variabilių kilpų, kurios jungia centrinės dalies β klostes vieną su kita. Plačiausiuose kontaktuose dalyvauja BC2, DE ir EF kilpos, kurios išsidėsto VP1 baltymų paviršiuje. DE kilpa sąveikauja su pagal laikrodžio rodyklės kryptimi (angl. *clockwise*) esančio VP1 monomero CHEFG1⁻ klostė ir EF kilpa, užpildydama tarpą tarp jų. Be to, DE kilpos viršūnė priartėja ir sąveikauja su HI⁺ kilpa („+“ viršutinis indeksas žymi pagal laikrodžio rodyklės kryptį išsidėsčiusio VP1 monomero kilpą), o pastaroji sąveikauja su prieš laikrodžio rodyklės kryptimi išsidėsčiusio VP1 monomero DE⁺ kilpos viršūne. Šie kontaktai, kartu su BC2 kilpos viršūnės sąveika su DE⁻ ir BC1⁻ kilpomis, užtikrina pentamerų stabilumą, užpildydami tarpus viruso kapsidės paviršiuje.



3 Pav. SV40 poliomos viruso VP1 baltymo struktūros ir jo sąveikos su kitais VP1 monomerais kapsidėje modelis

Rudai pažymėtos F⁺ ir G1⁻ β klostės, priklausančios skirtingiems VP1 monomerams iš to paties pentamero. Rausvai raudona spalva pažymėta C-galo ranka, įsiterpusi iš greta esančio pentamero. Redaguota pagal Stehle et al., 1996.

Pagrindiniai žinomi struktūriniai skirtumai tarp SV40 ir žmonės infekuojančių poliomos virusų BKPyV ir MCPyV VP1 baltymų, be sudaromų disulfidinių ryšių (minėta aukščiau), yra CD kilpose (BKPyV) ir C-gale, nes MCPyV VP1 baltymas turi papildomą 37 ar. regioną, kurio funkcija nėra žinoma. Tuo tarpu juos lyginant su MPyV ir APyV VP1 baltymais, pagrindiniai struktūriniai skirtumai aptinkami su paviršiumi kontaktuojančiose kilpose: BC, DE, EF, H1 (Shen et al., 2011).

APyV VP1 baltymas (343 ar.) taip pat pasižymi trumpesniu C-galu, kuris baigiasi ties C kilpos viduriu, o tai lemia įvairaus dydžio APyV kapsidžių formavimąsi (38–65 nm) (Shen et al., 2011).

PyV VP1 baltymo N-galas (iki 15 ar. liekanos) turi DNR surišimo domeną, kuris pagal eksperimentinius struktūrinius duomenis, manoma yra susilankstęs į kapsidės vidų, kur sąveikauja su supakuotu DNR genomu (Chang et al., 1993; Hurdiss et al., 2016).

VP2 ir VP3 baltymai ir jų sąveikos kapsidėje yra tik dalinai eksperimentiškai ištirtos. Žinoma, kad viena kopija VP2/VP3 savo C-galu (269-296 ar. liekanos) įsiterpia į VP1 pentamero ertmę, susilankstydamas į plaukų segtuko formą panašią konformaciją (Chen et al., 1998). Joje VP2 baltymas įsitvirtina sudarydamas hidrofobinius kontaktus su trimis VP1 monomerais. Struktūriniai duomenys rodo, kad VP2/VP3 baltymai, kaip ir VP1 baltymas, galimai sąveikauja su supakuota virusine DNR, tačiau kol kas nėra aukštos raiškos duomenų, patvirtinančių šiuos kontaktus (Hurdiss et al., 2016).

APyV VP4 baltymas sąveikauja tiek su DNR, tiek su VP1, o VP4 iškrita sutrikdo efektyvų viruso dalelių susirinkimą (Johnė ir Müller, 2001; Johnė et al., 2007). Tai leidžia manyti, kad VP4 baltymas taip pat yra APyV kapsidės komponentas, tačiau dar nėra jokių tvirtai tai patvirtinančių aukštos raiškos struktūrinių duomenų.

1.4 Poliomos virusų taksonomija

Virusų klasifikacija remiasi virusų apibūdinimu pagal tam tikrus bruožus ir šių bruožų palyginimu, taip atskiriant vienus virusus nuo kitų. Tokių bruožų pavyzdžiais galėtų būti: šeimininkų ratas, patogeniškumas, kapsidės struktūra, viruso apvalkalo buvimas ar nebuvimas, geno dydis, jo molekulinė sudėtis ir genų raiškos mechanizmai. Kartu su šiais bruožais, virusų sekų palyginimas ir jų panašumo nustatymas taip pat yra svarbus ir dažnai naudojamas būdas virusų taksonams apibrėžti ir atskirti. Remiantis nauju 2025 m. tarptautinio virusų taksonomijos komiteto (ICTV, angl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*) leidimu (<https://ictv.global/taxonomy>) virusai klasifikuojami į 368 šeimas, iš kurių viena yra ir poliomos virusų šeima. Kaip atskira šeima PyV tapo tik nuo 2000 m. Prieš tai jie kartu su papilomos virusais (PV) buvo klasifikuojami bendroje *Papovaviridae* šeimoje – manyta, kad šios dvi virusų grupės turi pakankamai panašius morfologinius ir genominius bruožus. Vėliau buvo pripažinta, kad šie virusai vis dėlto pasižymi pakankamai reikšmingais skirtumais, todėl jie buvo išskirti į dvi atskiras šeimas (Villiers et al., 2004). Tarp skirtumų, į kuriuos buvo atsižvelgta, yra morfologija (kapsidės dydis: PyV: ~45 nm, o PV: ~55 nm), geno dydis (PyV: ~5000 bp, o PV: ~8000 bp), geno

organizacija (PyV: ankstyvieji ir vėlyvieji genai koduojami dviejose priešingai nukreiptose grandinėse, o PV – vienoje) ir mažas sekų panašumas (Villiers et al., 2004).

Šiuo metu ICTV yra patvirtinusi 122 PyV rūšis, kurios pagal LTA_g baltymo seką yra klasifikuojamos į 8 gentis: Alfa-, Beta-, Gama-, Delta-, Epsilon-, Eta-, Teta- ir Zeta- poliomos virusus (<https://ictv.global/taxonomy>). Iš jų Alfa-, Beta-, Delta-, Zeta- ir Epsilon- poliomos virusų šeimininkai yra žinduoliai, Gamapoliomos virusų – paukščiai, o Eta- ir Tetapoliomos virusų – žuvis. PyV klasifikacijai naudojamos LTA_g baltymų, o ne genominės DNR sekos, remiantis tuo, kad kai kurių žinduolių PyV genomuose buvo nustatyta rekombinacija tarp ankstyvojo ir vėlyvojo genų regionų, tad lyginant rekombinantinius PyV pagal visą geno_mo seką, jie gali būti netinkamai priskirti tam tikrai genčiai (Spencer et al., 2016). Be to, LTA_g, o ne VP1 ar VP2 baltymų sekų pasirinkimą klasifikacijai lėmė tai, kad LTA_g sekos mažiau varijuoja (lėtesnė divergencija) tarp skirtingų poliomos virusų (Spencer et al., 2016), kas leidžia lengviau analizuoti filogenetinius ryšius.

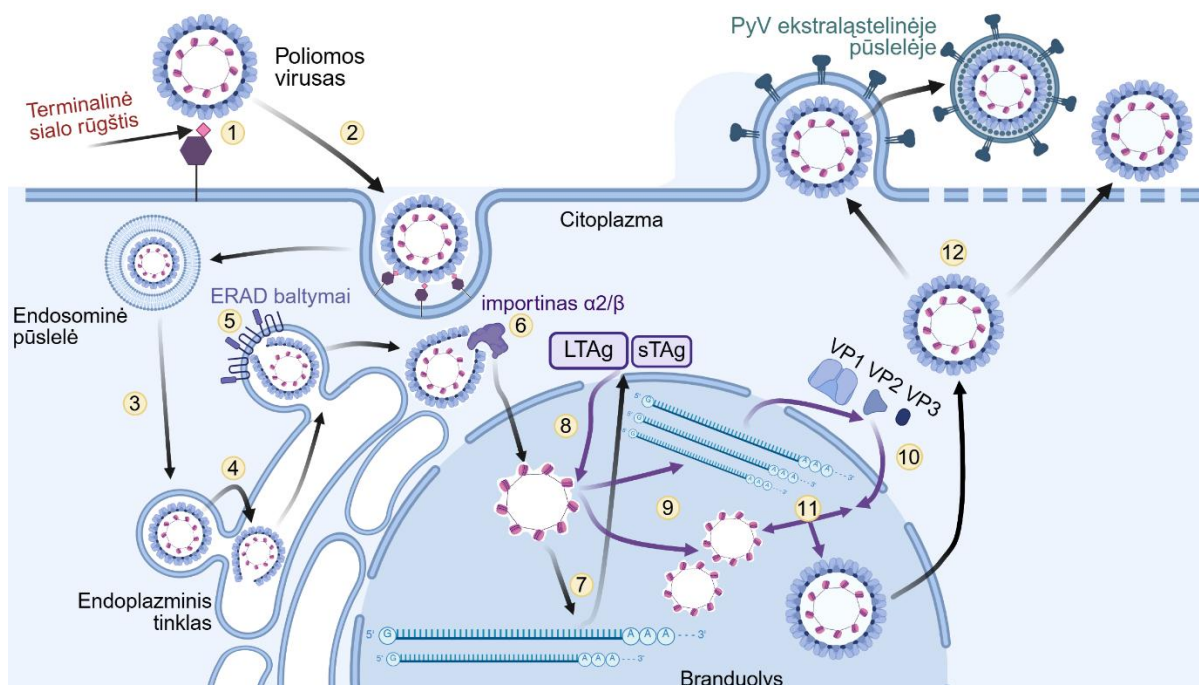
Nepaisant to, kad naujų PyV sekų atrandama vis daugiau, nemaža jų dalis nepriskiriama atskiroms PyV rūšims, nes neatitinka vieno ar kelių ICTV nustatytų kriterijų (Spencer et al., 2016). Siekiant sėkmingai priskirti PyV atskirai rūšiai, reikalinga, kad būtų patenkinti keturi kriterijai. Pirmas: atrastos PyV sekos turi būti prieinamos viešose duomenų bazėse ir jų prieinamumas turi būti paminėtas publikuotame recenzuotame/redaguotame moksliniame žurnale. Antras ir trečias kriterijai nurodo, kad atrastam PyV turi būti būdinga įprasta PyV geno_mo organizacija ir reikalauja, kad būtų pagrįstas PyV priskyrimas tam tikram šeimininkui, kartu įvardijant kokiais metodais tai buvo nustatyta. Ketvirtas kriterijus nurodo, kad LTA_g baltymo seka turi skirtis daugiau negu 15 % nuo kitų žinomų PyV rūšių. Penktame (paskutiniame) kriterijuje nurodyta, kad ketvirtas kriterijus gali negalio_ti tik tada jei pakanka informacijos pagrįsti, kad tam tikras PyV pasižymi kitokiu šeimininkų ratu, audinių tropizmu ar sukeliamomis ligomis.

Be kriterijų, taikomų naujoms PyV rūšims priskirti, ICTV taip pat nustatė principus, pagal kuriuos turi būti pavadinami PyV (Spencer et al., 2016). Tokia standartizacija buvo reikalinga dėl gausiai didėjančio naujų PyV atradimo skaičiaus bei dėl to, kad pirmųjų atrastų PyV pavadinimai buvo nesistemiški ir priskirti pagal tokius principus, kaip: pacientų vardas (Pavyzdžiui: BKPyV – B.K., JCPyV – J.C.) ar pagal PyV infekuojamą šeimininką ir tyrėjo suteiktą numerį (SV40 – Simian virus 40). Tuo tarpu pagal ICTV suformuluotus principus PyV pavadinimai turi būti sudaromi nurodant šeimininko rūšį, po to – žodžių junginį „poliomos virusas“ ir galiausiai numerį,

atspindintį, kelintas PyV buvo publikuotas/atrastas toje šeimininko rūšyje (Pavyzdžiui: *Pan triglodytes* poliomos virusas 3).

1.5 Poliomos virusų infekcinis ciklas

Visi iki šiol tirti poliomos virusai prisijungia prie ląstelių per kapsidės paviršiuje esančių VP1 baltymų kilpų sąveiką su sialo rūgšties liekanomis, esančiomis ląstelės paviršiaus glikanuose (žr. 4 Pav.) (Neu et al., 2008; Mayberry ir Maginnis, 2020). Dauguma PyV jungiasi prie gangliozidų (glikolipidų poklasis) kaip pirminių receptorių (Neu et al., 2008; Gilbert et al., 2005; Low et al., 2006), tačiau kai kurie juos naudoja kaip antrinius receptorius (Neu et al., 2012), o kiti, kurie turi jiems mažą afiniškumą kaip JCPyV, jungiasi prie laktosės tetrasacharido c, kuris gali būti prijungtas prie glikolipidų ar glikoproteinų (Ströh et al., 2015). Susijungus su receptoriais, dauguma PyV (pvz., SV40, MPyV, BKPyV, MCPyV) patenka į ląsteles nuo kaveolino priklausomos endocitozės būdu, tačiau JCPyV išsiskiria tuo, kad patekimui naudoja nuo klitrino priklausomą endocitozę (Mayberry ir Maginnis, 2020). Nepaisant to, tyrimai rodo, kad SV40 (Damm et al., 2005), BKPyV (Zhao et al., 2016) ir MPyV (Gilbert et al., 2004) gali patekti į ląsteles ir alternatyviais, nuo kaveolino nepriklausomais mechanizmais.



4 Pav. Poliomos virusų infekcinio ciklo schema

(1) PyV infekcinis ciklas prasideda jiems prisijungus prie sialo rūgšties, esančios ant ląstelės paviršiaus receptorių. (2) Į ląstelės vidų PyV gali patekti nuo kaveolino (SV40, MPyV, BKPyV,

MCPyV) ar klatrino (JCPyV) priklausomos endocitozės būdu. (3) Patekus į vidų PyV keliauja endosominėmis pūslelėmis iki ET, kur (4) dėl įvykusių kapsidės konformacinių pokyčių atidengiami VP2 ir VP3 baltymai, buvę kapsidės viduje. (5) Šie baltymai įsiterpia į ET membraną ir aktyvuoja ERAD baltymus. (6) Tai lemia PyV patekimą į citoplazmą, kur bent vienas iš struktūrinių VP1, VP2 ar VP3 baltymų sąveikauja su importinu $\alpha 2/\beta$, dalyvaujančiu PyV transporte į branduolį. (7) Jame iš pradžių vyksta PyV ankstyvųjų genų (LTag ir sTag) raiška, kurių produktai aktyvuoja virusinės DNR replikaciją (8) ir skatina ląstelių transformaciją. (9) Prasidėjus replikacijai pereinama prie vėlyvųjų genų raiškos aktyvinimo – sintetinami struktūriniai VP1, VP2 ir VP3 baltymai, kurie (10) iš citoplazmos patenka į branduolį, kur (11) jungiasi su PyV minichromosoma, susiformavusia iš replikuotos virusinės DNR ir šeimininko histonų, taip sudarydami virionus. (12) Susiformavę virionai palieka ląsteles po jų lizės, tačiau kai kurie PyV (BKPyV ir JCPyV) buvo aptikti ekstraląstelinėse pūslelėse, kas rodo, kad jie gali išeiti iš ląstelių ir nelitiniu būdu. Iliustracija sukurta su Biorender.com

Patekus į ląstelę, SV40, MPyV, BKPyV ir MCPyV virusai, endosominėmis pūslelėmis keliauja į ankstyvąsias, o vėliau į vėlyvąsias endosomas iš kurių patenka į ET (žr. X Pav.) (Mayberry ir Maginnis, 2020). Tuo tarpu JCPyV virusai, patekę į ląstelę, taip pat endosominėmis pūslelėmis keliauja į ankstyvąsias endosomas, tačiau vėliau patenka į kaveolino-1+ pūsleles ir jomis keliauja iki ET (Querbes et al., 2006). Žemas vėlyvųjų endosomų pH yra būtinas MPyV virusų infektyvumui (Liebl et al., 2006). Jis sukelia MPyV kapsidės konformacinius pokyčius ir taip paruošia ją disociacijai prieš patenkant į ET (Qian et al., 2009). Sėkmingai BKPyV (Eash et al. 2004; Jiang et al., 2009), JCPyV (Querbes et al., 2006) ir MCPyV (Becker et al., 2019), bet ne SV40 (Ashok ir Atwood, 2003), virusų ląstelinei infekcijai taip pat yra reikalinga rūgštinė aplinka viduląstelinuose kompartmentuose, dalyvaujančiuose viruso pernašoje iki ET.

PyV patekimas į ET dar nėra pilnai ištirtas. MPyV atveju GD1a ganglioizido receptoriaus yra reikalingas efektyviam viruso patekimui iš vėlyvųjų endosomų į ET, kas rodo, kad jis galimai dalyvauja MPyV nukreipime į ET (Qian et al., 2009). Iki šiol nustatyti tik BKPyV ląstelinei infekcijai reikalingi šeimininko ląstelių komponentai, atsakingi už virusą turinčių pūslelių prisijungimą prie ET ir jų membranų susiliejimą (Zhao ir Imperiale, 2017). Šie komponentai yra Rab18 GTPazė, sintaksinas-18 (t-SNARE baltymas) ir NRZ prisirišimo kompleksas. PyV patekus į ET, jų kapsidės disociaciją skatina ten esantys redokso fermentai ir baltymų disulfidų izomerazės, kurie redukuoja ir izomerizuoja disulfidinius ryšius, dalyvaujančius kapsidės struktūros stabilizacijoje (Horníková et al., 2020). Šis procesas kartu su ET šaperonų atliekamu VP1 baltymų C-galo sąveikų išardymu (šios sąveikos tarpusavyje jungia VP1 pentamerus), veda prie kapsidės konformacinių pokyčių ir kapsidės viduje buvusių VP2 bei VP3 baltymų atidengimo, dėl ko jie gali sąveikauti su šeimininko viduląstelinės aplinkos komponentais (Walczak ir Tsai, 2011). Tyrime su SV40 virusu buvo parodyta, kad po tokių konformacinių pokyčių atidengtų VP2 baltymų

hidrofobinės sekos gali įsiterpti į ET membraną (Geiger et al., 2011; Mayberry ir Maginnis, 2020). Manoma, kad tai suaktyvina su ET susijusios degradacijos (ERAD, angl. *ER-associated degradation*) veiksnius, kurie pritraukia kitus šeimnininko baltymus, padedančius SV40 patekti iš ET į citozolį (žr. 4 Pav.) (Geiger et al., 2011). Panašiais mechanizmais manoma į citozolį patenka ir MPyV virusai (Geiger et al., 2011). Po patekimo į citoplazmą SV40 baltymai geba pritraukti motorinį baltymą – dineiną-1, kuris prisijungia prie kapsidinių baltymų, juos mechaniškai tempia ir taip vykdo tolimesnę kapsidės disociaciją (Ravindran et al., 2018). Hsc70 šaperonas jungdamasis prie SV40 ir MPyV virusų kapsidžių, manoma, taip pat gali prisidėti prie jų disociacijos citoplazmoje (Chromy et al., 2006; Ravindran et al., 2015) bei galimai papildomai apsaugoti virusą nuo degradacijos (Mayberry ir Maginnis, 2020). **SV40 ir** BKPyV transportui iš citoplazmos į branduolį yra būtina atidengtų VP2/VP3 baltymų NLS sekų sąveika su importino $\alpha 2/\beta$ kompleksu (žr. 4 Pav.), nes VP1 NLS nepakanka transportui į branduolį (Nakanashi et al., 2002; Bennett et al., 2015). Tuo tarpu JCPyV ir MCPyV transportui į branduolį pakanka ir vienos VP1 NLS sekos (Qu et al., 2004; Schowalter ir Buck, 2013), o MPyV virusai geba patekti į branduolį tiek naudodami VP1 baltymo, tiek ir VP2/VP3 baltymų NLS seką (Soldatova et al., 2018).

PyV virusų minichromosomai patekus į branduolį prie PyV ankstyvųjų genų regiono promotoriaus ir stipriklių jungiasi šeimnininko ląstelės transkripcijos veiksniai ir inicijuoja transkripciją. Pavyzdžiui, žinoma, kad Sp1, NF1, NF-kB ir Ets-1 TF reguliuoja BKPyV transkripciją (Walder et al., 2025). Susintetintas ankstyvojo regiono transkriptas alternatyviai splaisuojamas. Iš gautų mRNR transliuojami LTA_g ir sTA_g baltymai, o kai kurių PyV ir MTA_g baltymas (Treisman et al., 1981; Meijden et al., 2015). Susintetintas LTA_g baltymas jungiasi prie virusinės DNR replikacijos pradžios sekos, oligomerizuojasi į dvigubą heksamerą - sudarydamas aktyvią helikazę, kuri išvynioja DNR ir inicijuoja replikaciją (An et al., 2012). Prie replikacijos pradžios vietos LTA_g taip pat pritraukia ir kitus replikacijai reikalingus šeimnininko baltymus, skatina ląstelės ciklo progresiją ir ląstelių transformaciją bei indukuoja DNR pažaidų atsaką (aptarta: Googins et al., 2025). Jis taip pat gali auto-reguliuoti ankstyvųjų genų transkripciją ir ją slopinti, prisijungdamas prie NCCR regiono, kai susintetinamas pakankamas LTA_g baltymų kiekis (Rio ir Tjian, 1983). Kitas ankstyvasis sTA_g baltymas atlieka svarbų vaidmenį tiek skatinant infekuotų ląstelių transformaciją, tiek virusinės DNR replikaciją (Chen et al., 2007; Kwun et al., 2009; Bollag et al., 2010), išskyrus BKPyV virusų sTA_g, kuris slopiną virusinės DNR replikaciją ir LTA_g raišką (Zou ir Imperiale, 2023).

Perėjimas prie efektyvios vėlyvųjų genų raiškos prasideda tik po virusinės DNR replikacijos inicijavimo (Liu ir Carmichael, 1993). Po jos įvyksta RNR brendimo pokyčiai: sumažėja vėlyvojo regiono transkripcijos terminacijos efektyvumas dėl kurio formuojasi multigenominio ilgio transkriptai, Šie transkriptai splaisuojami į stabilias vėlyvųjų genų mRNR, nuo kurių įprastai susintetinami VP1, VP2 ir VP3 struktūriniai kapsidiniai baltymai ir kai kuriuose PyV – nestruktūrinis Agno baltymas (Huang ir Carmichael, 2009; Garren et al., 2015), ar VP4 – paukščių PyV struktūrinis baltymas (Johns ir Müller, 2001). Po vėlyvojo regiono transkripto splaisingo susidarę intronai jungiasi prie ankstyvųjų genų mRNR, taip sukeldami jų degradaciją ir taip prisidėdami prie ankstyvųjų genų raiškos slopinimo (Huang ir Carmichael, 2009). Citoplazmoje susintetinti kapsidiniai baltymai patenka į branduolį ir jungiasi su PyV minichromosoma, kuri po replikacijos susiformuoja virusinei DNR susijungus su šeimininko histonais (žr. 4 Pav.) (Pagano, 1984). Minichromosomos ir kapsidės jungimosi mechanizmas nėra aiškus, bet manoma, kad specifinis SV40 virusinės minichromosomos supakavimas į kapsidę gali būti inicijuojamas šeimininko Sp1 baltymui prisijungus prie viruso genome esančios ses supakavimo signalinės sekos (angl. *Simian virus 40 Encapsidation Signal*) ir prie jos pritraukus kapsidinius baltymus (Mukherjee et al., 2007).

Suformuoto PyV viriono išėjimo iš ląstelės mechanizmai taip pat išlieka menkai suprasti nepaisant intensyvių šios srities tyrimų. Žinoma, kad BKPyV virionų išėjimui iš branduolio ir ląstelės yra būtinas Agno baltymas, kuris sąveikauja su α -SNAP baltymu, reguliuojančiu viduląstelinių membranų susiliejoimo procesus, todėl tai galimai leidžia virionams patekti į sekretorinį kelią ir pasinaudoti juo išeinant iš ląstelės (Panou et al., 2018). Tuo tarpu JCPyV Agno baltymas gali įsiterpti į membranas, padidinti plazminės membranos pralaidumą ir galimai skatinti ląstelės lizę, taip palengvindamas virionų išėjimą iš ląstelės (Suzuki et al., 2010). Vis dėlto jo vaidmuo šiame procese yra vertinamas prieštaringai (Sariyer et al., 2011). Ekstraląstelinėse pūslelėse aptikti BKPyV (Handala et al., 2020) ir JCPyV (Love et al., 2019) virusai rodo, kad PyV gali palikti ląsteles ir nelitiniu būdu (žr. 4 Pav.)

1.6 Poliomos virusų plitimo keliai, organų tropizmas ir sukeliamos ligos

Žmogaus poliomos virusai yra plačiai paplitę populiacijoje. Jų pirminė infekcija dažniausiai įvyksta vaikystėje ir įprastai yra besimptomė. PyV dažniausiai išlieka organizme ilgą laiką, palaikomi labai žemo lygio replikacijos (White et al., 2013). Individue, kurių imuninė sistema yra itin susilpnėjusi, pavyzdžiui dėl imunosupresinės terapijos, po inkstų ar kaulų čiulpų

transplantacijos ar sergant ŽIV/AIDS, PyV gali reaktyvuotis ir sukelti sunkius neurologinius, nefrologinius ar onkologinius susirgimus (Pinto ir Dobson, 2014).

Iki šiol dar nėra aiškiai žinoma, kaip PyV plinta, tačiau manoma, kad tai vyksta per tiesioginį kontaktą su kitu žmogumi bei netiesiogiai: per aerozolį, fekalinį-oralinį kelią, užkrėstus paviršius, maistą ir vandenį (Decaprio ir Garcea, 2013; Hirsch et al., 2014). PyV perdavimas tarp skirtingų žinduolių rūšių (zoonozė) yra laikomas itin retu reiškiniu (Tan et al., 2020; Kamminga et al., 2023), kol kas patikimai parodytas tik tarp simpatrinės bendruomenės gyvenančių šikšnosparnių (Carr et al., 2017; Tan et al., 2020). Žmonėse iki šiol jis nebuvo aiškiai parodytas, kas nėra stebėtina, atsižvelgiant į tai, kad dauguma PyV pasižymi labai stipria ko-evoliucija su savo šeimininkais (Buck et al., 2016).

Iki šiol iš skirtingų žmonių mėginių yra nustatyta 15 PyV rūšių (13 iš jų yra patvirtinti ICTV), tačiau nėra aišku ar visos jos iš tiesų geba infekuoti žmogaus ląsteles, nes kai kurie PyV galėjo būti nustatyti dėl užkrato (Moens et al., 2020). Nepaisant to, kad skirtingų žmogaus PyV rūšių virusinė DNR gali būti aptinkama įvairiuose organizmo audiniuose, pavyzdžiui: inkstuose, šlapimo takuose, limfoidiniuose audiniuose, centrinėje nervų sistemoje ir odoje (Imperiale ir Jiang, 2016; Houben et al., 2022; Parajuli et al., 2024), produktyvi virusų replikacija vyksta tik tam tikro tipo ląstelėse (HPyV būdingas ląstelių tipo tropizmas). JCPyV virusas produktyviai infekuoja oligodendrocitus smegenyse (Valle ir Oviedo, 2019), BKPyV – inkstų kanalėlių epitelio ląsteles (An et al., 2019). Nėra tiksliai žinoma, kokias ląsteles in vivo produktyviai infekuoja MCPyV, tačiau remiantis in vitro tyrimais, manoma, kad tai gali būti odos fibroblastai, kadangi tik šiose ląstelėse buvo pademonstruota, jog MCPyV geba pilnai pereiti infekcinį ciklą ir sudaryti infektyvius virionus (Loke et al., 2022). Tuo tarpu kitų gyvūnų rūšių PyV, kaip pelių MPyV ir paukščių APyV virusai, pasižymi plačiu audinių tropizmu. Tokia šių virusų savybė buvo patvirtinta įvairiuose tyrimuose, nes MPyV geba eksperimentinėmis sąlygomis sukelti vėžį skirtinguose pelių organuose (Fisher et al., 1983) bei in vitro produktyviai infekuoti įvairių tipų pelės ląsteles (Horníková et al., 2015), o APyV sugeba replikuotis ir formuoti virusines daleles skirtinguose paukščių organuose (Ma et al., 2019; Kim et al., 2022).

Geriausiai ištirti HPyV yra: BKPyV, JCPyV ir MCPyV. Jie visi gali sukelti žmonėms sunkias ligas. Kiek žinoma, iš visų HPyV rūšių, vienintelis MCPyV gali sukelti žmonėms vėžį, konkrečiai – agresyvią Merkelio ląstelių karcinomą. Šio vėžio mirtingumo rodiklis yra aukštas ir siekia 33–46 %, o išgyvenamumas 5 metų laikotarpyje yra mažesnis negu 45 % (Bayer et al., 2020). Net 80 % šio vėžio atvejais MCPyV genomas yra integruotas į šeimininko genomą DNR, kas įprastai nėra

būdinga PyV (Feng et al., 2008). BKPyV viruso reaktyvacijos atvejai dažniausiai nustatomi po inkstų arba kaulų čiulpų transplantacijų, o tai atitinkamai gali lemti nefropatiją ar hemoraginę cistitą (Zhou et al., 2023). Esant JCPyV reaktyvacijai, šis gali sukelti retą ir mirtiną smegenų ligą - progresuojančią daugiažidininę leukoencefalopatiją, kurios rizikos grupėje dažniausiai atsiduria pacientai sergantys AIDS ar gydomi tam tikrų monokloninių antikūnų terapija (Diotti et al., 2013). Dar vienas geriau žinomas HPyV – TSPyV sukelia retą odos ligą, vadinamą trichodysplasia spinulosa, kurios pagrindiniai rizikos veiksniai yra organų transplantacija, imunosupresinė terapija ir ŽIV infekcija (Moore ir Rampton, 2023).

Tyrimai su imunodeficitinėmis ir naujagimėmis pelėmis rodo, jog MPyV infekcija gali sukelti navikų išsivystymą, tačiau natūralių infekcijų metu tai paprastai nevyksta (Gottlieb ir Villarreal et al., 2001). Tuo tarpu paukščiuose, kaip ir žinduoliuose, PyV infekcija sveikuose suaugusiuose individuose įprastai būna besimptomė, tačiau APyV infekcija jaunuose paukščiuose dažnai gali sukelti ūmią sisteminę ligą, pasireiškiančią įvairių audinių pažeidimais ir dideliu mirtingumu (Johns ir Müller, 2007).

1.7 Poliomos virusų kilmė ir filogenezę

PyV ir jiems artimiausi PV virusai yra maži, dvigrandžiai DNR (dgDNR) virusai, infekuojantys eukariotus ir pasižymintys panašia morfologija bei genomo organizacija, kuriai būdingas ankstyvųjų ir vėlyvųjų genų kodavimas. Šių virusų tiek kapsidiniai baltymai, turintys supernantrinę „jelly-roll“ struktūrą, tiek už replikaciją atsakingi baltymai yra homologiški viengrandžių DNR (vgDNR) virusų atitinkamiems baltymams, todėl manoma, kad jie kilo iš vgDNR virusų (Koonin et al., 2015). Įprastai vgDNR virusų baltymas, atliekantis genomo replikacijos funkciją, yra sudarytas iš S3H helikazės domeno ir riedančio rato replikacijos iniciacijos endonukleazės domeno. Pastarajam domenui homologiška sritis, esanti PyV ir PV virusų daugiadomeniame ir helikazės funkciją atliekančiame baltyme, LTA_g ir E1 atitinkamai, neturi endonukleazės fermentinio aktyvumo (Koonin et al., 2015). Greičiausiai tai yra susiję su virusų evoliucija nuo vgDNR iki dgDNR genomų bei perėjimu nuo riedančio rato replikacijos prie žiedinės dgDNR virusams būdingos į „theta“ panašios replikacijos (Koonin et al., 2015). Dar viename tyrime iškelta PyV kilmės hipotezė teigia, kad PyV galėjo kilti iš sudėtingesnių meldvirusų (vidutinio dydžio eukariotinių linijinės dgDNR virusų) per kelis genų praradimo įvykius (Buck et al., 2024). Tokia hipotezė buvo iškelta remiantis tuo, kad nariuotakojų sekoskaitos duomenyse buvo

aptiktos į PyV panašios sekos, kuriose numanomo VP1 kapsidinio baltymo ORF koduoja papildoma C-galo sritį, nebūdingą žinomiems PyV VP1 baltymams.

PyV infekcijos ilgą laiką buvo siejamos tik su žinduoliais ir paukščiais, tačiau per pastarąjį dešimtmetį naujausi tyrimai atskleidė, kad PyV yra aptinkami ir įvairių žuvų rūšyse (Buck et al., 2016; Wen et al., 2016; Doorslaer et al., 2018) bei nariuotakojuose (Buck et al., 2016; Schmidlin et al., 2021). Iš nariuotakojų, kol kas tik skorpionuose buvo nustatytos pilnos PyV genomų sekos su jų įprasta genomo organizacija (Schmidlin et al., 2021), tačiau į PyV panašios sekos buvo aptiktos ir vorų bei vabzdžių viešai prieinamuose sekoskaitos duomenyse (Buck et al., 2016).

Įprastai žinduolių ir paukščių PyV dydžiai svyruoja tarp 4,7 kb ir 5,4 kb. Skorpionuose aptiktų PyV genomų dydžiai yra panašūs arba šiek tiek didesni ir varijuoja tarp 5,4 kb ir 5,9 kb (Schmidlin et al., 2021). Tuo tarpu žuvyse aptiktų PyV sekų dydžiai yra itin variabilūs ir svyruoja nuo 3,9 kb iki 7,4 kb (Doorslaer et al., 2018). Tyrime su *Rhynchobatus djiddensis* gitaržuve buvo aptiktas 3,9 kb PyV genomas, o in situ hibridizacijos metodu buvo aptiktas VP1 signalas žuvies odos pažeidimuose, kas patvirtino aptikto PyV gebėjimą infekuoti žuvies ląsteles (Buck et al., 2016). Žuvyse aptikti PyV jau oficialiai yra priskiriami atskiroms PyV rūšims (<https://ictv.global/taxonomy>), o nariuotakojuose rasti PyV – kol kas dar ne, kadangi, su jais atlikti tyrimai apsiriboja tik PyV sekų aptikimu PGR ir sekoskaitos metodais, kurie pilnai neįrodo PyV infekcijos (Schmidlin et al., 2021).

Remiantis Doorslaer et al., (2018) tyrime atliktu sekų palyginimu pagal penkių žuvyse aptiktų PyV LTA_g ar. sekas, buvo nustatyta, kad žuvų PyV yra itin filogenetiškai nutolę tiek tarpusavyje, tiek nuo amniotų PyV. Šiame tyrime didžiausias panašumas tarp žuvų PyV siekė tik 46 %, nors skirtingų PyV rūšių, priklausančių tai pačiai genčiai, LTA_g panašumas įprastai siekia apie 60 %, o mažiausias – 47,8 % (Doorslaer et al., 2018). Be to, filogenetinės analizės, atliktos lyginant LTA_g, VP1 ir VP2 sekas, rezultatai parodė, kad išsiskiria trys pagrindinės filogenetinės šakos – dvi žuvų PyV (vienoje – su ešeržuvių būriu susiję PyV, kitoje – vienintelis gitaržuvės PyV) ir viena amniotų PyV. Šie duomenys leidžia manyti, kad žuvų PyV galimai kinta greičiau nei amniotų PyV. Minėtame Doorslaer et al., (2018) tyrime taip pat buvo nustatytos neįprastos LTA_g sekos ešeržuvių PyV genomuose, kurios priešingai nei gitaržuvių PyV LTA_g, neturi N-gale esančio J-domeno, o tai rodo, kad šis domenas galėjo būti prarastas vystantis ešeržuvių PyV evoliucinei linijai. Be to, buvo parodyta, kad ne tik ešeržuvėse nustatytų PyV, bet kartu ir gitaržuvėje aptikto PyV LTA_g seka neturi konservatyvaus Rb baltymą surišančio LXCXE motyvo, kas leidžia daryti prielaidą, kad šis motyvas atsirado amniotų PyV, jiems atsiskyrus nuo žuvų PyV. Šią prielaidą komplikuoja tai, kad

skorpionuose aptiktų PyV LTA_g sekose buvo nustatytas tiek J-domenas, tiek LXCXE motyvas (Schmidlin et al., 2021). Viena galimų to interpretacijų galėtų būti, kad skorpionų PyV įgijo LTA_g seką per rekombinaciją su vienu iš PyV protėvių. Dar vienas neįprastas Doorslaer et al., (2018) tyrime nustatytas ešeržuvių ir gitaržuvių PyV bruožas, skiriantis juos nuo žinduolių ir paukščių PyV, yra tai, kad šių žuvų PyV genomuose nėra aptinkamas sTA_g ORF. Vis dėlto šis bruožas nėra būdingas visiems žuvų PyV, pavyzdžiui, *Raja clavata* žuvyje aptikto PyV genome buvo nustatytas numanomas sTA_g genas (Abrantes et al., 2023).

Skorpionuose nustatyti aštuoni PyV yra tarpusavyje pakankamai filogenetiškai artimi - jų LTA_g ar. sekų identiškumas viršija 80 % (Schmidlin et al., 2021). Tuo tarpu, palyginus su kitomis žinomomis PyV rūšimis, jie yra stipriai filogenetiškai nutolę – LTA_g identiškumas siekia tik 25–31 % (Schmidlin et al., 2021). Šiame tyrime taip pat buvo nustatyta, kad daugumai skorpionuose aptiktų PyV genomų yra būdingas trumpas, į ALTO panašus ORF. Toks trumpas ALTO ORF taip pat buvo nustatytas ir dar viename PyV, aptiktame parduotuvėje įsigytoje avių mėsoje (Buck et al., 2016). Kita vertus, pilno ilgio ALTO ORF, kiek žinoma, yra aptinkamas tik Alfapoliomos virusų gentyje (Meijden ir Fetkamp, 2018), kuriai priklauso įvairių žinduolių PyV. Šie duomenys leidžia manyti, kad į ALTO panašus genas galėjo priklausyti ankstyvoms PyV evoliucinėms linijoms, o vėliau kai kuriose pakisti arba būti prarastas.

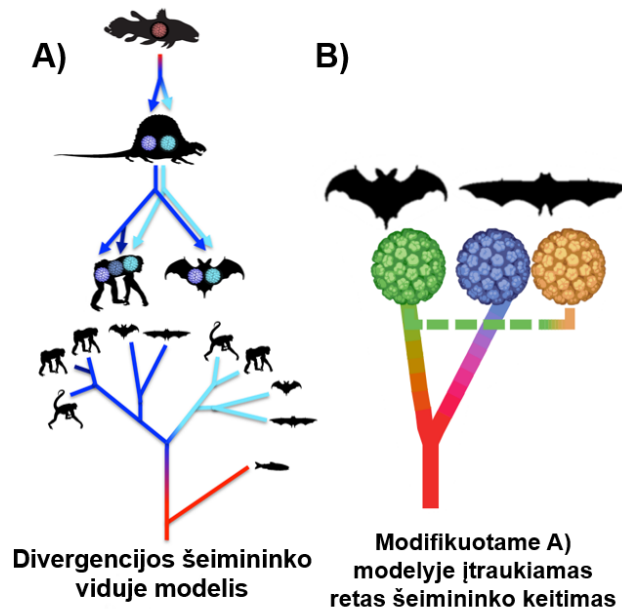
Išskirtinai paukščių PyV būdingas VP4 genas nėra aptinkamas nei žinduolių nei kitų gyvūnų PyV evoliucinėse linijose (<https://ictv.global/taxonomy>). Jis nėra homologiškas nei žinduolių Agno baltymui (Johns ir Müller, 2001), nei SV40 VP4 baltymui (Shen et al., 2011). Taip pat paukščių ir žinduolių PyV skiriasi tuo, kad paukščių PyV sTA_g neturi konservatyvaus cisteinų motyvo, koordinuojančio geležies-sieros klasterius. Šis motyvas MCPyV sTA_g baltymuose reikalingas virusinės DNR replikacijos aktyvacijoje (Tsang et al., 2016). Be to, Buck et al. (2016) tyrime buvo parodyta, kad žuvų PyV LXCXE motyvas yra išsidėstęs tiek sTA_g, tiek LTA_g N-gale, kur jų sekos persidengia, tuo tarpu žinduolių PyV šis motyvas yra tik LTA_g antro egzono srityje. Toks pastebėjimas leidžia manyti, kad paukščių ir žinduolių sTA_g genų evoliucinė kilmė gali būti skirtinga.

1.8 Poliomos virusų evoliucijos modelis

Dauguma tyrimų, nagrinėjančių PyV evoliuciją, rodo, kad šie virusai paprastai yra šeimininkui specifiški. Nepaisant to, vien griežto viruso ir šeimininko ko-divergencijos modelio nepakanka PyV evoliucijos paaiškinimui (Krumholz et al., 2009; Tao et al., 2013; Buck et al.,

2016). Vis daugiau rezultatų atskleidžia, kad tokie procesai kaip: rekombinacija (Buck et al., 2016), evoliucinių linijų duplikacijos (angl. *lineage duplication*) (Moens et al., 2017; Ehlers et al., 2019), šeimininko keitimas (angl. *host switching*) (Buck et al., 2016; Carr et al., 2017; Tan et al., 2020) ir nepilnų evoliucinių linijų atranka (ILS, angl. *Incomplete Lineage Sorting*) (Moens et al., 2017; Aghebatrafat et al. 2023) taip pat gali prisidėti prie PyV evoliucijos. Buck et al. (2016) tyrime teigiama, kad žinduolių PyV filogenija yra panaši į jų naujai pasiūlytą divergencijos šeimininko viduje (angl. *intra host divergence*) modelį (žr. 5A Pav.). Pagal šį modelį žinduolių PyV kinta ir atsiskiria į skirtingas evoliucines linijas greičiau nei jų šeimininkų rūšys, todėl net ir skirtingose filogenetinėse šakose esantys PyV gali infekuoti tą patį šeimininką (žr. 5A Pav.). Šis modelis nenumato virusų persokimo į kitą, nuo šeimininko nutolusią gyvūno rūšį, tačiau jis galėtų paaiškinti virusų persokimą tarp giminingų šeimininko rūšių/porūšių. Vėliau Tan et al. (2020) tyrime buvo pasiūlytas šio modelio modifikuotas variantas, kuris atsižvelgia į retai vykstančius virusų persokimus tarp nutolusių šeimininkų rūšių (žr. 5B Pav.). Toks pasiūlytas modelis remiasi gautais didelės apimties šikšnosparnių tyrimo (n = 1083) duomenimis, kurių analizė atskleidė tris PyV persokimo įvykius tarp trijų skirtingų šikšnosparnių šeimų, gyvenančių simpatrinėse (angl. *sympatric*) bendruomenėse. Svarbu paminėti, kad šiame tyrime taip pat buvo nustatyta, jog nepaisant to, kad artimose *Rhinolophidae* šeimos šikšnosparnių rūšyse nustatyti PyV tarpusavyje pasižymėjo dideliu genomo identiškumu (85–90 %) ir filogenetinėse analizėse klasterizavosi šalia, vis dėlto ši analizė atskleidė, kad jiems buvo būdingas stiprus viruso-šeimininko ko-divergencijos, o ne šeimininko pakeitimo, signalas. Tai rodo, kad net ir didelį identiškumą turinčių PyV, nustatytų artimoje aplinkoje gyvenančių giminingų gyvūnų rūšyse, potencialas keisti šeimininką yra labai mažas. Be šio Tan et al. (2020) ir kito šikšnosparnių PyV tyrimo (Carr et al., 2017), kuriame pateikti duomenys leidžia manyti apie įvykusį PyV šeimininko keitimą tarp giminingų šikšnosparnių rūšių, dauguma kitų žinduoliuose atliktų tyrimų, nagrinėjusių šį procesą, nepateikia tvirtų, šeimininko keitimą pagrindžiančių įrodymų (Losada et al., 2006) arba pateikia rezultatus, kurie prieštarauja anksčiau darytai prielaidai apie jo buvimą (Moens et al., 2013; Leendertz et al., 2011; Madinda et al., 2016). Tai, kad žinduolių poliomos virusuose šeimininko keitimas yra retas reiškinys papildo ir tai, kad nors ir 20 amžiaus viduryje milijonai žmonių buvo vakcinuoti su beždžionių SV40 PyV užkrėstomis vakcinomis prieš poliovirusus, tačiau vėliau nebuvo nustatyta jokių įtakingų įrodymų apie šio viruso sukeltas žmonių ligas ir apie jo perdavimą tarp žmonių (Bouvard et al., 2012). Skirtingai nuo žinduolių PyV, paukščių APyV virusas gali infekuoti įvairias paukščių rūšis. Vis dėlto visi iki šiol užfiksuoti šio viruso perdavimai tarp skirtingų paukščių rūšių

buvo nustatyti tik nelaisvėje laikomuose paukščiuose, todėl lieka neaišku kokią reikšmę šis procesas turi paukščių PyV evoliucijai natūralioje gamtoje (Buck et al., 2016).



5 Pav. Žinduolių poliomos virusų divergencijos šeimininko viduje evoliucijos modelis su retais šeimininko keitimo įvykiais

A) Buck et al., (2016) tyrimo pasiūlytas divergencijos šeimininko viduje modelis, gerai atspindintis žinduolių PyV filogeniją. Viršutinėje dalyje pavaizduota žinduolių PyV evoliucija, besitęsianti po PyV atsiskyrimo nuo žuvų. Apatinė dalis atspindi tikėtiną žinduolių PyV filogeniją. B) Tan et al. (2020) tyrime pasiūlyta A) modelio modifikacija, įtraukianti ir retai pasitaikančius šeimininko keitimo įvykius. Redaguota su Biorender.com pagal Buck et al., 2016.

Be šeimininko keitimo, manoma, kad rekombinacija taip pat galėjo prisidėti prie PyV evoliucijos. Apie tai galima spręsti pagal atliktas filogenetines analizes su įvairių PyV LTA_g ir VP1 ar. sekomis, pagal kurias kai kurios PyV rūšys grupuojasi skirtingose filogenetinėse šakose (Buck et al. 2016). Pavyzdžiui, Torres (2020) tyrimo filogenetinėje analizėje pagal PyV LTA_g ar. sekas, Gamapoliomos virusų gentį sudarantys paukščių PyV sudarė atskirą filogenetinę šaką, o pagal VP1 sekas – grupavosi su Betapoliomos virusais (Torres, 2020). Remiantis tokiu skirtingu PyV grupavimusi, Buck et al. (2016) tyrime teigiama, kad kai kurios PyV rūšys galėjo atsirasti po senų rekombinacijos įvykių tarp evoliuciškai tolimų PyV linijų.

Galimų rekombinacijos pavyzdžių tarp PyV ir kitų virusų šeimų sekų taip pat yra nustatyta. Pavyzdžiui, *Perameles bougainville* bandikutuose buvo nustatytas 7,3 kb dydžio BPCV1 virusas, koduojantis numanomus papildomos virusų L1 ir L2 struktūrinius baltymus bei numanomus

poliomos virusų ankstyvuosius LTA_g ir sTA_g baltymus (Woolford et al., 2007). Be to, naujai pripažintos Adomavirusų šeimos virusai, kurie yra aptinkami skirtingose žuvų rūšyse, koduoja PyV tipo LTA_g helikazę ir adenovirusų tipo struktūrinius baltymus (Welch et al., 2020).

Manoma, kad evoliucinių linijų duplikacija taip pat galėjo prisidėti prie PyV šeimos evoliucijos. Apie tai galėtų liudyti duomenys, kad 13 pripažintų žmogaus PyV rūšių priklauso net trims iš aštuonių PyV genčių (<https://ictv.global/taxonomy>). Be to, šio proceso reikšmingumą atspindi ir LTA_g ar. sekų pagrindu atliktos filogenetinės analizės, kuriose kai kurios primatų: žmonių ir šimpanzių, bei šikšnosparnių PyV rūšys išsidėsto skirtingose evoliucinėse linijose (pvz: Moens et al., 2017).

Skirtinguose tyrimuose atliktos PyV filogenetinės analizės beveik niekada nenaudoja modelių, kurie leistų atsižvelgti į ILS. Šiam sudėtingam evoliuciniam mechanizmui aptikti reikalingi specializuoti modeliai, o nustatyta PyV rūšių įvairovė dažnai nėra pakankama, kad būtų patikimai įvertinta ILS įtaka. Viena iš tyrimų (Aghebatrafat et al., 2023), kuriame ILS mechanizmas buvo įtrauktas į analizę, buvo tiriama tik viename paciente nustatyto NJPyV (angl. *New Jersey Polyomavirus*) ir jam artimų virusų evoliucinė istorija didžiosiose žmogbeždžionėse. Šio tyrimo molekulinio laikrodžio analizės rezultatai parodė, kad modeliai, darantys prielaidą apie ILS, ko-divergenciją ir virusų persokimą iš gorilų į žmones, pasižymėjo panašiomis tikimybėmis, tačiau jos buvo mažesnės nei modelio, kuris remiasi PyV persokimu iš žmonių į gorilas. Galbūt didėjant naujų PyV aptikimui ir įvairovei, ateities tyrimai leis patikimai įvertinti kiek ILS turėjo įtakos PyV evoliucijai.

1.9 Poliomos virusų serologiniai tyrimai

PyV infekcijų epidemiologijai tirti naudojami serologiniai metodai, kadangi jie leidžia identifikuoti ir praeityje įvykusią virusų infekciją, konkrečiai – kraujyje cirkuliuojančius antikūnus, susidariusius prieš PyV baltymus. Ankstyvieji tyrimai (tarp 1970-ųjų ir 1990-ųjų) šiems tyrimams naudojo hemagliutinacijos inhibicijos (HAI) metodą (Gardner 1973). Šis metodas remiasi kraujo serume esančių anti-PyV antikūnų prisijungimu prie PyV virionų, dėl ko pastarieji nebegali sukelti eritrocitų hemagliutinacijos. Vėliau HAI tyrimuose virionus pakeitė PyV VPD (Shin ir Folk, 2003). Vienas iš didžiausių HAI metodo ribotumų yra tai, kad kai kurių PyV, pavyzdžiui, WUPyV (angl. *Washington University Polyomavirus*) ir HPyV6, VPD neturi hemagliutinacijos aktyvumo, o tai,

manoma, gali būti susiję su tuo, kad šie virusai naudoja kitokius receptorius prisijungimui prie ląstelių (Norkienė et al., 2015).

Nuo 2000-ųjų PyV serologiniams tyrimams plačiau pradėtas taikyti imunofermentinės analizės (IFA) metodas. Jis pasižymi didesniu jautrumu (Bodaghi et al., 2009) bei galimybe aptikti antikūnus ir prieš tuos PyV, kurie nepasižymi hemagliutinacijos aktyvumu. IFA tyrimuose kaip antigenai dažnai naudojamos rekombinantiniu būdu susintetintos PyV VPD, susiformuojančios iš savaime tarpusavyje susirenkančių VP1 baltymų, sudarančių visą kapsidės išorinį sluoksnį. Bodaghi et al., 2009 tyrime buvo parodyta, kad padengus IFA plokšteles VPD, signalas būna jautresnis ir specifiškesnis nei naudojant VP1 monomerus ar pentamerus, nes VPD leidžia antikūnams jungtis ir prie tų epitopų, kurie natūralios infekcijos metu yra prieinami viriono paviršiuje.

Pagal ICTV šiuo metu patvirtinta 13 HPyV rūšių, tačiau gali būti, kad ne visi iš jų yra žmogaus patogenai. Neseniai vienas serologinis tyrimas parodė, kad LIPyV (angl. *Lyon IARC PyV*), iš pradžių identifikuotas žmogaus mėginiuose, greičiausiai yra kačių PyV, nes jo seroteigiamų mėginių dalis katėse siekė net 92,5 %, o žmonėse tik 2,3 % (Kamminga et al., 2023).

Skirtingose žmonių populiacijose atlikti seroepidemiologiniai tyrimai rodo, kad daugumos HPyV rūšių seroteigiamumas suaugusiuose žmonėse yra aukštas (50–95+%), mažumos (LIPyV ir HPyV9) – žemas/žemesnis (5–19 %), o NJPyV – labai skirtingas įvairiose žmonių populiacijose (2–58 %) (Kean et al., 2009; Gossai et al., 2015; Kamminga et al., 2018; Gaboriaud et al., 2018; Zhou et al., 2019; Laine et al., 2023). Kai kurių HPyV, pavyzdžiui, JCPyV, MCPyV ir HPyV7 seroteigiamumas reikšmingai didėja su amžiumi (Gossai et al., 2015). Be to, didelė dalis suaugusiųjų yra seroteigiami kelioms HPyV rūšims: JAV atliktame serologijos tyrime buvo nustatyta, kad iš 10 analizuotų HPyV, suaugusiųjų seroteigiamumo mediana buvo septynioms HPyV rūšims (Gossai et al., 2015).

Kai kurių HPyV rūšių VP1 baltymai pasižymi aukštu ar. sekų identiškumu, todėl potencialiai gali susidaryti kryžmiškai reaguojantys antikūnai, kurie gali iškreipti serologinių tyrimų duomenis. Pavyzdžiui, keliuose tyrimuose yra parodyta, kad žmogaus kraujo serumo mėginiuose esantys antikūnai kryžmiškai reaguoja su HPyV6 ir HPyV7 VPD antigenais (VP1 ar. identiškumas 69 %) (Nicol et al., 2013; Norkienė, 2018). Pastarajame tyrime (Norkienė, 2018) žmogaus serumo mėginiuose esančių antikūnų kryžminis aktyvumas taip pat buvo nustatytas ir prieš JCPyV ir BKPyV (VP1 ar. identiškumas 78 %), HPyV9 ir HPyV10 (VP1 ar. identiškumas 51 %) bei WUPyV ir KIPyV (VP1 ar. identiškumas 66 %) VPD.

1.10 Į poliomos virusus panašių dalelių sintezė

VPD dydis, forma, antigeniškumas ir imunogeniškumas dažnai yra panašūs ar beveik identiški virionams (Kim Hyoungh Jin ir Kim Hong-Jin, 2017). Dėl šių savybių VPD pritaikomos įvairiems tikslams - virusų diagnostikai, kaip modeliai viruso struktūrinių baltymų susirinkimo, paviršiaus antigeniškumo ir ląstelių tropizmo tyrimams bei vakcinų kūrimui (Teunissen et al., 2013). Be to, VPD laikomos perspektyviais nešikliais genų terapijai ir terapinių junginių pristatymui į ląsteles (Teunissen et al., 2013). Raiškos sistemos pasirinkimas VPD sintezei priklauso nuo daugelio veiksnių, pavyzdžiui nuo planuojamo panaudojimo tikslo, VPD struktūros sudėtingumo ir kapsidinių baltymų savybių, poreikio potransliacinėms modifikacijoms, sintezės išeigos ir kainos (Nooraei et al., 2021; Hortala et al., 2024). Šiame skyrelyje bus aptariama tik ta informacija, kuri aktuali PyV VPD sintezei, ypač struktūrinių kapsidės baltymų susirinkimo tyrimams ir VPD panaudojimui serologijoje.

Iš tyrimų yra žinoma, kad virusų, kurių kapsidės yra be apvalkalėlio bei kurias sudaro vienas ar du struktūriniai baltymai, VPD dalelių sintezei gali būti sėkmingai panaudota ir bakterijų sistema (Fuenmayor et al., 2017). Ją rinktis pageidautina dėl mažos produkcijos kainos, greito ląstelių augimo, aukšto rekombinantinių baltymų raiškos lygio ir lengvo baltymų gamybos masto didinimo (Fuenmayor et al., 2017). Tyrimai, kuriuose buvo atlikta skirtingų PyV VP1 baltymų raiška *E. coli* bakterijose, rodo, kad jų gebėjimas *in vivo* susirinkti į VPD yra skirtingas. Pavyzdžiui, nustatyta, kad MPyV (Salunke et al., 1989), APyV (Rodgers et al., 1994, MCPyV (Erickson et al., 2009) ir SV40 (Luo et al., 2016) VP1 baltymai *E. coli* bakterijose formuodavo tik VP1 pentamerus, bet ne VPD. Tuo tarpu kol kas tik su JCPyV (Ou et al., 1999) ir HaPyV (Voronkova et al., 2007) VP1 baltymais yra parodyta, kad šie geba formuoti VPD bakterijose. Tai rodo, kad bent kai kurių PyV VPD susirinkimui iš VP1 baltymų nėra būtina eukariotinė ląstelių aplinka (pvz. atliekamos potransliacinės modifikacijos, disulfidinių tiltelių formavimas ir eukariotų šaperonai), tačiau tyrimai rodo, kad disulfidinių tiltelių formavimas padidina VPD stabilumą (Ishizu et al., 2001; Nilsson et al., 2005).

Skirtingai nuo bakterijų raiškos sistemos, mielėse daugumos iki šiol tirtų PyV VP1 baltymų geba susirinkti į VPD. Be to, ši raiškos sistema pasižymi panašiais privalumais kaip ir bakterijos: pigus kultivavimas, reliatyviai greitas ląstelių augimas, didelė VPD išeiga ir galimybė didinti VPD gamybos mastą. (Fuenmayor et al., 2017). Mielėms taip pat būdingi ir unikalūs privalumai – joms suteiktas GRAS (angl. *Generally Recognized As Safe*) statusas ir jos pasižymi maža atsitiktinių veiksnių (angl. *adventitious agents*) užteršimo rizika (Kim Hyoungh Jin ir Kim Hong-Jin, 2017), kas

yra svarbu diagnostikai skirtų VPD antigenų kokybei ir patikimumui. Tyrimai su skirtingų PyV VP1 raiška mielėse rodo, kad susiformuojančių VPD dydis ir jų populiacijos homogeniškumas gali skirtis. Pavyzdžiui, Norkienė et al. (2015) tyrime atlikus 11 skirtingų HPyV VP1 raišką *S. cerevisiae* mielėse, nustatė, kad MCPyV, TSPyV ir NJPyV VP1 susirinko į daugmaž homogeniškas, 45–50 nm dydžio VPD daleles, o kitų PyV VP1 formavo heterogeniškas VPD populiacijas: HPyV7, HPyV9, HPyV10 ir STLPyV VP1 daugiausia formavo 40–50 nm, o KIPyV, WUPyV ir HPyV6 – daugiausia 25–35 nm dydžio VPD daleles. Grauzikų poliomos virusų HaPyV ir MPyV VP1 baltymai taip pat formuoja VPD *S. cerevisiae* mielėse ir jie daugiausia susirenka į homogeniškas 45–50 nm dydžio daleles (Sasnauskas et al., 2003). Lyginant mielių ir vabzdžių ląstelių raiškos sistemas, abiejose HPyV6 VP1 daugiausia formavo mažesnio dydžio VPD populiacijas (Nicol et al., 2013). Tuo tarpu HPyV9 atveju mielėse VP1 daugiausia formavo įprasto dydžio VPD, o vabzdžių ląstelėse – mažesnio dydžio VPD daleles (Nicol et al., 2013). Heterogeniško dydžio VPD susiformavimas buvo parodytas net ir 293TT žmogaus ląstelių linijoje, kurioje buvo atlikta HPyV6 ir HPyV7 VP1 baltymų raiška (Schowalter et al., 2010). Iki šiol dar nėra aišku kodėl skirtingų PyV rūšių VP1 baltymai pasižymi skirtingu efektyvumu susirenkant į normalaus dydžio VPD, tačiau tikėtina, kad tai priklauso tiek nuo raiškos sistemų viduląstelinės aplinkos (Johne ir Müller, 2004; Simon et al., 2014), besiskiriančios nuo natūralių šeimininko ląstelių, tiek nuo PyV VP1 baltymų sekos (Johne ir Müller, 2004; Norkienė, 2018) ir jos struktūros ypatumų (Nilsson et al., 2005). Pavyzdžiui, WUPyV VP1 *S. cerevisiae* mielėse daugiausia susirenka į 25–35 nm VPD, tačiau buvo parodyta, kad pakeitus jo VP1 NLS seką į stipresnę, t.y. įvedus VP1 N-galo sekoje keletą mutacijų, normalaus dydžio VPD formavimosi efektyvumas išaugo net apie 28 kartus (Norkienė, 2018). Tuo tarpu skirtingas APyV struktūrinių baltymų gebėjimas formuoti VPD daleles skirtingose eukariotinių ląstelių raiškos sistemose parodo viduląstelinės aplinkos svarbą. Sasnauskas et al (2003) tyrime APyV VPD susiformavo vien tik iš VP1 baltymų *S. cerevisiae* mielių raiškos sistemoje, o vištų embrioninėse ląstelėse APyV VPD formavosi tik tuomet, kai VP1 galėjo patekti į branduolį – tai buvo pasiekta arba atlikus natyvaus VP1 ko-raišką su VP3 arba pakeitus VP1 NLS seką į stipresnę (Johne ir Müller, 2004). Tuo tarpu vabzdžių ląstelėse, net ir atlikus VP1 ko-raišką su VP2 ir VP3 baltymais bei jiems patekus į branduolį, APyV VPD vis tiek nesiformavo (An et al., 1999). Manoma, kad toks VP1 baltymų gebėjimas formuoti VPD gali priklausyti ir nuo viduląstelinės kalcio koncentracijos ir VP1 sąveikos su ląsteliniiais veiksniais, pavyzdžiui šaperonais ir importiniais (Johne ir Müller, 2004).

Įvairių PyV VP1 baltymai vabzdžių-bakulovirusų raiškos sistemoje, kaip ir mielėse, dažniausiai sėkmingai formuoja VPD, tačiau vabzdžių ląstelėse VPD sintezė reikalauja daugiau

laiko, kultivavimas yra sudėtingesnis ir brangesnis, o bakulovirusai kelia papildomą VPD kokybės riziką (Kim Hyoung Jin ir Kim Hong-Jin, 2017). Tuo tarpu žinduolių ląstelės labai retai naudojamos PyV VPD sintezei, nes šiam tikslui pakanka kitų, paprastesnių raiškos sistemų (Teunissen et al., 2013).

2. Medžiagos ir metodai

2.1 Bioinformatinė analizė

AagraPyV ORF buvo anotuoti pagal rastas giminingas sekas naudojant BLAST (Camacho et al., 2009) ir HHpred įrankį (Zimmermann et al., 2018). Numanomo VP1 ORF splaisingo vietos buvo prognozuotos su ASSP internetiniu įrankiu (Wang ir Marin, 2006). Baltymų struktūrų modeliavimui naudotas AlphaFold įrankis (Jumper et al., 2021). Struktūros vizualizuotos su PyMOL programa (Schrödinger, 2010). AagraPyV genomo sekų nukleotidų, ORF koduojamų LTag, VP1, VP2 ir Dagno aminorūgščių (ar.) sekų poriniai palyginiai buvo atlikti naudojant Sequence Demarcation Tool (SDT) programą (1.2 versija), MAFFT algoritimą (Muhire et al., 2014). Numanomo VP1 ar. sekų poriniai palyginiai vizualizuoti su Benchling programa (<https://benchling.com/>). Numanomų baltymų sekų domenų prognozavimui naudotas InterPro (Blum et al., 2024) ir ScanProsite įrankis (Sigrist et al., 2012), pastarasis taip pat naudotas ir baltymų motyvų prognozavimui. WoLF PSORT įrankis (Horton et al., 2007) naudotas NLS sekų prognozavimui. Numanomo VP2 N-miristilinimo motyvo prognozavimui naudotas Expasy įrankis (Bologna et al., 2004).

2.2 Bakterijų ir mielių kamienai

- *E. coli* DH5α F-*gyrA96* (NaIr) *recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* ($rk^- mk^+$) *glnV44 deoR Δ(lacZYA-argF)U169* [ϕ 80dΔ(*lacZ*)M15] (EGIS kolekcija).
- *E. coli* GM119 F- *dam-3 dcm-6 lacY1 galK2 galT22 tonA31 tsx-78 supE44 mtl-1(thi-1)* (EGIS kolekcija).
- *S. cerevisiae* 214c (*a, his4, leu2*) (EGIS kolekcija).
- *S. cerevisiae* 214c-Δ*pep4* (*a, his4, leu2, Δpep4*) (EGIS kolekcija). Šis kamienas naudotas tolimesniuose ir didžiojoje daugumoje tyrimų. Jo kamieno ląstelėse išveiklintas *PEP4* genas, kuris koduoja pagrindinę vakuolinę proteazę – aspartato proteazę A, atsakingą už kitų vakuolinių proteazių pirmtakų brendimą ir aktyvinimą (Woolford et al., 1986). Jos išveiklinimas *S. cerevisiae* mielėse gali ženkliai padidinti kai kurių rekombinantinių baltymų išeigas (Sander et al., 1994; Tomimoto et al., 2013).

2.3 Plazmidės

- pJET1.2/blunt – bakterijų klonavimo vektorius (Thermo Fisher Scientific Baltics #K1231).
- pJET1.2-MarPyV2-sTAg – pJET1.2 klonavimo vektorius su įterpta paprastojo pelėno – *Microtus arvalis polyomavirus* 2 (MarPyV2) sTAg geno seka (EGIS kolekcija).
- pFX7 – mielių raiškos vektorius, turintis galaktoze indukuojamą *GAL10* geno promotorių (EGIS kolekcija).
- pFX7-CglPyV-VP1 – pFX7 raiškos vektorius su įterpta rudojo pelėno – *Clethrionomys glareolus polyomavirus* (CglPyV) VP1 geno seka po *GAL10* geno promotoriumi (EGIS kolekcija).
- pFGG3 – mielių ko-raiškos vektorius, turintis galaktoze indukuojamus *GAL7* ir *GAL10* genų promotorius (EGIS kolekcija).

2.4 Plazmidžių konstravimas

Plazmidžių konstravimui buvo naudojami „Thermo Fisher Scientific Baltics“ fermentai, buferiniai tirpalai, kiti cheminiai komponentai (nebent įvardinta kitaip), DNR išskyrimo rinkiniai, o reakcijos atliekamos pagal gamintojo rekomendacijas.

AagraPyV genomo sekų (žr. 2.5) ir ORF padauginimui (žr. 3.3.2) buvo naudojama „Phusion High-Fidelity“ polimerazė, o „DreamTaq“ – diagnostinei PGR (žr. 2.5) ir bakterijų kolonijų PGR, pastarąją siekiant atrinkti bakterijų transformantus, turinčius įterptas AagraPyV genomo sekas ar tinkamai įterptus klonuojamus fragmentus plazmidiniuose vektoriuose (pradmenys ir jų panaudojimo tikslai – žr. 2.1 lentelę). Šioms reakcijoms buvo naudojami atitinkami „Phusion Green HF“ arba „DreamTaq Green“ buferiniai tirpalai bei paruošti dNTP mišiniai. PGR buvo atliekama „MiniAmp Plus“ (Applied Biosystems) arba „T-Personal“ (Biometra) termocikleriuose.

2.1 lentelė. Naudojų pradmenų sekos ir jų panaudojimo tikslai

Pradmuo	Pradmens 5'-3' seka	Panaudojimo tikslas
LTag-F4	AGGATTCGGACTATAATGAC	Diagnostinė PGR AagraPyV paplitimui
LTag-R3	TTTTCCCTCTGGTCATC	
pJET1.2-F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Diagnostinio fragmento, Dagno-1 ir Dagno2 ORF sekoskaitai <i>E. coli</i> kolonijų, turinčių pJET1.2 vektoriuje įterptą AagraPyV genomo seką, atrankai. VP1-Pilnas1, VP1-Pilnas2 ir numanomo VP2 ORF sekoskaitai.
pJET1.2-R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	

Pradmuo	Pradmens 5'-3' seka	Panaudojimo tikslas
LTag-F3	TGCTAAAATATTTATTCATTTAAGTG	AagraPyV genomų padauginimui kartu su LTag-R3.
LTag-F1	CTGGACGGACATATGGAAGTTCAG	AagraPyV genomų padauginimui.
LTag-R1	ATGGTCACGAAGGTCATCAAGG	
LTag-F5	GCCGGTAAGTGTTCGC	AagraPyV genomų padauginimui.
LTag-R5	ACGGCGATTATTAGATGACC	
VP1-ATGX-F1	CTCTAGAATGTCTTGTGTCAGGAGTC	VP1-Pilnas1 ORF padauginimui. <i>E. coli</i> kolonijų, turinčių pFX7 raiškos vektoriuose tinkamai įterptą VP1-930 arba VP1-1168 variantą, atrankai (kartu su PYK-F), bei – turinčių pFGG3 ko-raiškos vektoriuje tinkamai įterptą VP1-930 variantą, atrankai (kartu su PGK3-F).
VP1-STOPX-R1	GCCTCTAGAAATTATTCAGGTTTTG G	
VP1-930D-Aar-R	CTTCACCTGCACTCTTAGTTTATCAC AAACTTCCC	pFX7-VP1-930 konstravimui iš pFX7-VP1-Pilnas1.
VP1-1295Ac-Aar-F	CTTCACCTGCCTAGCTAATTGTTATG ATATTG	pFX7-VP1-1168 konstravimui (kartu su VP1-1168D-Aar-R).
VP1-1168D-Aar-R	CTTCACCTGCACTCTTAGTTTATCAC AAACTTCCC	pFX7-VP1-1168 konstravimui iš pFX7-VP1-Pilnas1. <i>E. coli</i> kolonijų atrankai (kartu su PYK-F – žr. jo panaudojimą su VP1-Pilnas1 ir VP1-Pilnas2 ORF).
VP1-ATGB-D3	GGACTAGTATGTCGTGTCAGGAATC	VP1-Pilnas2 ORF padauginimui.
VP1-STOPB-R3	GGACTAGTATTAAGGTTTTGGAACA TGAC	
VP2-ATGB-F	GGACTAGTATGGGTGGGGTCATCGC	Numanomo VP2 ORF padauginimui.
VP2-STOPB2-R	GGACTAGTTTACCGCACTCGTTTAG TCG	
Dagno-ATGX-F	AGTCTAGAATGTTCCAAAACCTGAA TAATTTC	Dagno-1 ORF padauginimui (kartu Dagno-STOPX-R).
Dagno-ATG2X-F	GATCTAGAATGGAAAGCAAGTGGA TTC	Dagno-2-1 ORF padauginimui (kartu su Dagno-STOPX-R).
Dagno-STOPX-R	GATCTAGATTATTTGGTCATTTTCATC TTGTG	<i>E. coli</i> kolonijų atrankai (kartu su PYK-F – žr. jo panaudojimą su Dagno-1 ir Dagno-2 genais).
PGK3-F	TCCTTACCTTCCAATAATTCC	<i>E. coli</i> kolonijų atrankai (žr. VP1-STOPX-R1).
PYK-F	CTCTTTTTCATATTCATTCTTTTTCAT CCTTTG	<i>E. coli</i> kolonijų, turinčių pFGG3-VP1-930 ko-raiškos vektoriuje tinkamai įterptą VP1-Pilnas1, VP1-Pilnas2, Dagno-1 arba Dagno-2 ORF, atrankai. VP1-930 ir VP1-1168 ORF sekoskaitai.
PYK-R	CGGATAAGAAAGCAACACCTGGC	

Padauginti AagraPyV genomai ir ORF, diagnostiniai fragmentai ir restrikcijos reakcijų produktai buvo gryninami su „GeneJET PCR Purification Kit“ rinkiniu arba po DNR elektroforezės išpjaunami iš gelio ir išskiriami su „GeneJET Gel Extraction Kit“ rinkiniu. Išgrynintų diagnostinių fragmentų galai prieš klonavimą buvo paveikiami egzonukleazių mišiniu iš „CloneJET PCR Cloning Kit“ rinkinio.

Plazmidinių vektorių defosforilinimas buvo atliekamas su FastAP šarmine fosfataze. DNR susiuvimo reakcijoms buvo naudojama T4 DNR ligazė ir T4 ligazės buferinis tirpalas.

DNR elektroforezė buvo atliekama 0,8 % agarozės geliuose (su 0,2 µg/mL etidžio bromido), panardintuose TAE buferiniame tirpale, 20–30 min., 10 V/cm elektriniame lauke, o geliai vėliau analizuoti naudojant „GelDoc Go“ (Bio-Rad) ultravioleto transiliumatorių.

Plazmidiniai vektoriai buvo transformuojami į iš anksto paruoštas ir –80 °C temperatūroje užšaldytas kompetentes *E. coli* DH5α arba GM119 ląsteles. DH5α ląstelės buvo naudojamos plazmidiniams vektoriams padauginti po susiuvimo reakcijų, o GM119 ląstelės – Dam metiltransferazės nemetilintai plazmidinei DNR gauti, kad ją būtų galima karpyti su XbaI restrikcijos endonukleaze (RE), kadangi šio fermento atpažinimo vieta persidengia su Dam metilinimo sritimi. Transformacijai 90 µL bakterijų suspensijos buvo sumaišoma su 10 µL DNR fragmentų susiuvimo mišinio, laikoma 30 min. lede, tuomet 2 min. 42 °C temperatūros vandens termostate, o po to vėl 2 min. lede. Vėliau bakterijų ląstelės buvo išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su 50 µg/mL ampicilino ir auginamos per naktį 37 °C temperatūroje. Užaugusios bakterijos buvo persėjamos į mėgintuvėlius su 5 mL skystos LB terpės, turinčios 30 µg/mL ampicilino ir auginamos 14–18 val. 37 °C temperatūros purtyklėje. Po auginimo mėgintuvėliai su bakterijomis buvo centrifuguojami (Eppendorf 5810 R centrifuga) 10 min. 3000 aps./min. greičiu, supernatantas išpilamas ir tuomet iš surinktų bakterijų gryninama plazmidinė DNR su „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ rinkiniu.

Išgrynintos DNR koncentracijos nustatymui buvo naudojamas „NanoDrop2000“ (Thermo Fisher Scientific Baltics) spektrofotometras.

Medžiagos DNR elektroforezei:

- Etidžio bromido tirpalas – 10 mg/mL etidžio bromido (Sigma) tirpalas distiliuotame vandenyje.
- TAE buferinis tirpalas – „50X TAE Buffer“ (#B49).
- DNR fragmentų ilgio standartas – „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (#SM0331).

Medžiagos kompetentinių *E. coli* bakterijų transformacijai:

- LB terpė – 2,5 % LB terpės (Roth) autoklavuotas tirpalas distiliuotame vandenyje. Į agarizuotą LB terpę prieš autoklavavimą buvo pridedama 2 % agarą (Merck).
- Ampicilino tirpalas – 50 mg/mL ampicilino (Roth) tirpalas distiliuoto vandens ir etanolio (Honeywell) 1:1 mišinyje.

2.5 Diagnostinė PGR AagraPyV paplitimo nustatymui

A. agrarius pelių inkstų mėginiai, surinkti iš 2016–2018 m. Lietuvoje sugautų pelių, buvo gauti iš Gamtos tyrimų centro. Diagnostinei PGR naudoti inkstų DNR mėginiai ($n = 26$) jau buvo paruošti pagal Vasiliūnaitė et al., (2024) aprašytą metodiką. Jie buvo sudaryti sujungus įvairaus kiekio (1-35) graužikų DNR mėginius (žr. 3.1 lentelę) ir vėliau kiekvieną mėginį padalinus į dvi dalis. Viena dalis prieš diagnostinę PGR buvo praturtinta žiedinėmis molekulėmis grandinės išstūmimo (angl. *strand displacement*) būdu naudojant EquiPhi29 polimerazę, o kita dalis naudota diagnostinei PGR be papildomų modifikacijų. Šiam tyrimui naudoti pradmenys (žr. 2.1 lentelę) buvo sukurti EGIS J. m. d. E. Vasiliūnaitės, remiantis naujos kartos sekoskaitos būdu nustatytais AagraPyV genomo fragmentais *A. agrarius* inkstų DNR mėginiuose. Šie pradmenys buvo nukreipti į konservatyviausią PyV geną – LTA_g. Po diagnostinės PGR gauti ~620 bp ilgio diagnostiniai fragmentai buvo įterpti į pJET1.2 klonavimo vektorių, o jų sekos nustatytos Sanger sekoskaitos metodu (Azenta, Vokietija) (pradmuo – žr. 2.1 lentelę).

Iš *A. agrarius* DNR mėginių, kuriuose buvo aptiktos AagraPyV DNR sekos (žr. 3.1 lentelę), PGR būdu buvo padauginamos AagraPyV genomo sekos, naudojant priešingomis kryptimis nukreiptas (angl. *back-to-back*) pradmenų poras (žr. 2.1 lentelę), kurias sukūrė J. m. d. E. Vasiliūnaitė panašiu principu kaip ir diagnostinius pradmenis. Gauti PGR produktai buvo įterpti į pJET1.2 klonavimo vektorių, o jų sekos nustatytos Nanopore sekoskaitos metodu (SeqVision, Lietuva).

2.6 Plazmidinių vektorių transformacija į kompetentines *S. cerevisiae* mielių ląsteles

Sukonstruoti ir tyrimuose naudojami pFX7 raiškos vektoriai (žr. 3.3.2 ir žr. 2.3) buvo transformuojami į *S. cerevisiae* mielių 214c ir 214c- $\Delta pep4$ kamieno ląsteles (žr. 2.2.), o pFGG3 k-raiškos vektoriai (žr. 3.4.1 ir žr. 2.3) – tik į 214c- $\Delta pep4$ kamieno ląsteles. Kompetentinėms mielių ląstelėms paruošti, iš pradžių jos buvo užsėjamos į mėgintuvėlį su 5 mL YEPD mitybinės terpės ir

auginamos 16–18 val. 30 °C temperatūros purtyklėje. Po to, 1 mL mielių ląstelių kultūros buvo perpilama į kitą mėgintuvėlį su 5 mL YEPD terpės ir auginama dar 2 val. tomis pačiomis sąlygomis. Po auginimo mėgintuvėliai su mielėmis buvo centrifuguojami 5 min. 3000 aps./min. greičiu (Eppendorf 5810 R centrifuga), supernatantas išpilamas, o mielių ląstelės suspenduojamos 3 mL TE tirpalo ir vėl centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Išpylus supernatantą, mielių ląstelės buvo suspenduojamos 3 mL TE–LiCl tirpalo ir inkubuojamos 1 val. 30 °C temperatūroje. Vėliau mielių ląsteles nucentrifugavus tomis pačiomis sąlygomis ir išpylus supernatantą, jos buvo suspenduojamos likusiame TE–LiCl tirpalo laše.

Mielių transformacijai buvo sumaišoma 15 µL paruoštų kompetentinių mielių ląstelių su 2–5 µL (~1 µg) plazmidinės DNR ir inkubuojama 30 min. kambario temperatūroje. Vėliau, pridėjus 40 µL TE-PEG4000 tirpalo, transformacijos mišiniai buvo inkubuojami 45 min. 30 °C temperatūroje, o po to 25 min. 42 °C vandeniniame termostate. Po karščio šoko mielės buvo gaivinamos ant jų užpylus 1 mL YEPD terpės ir inkubuojant 12–18 val. 30 °C temperatūros termostate. Po to mielių ląstelės buvo trumpai centrifuguojamos (6 sek.) stalinėje centrifugoje (Eppendorf 5417C minicentrifuga), supernatantas išpilamas, o ląsteles suspendavus likusiame terpės laše, jos buvo užsėjamos ant agarizuotos YEPD terpės su 0,3 µL/mL formaldehido tirpalo ir auginamos 2 paras 30 °C temperatūros termostate. Užaugę mielių transformantai buvo persėjami ant agarizuotos YEPD terpės su dvigubai didesne formaldehido tirpalo koncentracija (0,6 µL/mL) ir auginami tomis pačiomis sąlygomis.

Naudotos medžiagos:

- YEPD mitybinė terpė – 1 % mielių ekstrakto (Merck), 2 % sojų peptono (Applichem) ir 2 % gliukozės (Applichem) tirpalas distiliuotame vandenyje (autoklavuotas). Į agarizuotą YEPD terpę prieš autoklavavimą buvo pridedama 2 % agaro (Merck).
- TE buferinis tirpalas – 10 mM Tris-HCl (Sigma) ir 0,1 mM EDTA (Sigma) tirpalas distiliuotame vandenyje.
- TE-LiCl tirpalas – 0,1 M LiCl (Amresco) tirpalas TE buferiniame tirpale.
- TE-PEG4000 tirpalas – 50 % PEG4000 (SERVA) tirpalas TE buferiniame tirpale.
- Formaldehido tirpalas – 37 % formaldehido tirpalas (Applichem).

2.7 *S. cerevisiae* mielių auginimas ir rekombinantinių poliomos virusų baltymų raiškos indukcija

Mielės buvo kultivuotos dviem būdais:

Mielių ląstelės, transformuotos vienu iš tyrimuose naudojamų pFX7 raiškos arba pFGG3 ko-raiškos vektorių (žr. 2.3, žr. 3.3.2 ir žr. 3.4.1), buvo užsėjamos į 100 mL kolbas su 20 mL YEPD terpės, turinčios 0,3 µL/mL formaldehido tirpalo, ir auginamos 1 parą 30 °C temperatūros purtyklėje. Po to mielių ląstelės buvo centrifuguojamos 5 min. 2000 aps./min. greičiu (Eppendorf 5810 R), supernatantas išpilamas, o ant nusėdusių ląstelių užpilama 20 mL indukcinės YEPG terpės ir auginama 22 val. 30 °C temperatūros purtyklėje.

Mielių ląstelės, į kurias buvo transformuoti pFX7 raiškos vektoriai taip pat buvo auginamos ir didesniuose tūriuose. Tam jos buvo kilpele išsėjamos per visą lėkštelės plotą ant YEPD mitybinės terpės su 0,6 µL/mL formaldehido tirpalo ir auginamos dvi paras 30 °C temperatūros purtyklėje. Visa ant agarą užaugusi mielių biomasė buvo surenkama ir inokuliuojama į 2 L kolbas su 400 mL YEPD mitybinės terpės ir 0,3 µL/mL formaldehido tirpalo bei toliau auginama ~22 val. 30 °C temperatūros purtyklėje. Po paros į kolbas buvo įpilama po 200 mL koncentruotos YEPG indukcinės terpės ir auginama ~18 val. tomis pačiomis sąlygomis.

Naudotos medžiagos:

- YEPD terpė ir formaldehido tirpalas (žr. 2.6).
- Indukcinė YEPG terpė – 1 % mielių ekstrakto, 2 % sojų peptono ir 3 % galaktozės (VWR Chemicals) sterilus tirpalas distiliuotame vandenyje.
- Koncentruota indukcinė YEPG terpė – 2 % mielių ekstrakto, 4 % sojų peptono ir 9 % galaktozės sterilus tirpalas distiliuotame vandenyje.

2.8 *S. cerevisiae* mielių ląstelių lizatų mėginių paruošimas

Po virusinių baltymų raiškos indukcijos (žr. 2.7) nucentrifugavus 100 mL kolbose augintas mieles – 5 min. 2000 aps./min. greičiu (Eppendorf 5810 R centrifuga), o 2 L kolbose augintas mieles – 10 min. 3000 aps./min., greičiu (Beckman J-6B) ir išpylus mitybinę terpę, mielių ląstelės buvo užšaldomos 2 val. –20 °C. Po to, užšaldytos mielės buvo sumaišomos su jų biomasei lygiu tūriu stiklo rutuliukų ir dvigubai didesniu tūriu DB450 ardymo buferio su jame ištirpinta proteazių slopiklių tablete (Thermo Fisher Scientific Baltics) bei 2 mM PMSF proteazių slopiklio. Mielės buvo ardomos 20 min. (10 ciklų: 1 min. purtoma stalinėje purtyklėje max aps./min ir 1 min. laikoma lede). Suardžius mielių ląsteles, buvo paruošiami lizatų mėginiai – 40 µL mielių lizato buvo sumaišoma su vandeniu ir baltymų mėginio dažu 1:1:2 santykiu ir mėginiai kaitinami 10 min. 100 °C. Nucentrifugavus likusį mielių lizatą (5 min. 2000 aps./min., 4 °C), tirpios frakcijos

mėginiai buvo paruošiami paėmus viršnuosėdinę frakciją. Toliau šie, kaip ir visi kiti baltymų mėginiai buvo paruošiami tokiu pačiu būdu, kaip ir mielių lizatų mėginiai.

Jei mielės buvo auginamos 600 mL terpėse, paėmus lizato tirpiosios lizato frakcijos mėginius, visas likęs tirpios frakcijos tūris toliau buvo apdorojamas vienu iš dviejų būdų. Jis buvo arba sumaišomas su amonio sulfato tirpalu iki jo galutinės 45 % koncentracijos (taip siekiant papildomai koncentruoti VPD prieš ultracentrifugavimo etapą) arba ultracentrifuguojamas per 30 % sacharozės sluoksnį, po kurio gautas baltymų mėginys naudojamas VPD gryninimui per jodiksanolio tankio gradientą (žr. 2.9). Pirmuoju atveju – tirpios baltymų frakcijos mišinys su amonio sulfatu buvo maišomas 3,5 val. 4 °C. Po to mažą dalį šio tirpalo dalis buvo naudojama baltymų mėginių paruošimui, o likęs mišinio tūris buvo centrifuguojamas 40 min. 9500 aps./min. greičiu 4 °C temperatūroje (Beckman Avanti J-26 XPI). Po centrifugavimo paėmus viršnuosėdinės frakcijos baltymų mėginius, likusi viršnuosėdinė frakcija buvo išpilama, o nuosėda tirpinama 5 mL DB150 buferio.

Toliau, tiek mažuose, tiek didesniuose tūriuose augintų mielių mėginių paruošimui buvo naudojama ta pati metodika. Tiek po mielių lizato centrifugavimo gauta viršnuosėdinė frakcija, tiek ir po baltymų koncentravimo su amonio sulfatu gauta ištirpintos nuosėdos suspensija buvo naudojama VPD koncentravimui, ultracentrifuguojant per 30 % sacharozės sluoksnį. Tam baltymų tirpalai buvo švelniai užpilami ant 15 mL 30 % sacharozės sluoksnio ultracentrifuginiame mėgintuvėlyje, o ant viršaus dar atsargiai užpilama 5 mL DB450 buferio. Mėginiai buvo ultracentrifuguojami 4 val. 37000 aps./min. greičiu 4 °C temperatūroje (Beckman Optima L-90K). Nusiurbus viršnuosėdinę frakciją, nuosėda buvo tirpinama PBS buferiniame tirpale, o iš gautos suspensijos paruošiami baltymų mėginiai. Papildomai, į dalį suspensijos, gautos ruošiant mėginius iš 2 L kolbose augintų mielių buvo pridėta cezio chlorido tirpalo (10 % suspensijos tūrio) ir laikyta +4 temperatūroje iki panaudojimo transmisinės elektronų mikroskopijos (TEM) analizei (FEI Morgagni 268). Ši analizė buvo atlikta VU GMC Biotechnologijos institute, bendradarbiaujant su Dr. Justu Lazutka.

Naudotos medžiagos:

- Ardymo buferis (DB150/DB450) – 10 mM Tris-HCl, 150/450 mM NaCl (Merck), 0,01 % Triton-X-100 (Thermo Fisher Scientific Baltics), 1 mM CaCl₂ (Sigma), 0,25 M L-Arg (Applichem) filtruotas tirpalas (pH = 7,2) distiliuotame vandenyje.
- PMSF tirpalas – 20 mM fenilmetilsulfonilfluoridas (Applichem) ištirpintas izopropanolyje (Honeywell).

- Baltymų dažas – 50 % 0,5 M Tris-HCl buferinio tirpalo (pH = 6,8), 20 % glicerolio (Merck), 4 % natrio dodecilsulfato (Sigma), 0,01 % bromfenolio mėlio (Merck) ir 10 % merkaptoetanolio (Roth) tirpalas distiliuotame vandenyje.
- Amonio sulfato tirpalas – 3,85 M (NH₄)₂SO₄ filtruotas tirpalas distiliuotame vandenyje.
- 30 % Sacharozės tirpalas – 30 % sacharozės (Fisher Bioreagents) filtruotas tirpalas DB150 ardymo buferiniame tirpale.
- PBS buferinis tirpalas – 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl (Roth), 10 mM Na₂HPO₄ (VWR Chemicals) 1,98 mM KH₂PO₄ (Roth), tirpalas (pH = 7,2) distiliuotame vandenyje.
- Cezio chlorido tirpalas – 1 g/ml cezio chlorido (Roth) tirpalas distiliuotame vandenyje.

2.9 Į virusus panašių dalelių gryninimas naudojant jodiksanolio tankio gradientą

Jodiksanolio tankio gradientas buvo ruoštas iš pradinio 60 % jodiksanolio tirpalo (Abcam), jį praskiedus 10X PBS buferiniu tirpalu ir druskų tirpalais (5M NaCl, 1M KCl, 2M CaCl₂ ir 2M MgCl₂) iki 46 % darbinio jodiksanolio tirpalo. Vėliau jis buvo praskiestas DPBS buferiniu tirpalu iki 27 %, 33 % ir 39 % jodiksanolio tirpalų, kurie sluoksniavimo metodu, pradedant nuo mažiausio tankio tirpalo (27 %), buvo supilti po 1.5 mL į 13,2 mL talpos polipropileno mėgintuvėlius (Beckman Coulter). Ant paruošto gradiento buvo švelniai užplintas baltymų mėginys, gautas po mielių lizato tirpios frakcijos baltymų ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį (žr. 2.8), o likęs tūris polipropileno mėgintuvėlyje buvo užpildytas DB150 buferiu. Mėginiai buvo ultracentrifuguoti 3,5 val. 37000 aps./min. greičiu 4 °C temperatūroje (Beckman Optima L-90K). Po to mėgintuvėlio apačia buvo pradurta su 25G dydžio adata, o frakcijos surinktos taip: 1 frakcija – ~600 µL, 2-9 frakcijos – ~350 µL, 10-11 frakcijos – ~400 µL, 12 frakcija – visas likęs tūris. Surinktų frakcijų baltymų mėginiai buvo paruošti anksčiau aprašytu būdu (žr. 2.8).

Naudotos medžiagos:

- 10X PBS buferinis tirpalas – 1,37 M NaCl, 26,8 mM KCl, 101 mM Na₂HPO₄, 19,85 mM KH₂PO₄, filtruotas tirpalas (pH = 7,2-7,4) distiliuotame vandenyje.
- 46 % Jodiksanolio tirpalas – 46 % jodiksanolio, 0,81 M NaCl, 6,67 mM KCl, 10,14 mM Na₂HPO₄, 1,985 mM KH₂PO₄, 0,9 mM CaCl₂, 0,52 mM MgCl₂ tirpalas.
- DPBS buferinis tirpalas – 0,77 M NaCl, 4,8 mM KCl, 10,2 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0,9 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, filtruotas tirpalas (pH = 7,2) distiliuotame vandenyje.

2.10 Baltymų elektroforezė natrio dodecil sulfato-poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis

Paruošti baltymų mėginiai (žr. 2.8 ir 2.9) buvo analizuoti baltymų natrio dodecilsulfato-poliakrilamido gelio elektroforezės (NDS-PAGE) metodu. NDS-PAGE buvo atliekama geliuose, sudarytuose iš 3,2 % koncentruojančiosios ir 10 arba 12 % frakcionuojančiosios gelio dalių. Į gelio šulinėlius buvo suleidžiama po 10 µL baltymų mėginio, o elektroforezė RB buferyje atliekama apie 1,5 val, esant 140 V įtampai ir 40 mA srovės stiprumui. Vėliau gelis buvo dažomas 40 min. su Kumasi brilantinio mėlio dažymo tirpalu, silpnai purtant. Po dažymo gelis buvo praplaunamas 4-5 kartus po 10-15 min., jį silpnai purtant gelio blukinimo tirpale ir po to gelis fotografuojamas su „GelDoc Go Gel Imaging System“ (Bio-Rad).

Naudotos medžiagos:

- Koncentruojančio gelio tirpalas – 25 % 0,5 M Tris-HCl buferinio tirpalo (pH = 6,8), 3,2 % akrilamido–bisakrilamido (Roth), 0,1 % natrio dodecilsulfato (Sigma), 0,1 % amonio persulfato (Roth) ir 0,1 % tetrametiletilendiamino (Sigma) mišinys distiliuotame vandenyje.
- Frakcionuojančio gelio tirpalas – 25 % 1,5 M Tris-HCl buferinio tirpalo (pH = 8,8), 10 arba 12 % akrilamido–bisakrilamido, 0,1 % natrio dodecilsulfato, 0,1 % amonio persulfato, 0,1 % tetrametiletilendiamino mišinys distiliuotame vandenyje.
- Baltymų elektroforezės RB buferis (pH = 8,3) – 2,5 mM Tris, 19,2 mM glicino (Thermo Fisher Scientific) ir 0,01 % natrio dodecilsulfato tirpalas distiliuotame vandenyje.
- Baltymų molekulinės masės standartas – „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ #SM0671 (Thermo Fisher Scientific).
- Kumasi brilantinio mėlio dažymo tirpalas – 50 % etanolio, 10 % acto rūgšties (Roth), 0,25 % Kumasi brilantinio mėlio R-250 (Sigma) tirpalas distiliuotame vandenyje.
- Gelio blukinimo tirpalas – 5 % acto rūgšties ir 5 % izopropanolio tirpalas distiliuotame vandenyje.

3. Rezultatai

3.1 AagraPyV paplitimas *Apodemus agrarius* pelėse

Ankstesnių tyrimu metu Vilniaus Universiteto Eukariotų genų inžinerijos skyriaus (EGIS) laboratorijoje naujos kartos sekoskaitos metodais tiriant *A. agrarius* pelių inkstų DNR mėginius buvo aptikta neįprasta poliomos virusų genomo seka (AagraPyV-ref). Ši seka yra labai filogenetiškai nutolusi nuo visų žinomų žinduolių PyV genomo sekų, o jos ankstyvųjų ir vėlyvųjų genų homologai koduojami ta pačia kryptimi, nors įprastai PyV genomuose šie genai koduojami priešingomis kryptimis. Siekiant ištirti tokių AagraPyV sekų paplitimą pelių inkstų DNR mėginiuose, jie buvo ištirti naudojant diagnostinę PGR (žr. 2.5). Iš viso buvo tirti 26 inkstų DNR mėginiai ($n = 26$), sudaryti apjungus įvairų kiekį (1–35) graužikų DNR mėginių (žr. 3.1 lentelę). Kiekvienas mėginys buvo tirtas dvejomis sąlygomis: be praturtinimo žiedinėmis DNR molekulėmis ir po tokio praturtinimo (žr. 2.5). Visų žiedinėmis molekulėmis nepraturtintų DNR mėginių diagnostinės PGR rezultatas buvo neigiamas, tačiau atlikus PGR su praturtintais mėginiais, numatyto dydžio diagnostinis fragmentas (~620 bp) buvo aptiktas šešiuose mėginiuose (23, 1 %) (žr. 3.1 lentelę). Atlikus šių diagnostinių DNR fragmentų sekoskaitą, penkiuose mėginiuose (19,2 %) buvo patvirtintos PyV DNR sekos, o viename mėginyje nustatyta DNR seka atitiko nespecifiškai padaugintą *A. agrarius* genomo regioną (žr. 3.1 lentelę). Tirti mėginiai priklausė devyniolikoje Lietuvos vietovių sugautoms pelėms, tačiau visos PyV DNR sekos buvo aptiktos tik Rusnės vietovėje sugautų *A. agrarius* pelių inkstų DNR mėginiuose (žr. 3.1 lentelę).

3.1 lentelė. AagraPyV paplitimas *Apodemus agrarius* pelių inkstų DNR mėginiuose

„Sujungtų mėginių sk.“ nurodo, kiek skirtingų graužikų DNR mėginių buvo sujungta į vieną mėginį. NPD žymi mėginius, kuriuose DNR nebuvo praturtinta žiedinėmis molekulėmis, o PD – mėginius, kuriuose toks praturtinimas buvo atliktas. „Patvirtinti sekoskaita“ nurodo mėginius, kuriuose virusinės DNR buvimas buvo patvirtintas sekoskaita, o „N“ žymi nespecifinę PGR. Inkstų mėginiai buvo surinkti Gamtos tyrimų centro kolegų iš 2016–2018 m. Lietuvoje sugautų pelių, vadovaujant dr. Linui Balčiauskui.

Mėginio nr.	Sujungtų mėginių sk.	Mėginių surinkimo vieta	Teigiami NPD	Teigiami PD	Patvirtinti sekoskaita
1	3	Aukštikalniai	-	-	-
2	25	Ažuožeriai	-	+	N
3	17	Barčiai	-	-	-
4	2	Guodžiai	-	-	-
5	15	Dembava	-	-	-
6	6	Kalpokai	-	-	-
7	5	Kvėdarna	-	-	-

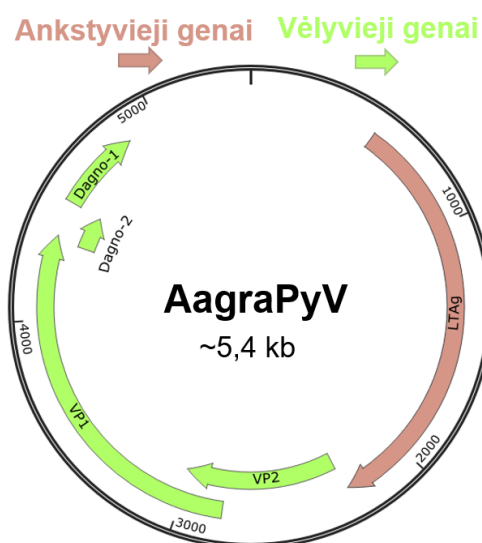
Mėginio nr.	Sujungtų mėginių sk.	Mėginių surinkimo vieta	Teigiami NPD	Teigiami PD	Patvirtinti sekoskaita
8	4	Luksnėnai	-	-	-
9	4	Lukštas	-	-	-
10	10	Mieliūnai	-	-	-
11	14	Naradava	-	-	-
12	21	Nemuno kilpos	-	-	-
13	34	Rusnė	-	-	-
14	35	Rusnė	-	-	-
15	24	Rusnė	-	-	-
16	19	Rusnė	-	+	+
17	34	Rusnė	-	+	+
18	35	Rusnė	-	+	+
19	33	Rusnė	-	+	+
20	32	Rusnė	-	+	+
21	6	Taujėnai	-	-	-
22	5	Tauragirė	-	-	-
23	30	Tytuvėnai	-	-	-
24	8	Trakai	-	-	-
25	3	Užubaliai	-	-	-
26	1	Gaurė	-	-	-
Iš viso:	425	Iš viso:	0	6 (23,1 %)	5 (19,2 %)

3.2 AagraPyV genomo sekų analizė

Penkiuose *A. agrarius* inkstų mėginiuose, kuriuose buvo aptikta AagraPyV DNR (žr. 3.1 lentelę), nustatyta 11 tarpusavyje besiskiriančių AagraPyV genomo sekų variantų (jų anotacija pateikiama 1 priede). Šių naujai nustatytų AagraPyV genomo sekų ir jų ORF koduojamų baltymų porinių palyginių su AagraPyV-ref rezultatai pateikiami 2 priede. Šešios iš vienuolikos naujai nustatytų AagraPyV genomo sekų labai panašios ir net 99,85–99,94 % sutampa su AagraPyV-ref seka, o likusios penkios sekos skiriasi labiau ir sutampa tik – 93,00–93,13 %. Visose nustatytose AagraPyV sekose genomo organizacija vienoda: ankstyvieji ir vėlyvieji genai koduojami ta pačia kryptimi. Jų genomo ilgiai panašūs ir varijuoja nuo 5385 bp iki 5408 bp. Didžiausiu nukleotidų sutapimu su AagraPyV sekomis pasižymi PyV sekos, kurios neseniai buvo aptiktos įvairių organizmų metagenominiuose sekoskaitos duomenyse (Buck et al., 2024). Šiose PyV sekose ankstyvieji ir vėlyvieji genai taip pat koduojami ta pačia kryptimi. Artimiausia AagraPyV genomo sekoms (61,95–63,09 %) PyV seka aptikta *Prunella modularis* erškėtžvirblio (PmoPyV; BK066705.1) sekoskaitos duomenyse. Kita PyV seka (AsyPyV; BK066627.1) pasižyminti mažesniu panašumu – 56,14–56,77 % buvo nustatyta *A. agrarius* pelės giminingo šeimininko – *A.*

sylvaticus, metagenominiuose duomenyse (Buck et al., 2024), Lyginant su įprastos organizacijos PyV sekomis, pavyzdžiui, *Centruroides sculpturatus* skorpionuose aptiktu PyV (CscPyV; MW175893.1) ir pelių MPyV (J02288.1), AagraPyV sekos labiau panašios į CscPyV, kurių sekų panašumas siekia 51,29–52,71 %, lyginant su MPyV, kurių sekų panašumas tik 49,34–50,56 %.

AagraPyV atviro skaitymo rėmelių analizė atskleidė ORF, koduojančius numanomas (angl. *putative*) LTA_g, VP1 ir VP2 homologus bei hipotetinį Dagno homologą (žr. 3.1 Pav.). Dagno ORF pavadintas atsižvelgiant į homologiją su CscPyV hipotetiniu Dagno ORF, kuris savo ruožtu buvo pavadintas iš „downstream agno“ žodžių trumpinio remiantis šio ORF lokalizacija vėlyvojo regiono 3' gale, kur pastarasis koduojamas +1 skaitymo rėmelyje VP1 geno atžvilgiu (Schmidlin et al., 2021). Visose nustatytose AagraPyV sekose Dagno ORF aptinkamas pasroviui nuo VP1 ORF ir visais atvejais koduoja identišką 118 ar. seką. Šis hipotetinis Dagno ORF pavadintas Dagno-1 (žr. 3.1 Pav.). Kitas hipotetinis ORF, aptinkamas 11 iš 12 AagraPyV sekų, kuris, kaip ir skorpionų PyV Dagno ORF, prasideda VP1 ORF pabaigoje ir VP1 ORF atžvilgiu yra +1 skaitymo rėmelyje, pavadintas Dagno-2 (žr. 3.1 Pav.).

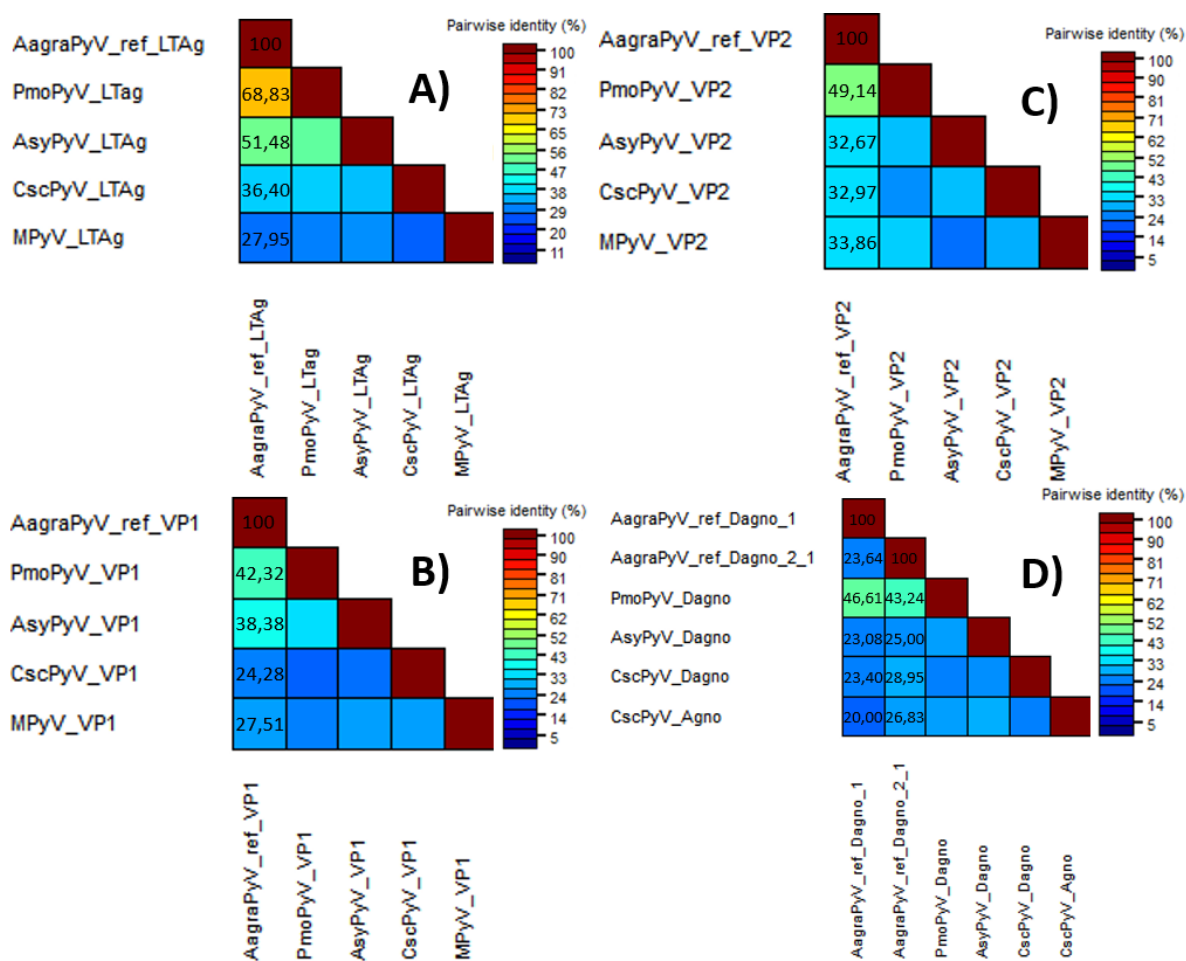


3.1 Pav. *Apodemus agrarius* pelių inkstų mėginiuose nustatyto AagraPyV poliomos viruso genomo organizacija ir numanomų ORF schema

Pavaizduoti AagraPyV-ref varianto ORF. Iliustracija sukurta naudojant Benchling.com ir SnapGene Viewer.

Palyginus visų AagraPyV ORF koduojamų baltymų ar. sekas, nustatyta, kad jos yra artimiausios PmoPyV koduojamoms baltymų sekoms (žr. 3.2 Pav.), kaip ir jų genomų sekos. Porinių palyginių rezultatai tarp PmoPyV ir visų AagraPyV ORF koduojamų baltymų sekų yra labai

panašūs (duomenys nepateikti). Lyginant AagraPyV-ref ir PmoPyV ORF koduojamų baltymų sekas, LTag sutapimas siekia 69,83 %, VP1 – 42,32 %, VP2 – 49,14 %, o AagraPyV Dagno-1 ir Dagno-2 sutapimas su PmoPyV Dagno siekia 46,61 % ir 43,24 % atitinkamai (žr. 3.2 Pav.). Šioje 3.2 Pav. scheme pateikti AagraPyV-ref sekų porinių palyginimų rezultatai ir su kitų PyV sekomis. Verta pastebėti, kad AagraPyV numanomo LTag baltymo sekos (konservatyviausias PyV baltymas) sutapimas buvo didesnis su skorpionuose aptiktų CscPyV LTag (36,4 %) nei su pelių MPyV LTag (27,95 %) (žr. 3.2A Pav.)



3.2 Pav. AagraPyV-ref numanomų LTag (A), VP1 (B) ir VP2 (C) bei hipotetinių Dagno-1 ir Dagno-2-1 (D) baltymų sekų porinių palyginių rezultatų schemas

AagraPyV-ref numanomi VP1 ir VP2 baltymai atitinka šiame tyrime pavadintus: VP1-Pilnas1 ir VP2-1. Palyginimai atlikti su tekste minėtomis PyV sekomis. Iliustracija buvo sukurta su SDT programa.

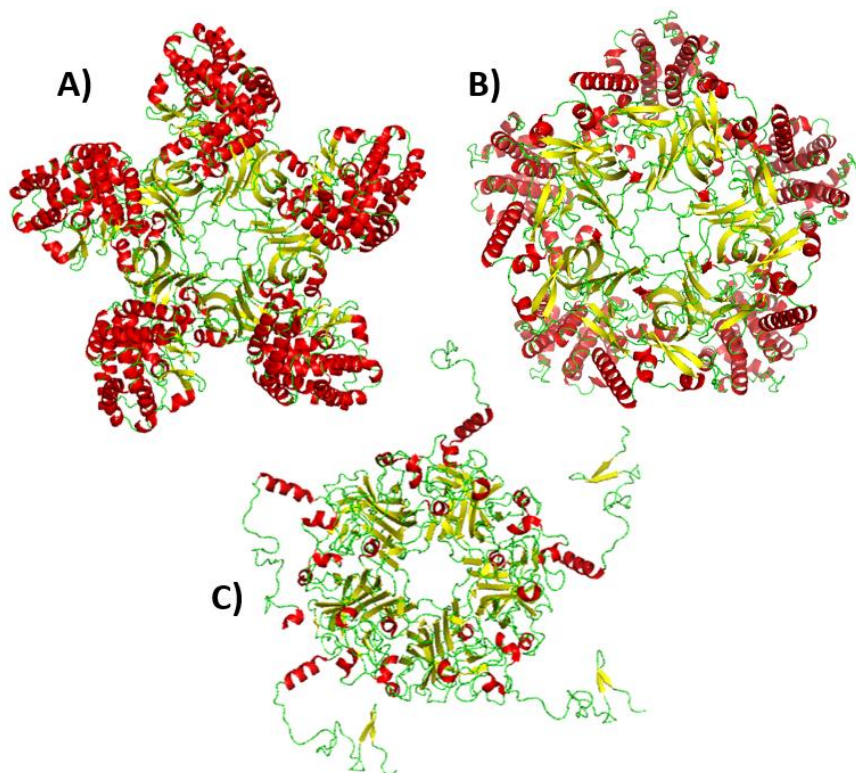
Septynių iš vienuolikos naujai nustatytų AagraPyV, kaip ir AagraPyV-ref, numanomi LTag ORF koduoja 581 ar. baltymus (žr. 1 Priedą), kurių ar. sekų sutapimas tarpusavyje yra 97,25–100 % (žr. 2 Priedą). Šių AagraPyV numanomose LTag baltymų sekose buvo prognozuotas LTag

baltymams būdingas J-domenas, cinką surišantis domenas, helikazės domenas, tačiau replikacijos pradžios surišimo domenas nenustatytas. J-domenui būdinga ypač konservatyvi HPDKGG seka (An et al., 2012), tačiau AagraPyV numanomuose LTag baltymuose ji pakitusi į HPDKNI. Taip pat LTag N-galui būdingas konservatyvus LXCXE motyvas (An et al., 2012) yra pakitęs į IYCDE seką, o helikazės domene esantis G/XXXXXGKT/S (angl. *Walker A box motif*) motyvas (An et al., 2012) yra išlikęs.

Dviejų AagraPyV numanomi LTag ORF yra pakitę (lemia ta pati mutacija) ir koduoja 520 ar. baltymą (žr. 1 Priedą), kuriame prognozuotas helikazės domenas yra sutrumpėjęs. Kitų likusių dviejų AagraPyV numanomi LTag ORF irgi yra pakitę (lemia skirtingos mutacijos) ir koduoja 359 ar. baltymus (žr. 1 Priedą), kuriuose buvo prognozuotas cinką surišantis domenas ir helikazės domenas, tačiau J-domenas nebuvo aptiktas.

PyV struktūrinio VP1 baltymo ilgis įprastai siekia apie 360-380 ar. AagraPyV atveju numanomas VP1 ORF (VP1-Pilnas) koduoja neįprastai ilgą – 511 arba 512 ar. baltymą. AagraPyV-ref VP1-Pilnas ar. seka yra identiška šešioms naujai nustatytų AagraPyV VP1-Pilnas sekoms (VP1-Pilnas1; 512 ar.) (žr. 1 Priedą). Likusių penkių AagraPyV VP1-Pilnas sekos (VP1-Pilnas2; 511 ar.) (žr. 1 Priedą) yra tarpusavyje identiškos, bet reikšmingai skiriasi nuo AagraPyV-ref VP1-Pilnas1 sekos – sutapimas siekia tik 94,32 % (žr. 2 Priedą). HHpred įrankio analizės rezultatai rodo, kad AagraPyV VP1-Pilnas baltymų centrinė dalis, tikėtina, yra homologiška kitų PyV VP1 baltymų centrinei sričiai (tikimybės įvertis - 85 %). Šią PyV VP1 baltymų centrinę dalį sudaro konservatyvios β -klostės, susilankstančios į superantrinę struktūrą, vadinamą „jelly roll“, per kurią VP1 monomerai sąveikauja tarpusavyje ir sudaro žiedo formos pentamerus (Stehle et al., 1996). Atlikus penkių VP1-Pilnas baltymo kopijų modeliavimą su AlphaFold programa, nustatyta, kad VP1-Pilnas monomerų struktūroje prognozuojamos β -klostės formuoja į „jelly roll“ panašią struktūrą, o penki VP1-Pilnas monomerai išsidėsto geometrija, kuri panaši į eksperimentiškai nustatytų VP1 baltymų pentamerinę struktūrą (žr. 3.3 Pav.). VP1-Pilnas ORF koduojami baltymai turi gerokai ilgesnę C-galo sritį, kurioje prognozuojami α -spiralių segmentai (žr. 3.3 Pav), tačiau šios srities modelio patikimumas yra labai mažas. Tokio tipo VP1 ORF koduojamas baltymas su ilgesne C-galo sritimi ir joje prognozuojamais α -spiralių segmentais (VP1-Cah), buvo neseniai nustatytas ir anksčiau minėtose PyV sekose (PmoPyV ir AsyPyV), aptiktose metagenominiuose duomenyse (Buck et al., 2024). Lyginant VP1-Cah ar. sekas tarpusavyje, didžiausias variabilumas stebimas C-galo srityje (duomenys nepateikti). Analogiškai, beveik visas ar. sekų nesutapimas (29

iš 30 ar.) tarp VP1-Pilnas1 ir VP1-Pilnas2 baltymų sekų, yra susitelkęs jų C-galo srityje (žr. 3 priedą).



3.3 Pav. VP1-Pilnas1 (A) ir VP1-Pilnas-2 (B) ORF koduojamų baltymų sumodeliuota struktūra iš penkių baltymo kopijų ir jų palyginimas su eksperimentiškai nustatyta *Mus musculus* PyV VP1 pentamerine struktūra (C – PDB: 7K25)

β -klostės pažymėtos geltonai, α -spiralės – raudonai. Struktūros prognozuotos su AlphaFold programa. Iliustracija sukurta su PyMOL programa.

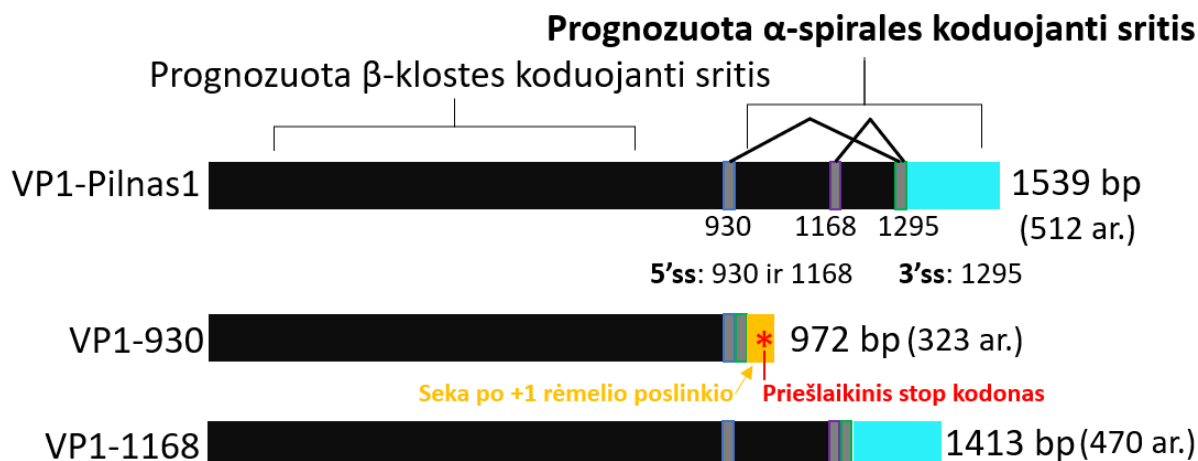
Visų nustatytų AagraPyV numanomi VP2 ORF koduoja 243 ar. ilgio baltymą. Panašiai kaip ir VP1-Pilnas baltymų atveju: AagraPyV-ref VP2 ar. seka sutampa su šešiomis naujai nustatytų AagraPyV VP2 sekomis (VP2-1), o sutapimas su likusių penkių AagraPyV VP2 sekomis (VP2-2), kurios tarpusavyje identiškos, siekia 96,71 % (žr. 2 Priedą). Daugeliui PyV VP2 baltymų būdingas konservatyvus MGXXS/T N-miristilinio motyvas (Schowalter ir Buck, 2013). Nepaisant to, kad AagraPyV numanomos VP2 baltymų sekos pradžioje turi Gly2, jų N-galo sekose nebuvo prognozuotas N-miristilinio motyvas. Remiantis struktūriniais duomenimis, manoma, kad didžioji PyV VP2 baltymų sekos dalis yra nestruktūrizuota (Chen et al., 1998), o AagraPyV numanomų VP2 baltymų sekose tik C-galo regionas (196-243) buvo prognozuotas kaip nestruktūrizuotas. Be to, AagraPyV numanomų VP2 baltymų C-galo srityse taip pat buvo prognozuota branduolio lokalizacijos signalinė seka, o ši yra būdinga ir žinomiems VP2 baltymams (Clever et al., 1993; Bennett et al., 2015).

Dešimt iš vienuolikos AagraPyV Dagno-2 ORF koduoja 55 ar. ilgio hipotetinį baltymą, o vienas AagraPyV – 81 ar. ilgio hipotetinį baltymą (Dagno-2-3) (žr. 1 Priedą). AagraPyV-ref Dagno-2 baltymo seka identiška kitoms šešių naujai nustatytų AagraPyV Dagno-2 sekoms (Dagno-2-1), o jos sutapimas su kitų trijų AagraPyV 55 ar. ilgio Dagno-2 sekomis (Dagno-2-2) siekia 92,73 % (žr. 2 Priedą). Eksperimentiškai nustatyta JCPyV Agno baltymo struktūra formuoja vieną trumpą α -spirale N-gale ir vieną centrinėje dalyje (Saribas et al., 2018). Dagno baltymų atveju prognozuotuose struktūrų modeliuose didžioji Dagno-1 baltymo sekos dalis formuoja kelias α -spirales, Dagno-2-1 ir Dagno-2-3 – po vieną α -spirale N-gale, o Dagno-2-2 – vieną ilgą α -spirale, prasidedančią nuo N-galo ir besitęsiančią per didžiąją sekos dalį (žr. 4 Priedą). Dagno-1 ir Dagno-2 baltymų sekose taip pat aptinkama galima NLS seka, kaip ir žmogaus PyV Agno baltymuose (Saribas et al., 2018).

3.3 AagraPyV VP1-Pilnas1 ORF ir jo prognozuotų splaisingo variantų koduojamų baltymų susirinkimo į VPD tyrimas

3.3.1 Potencialių AagraPyV VP1-Pilnas1 ORF splaisingo variantų nustatymas

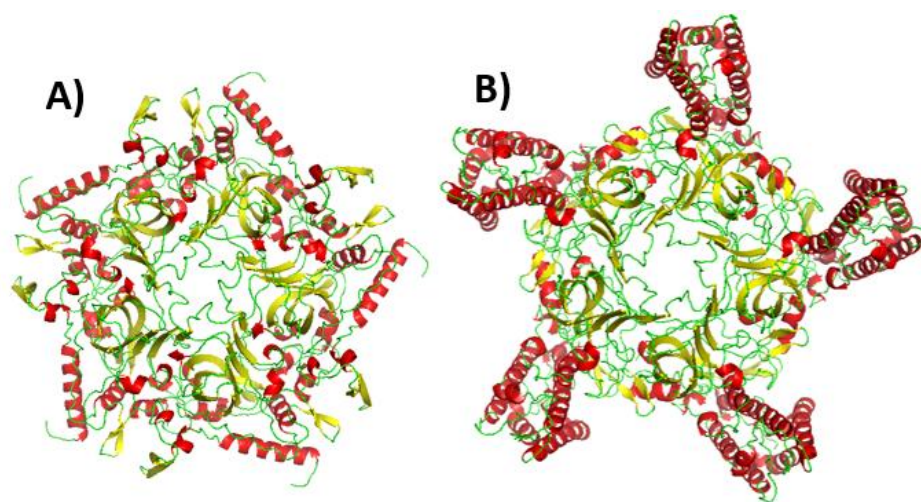
Įprastai VP1 genai neturi intronų (Barrett et al., 1991), tačiau dėl VP1-Pilnas1 ORF neįprasto ilgio ir dėl jo koduojamo baltymo neįprastos C-galo sumodeliuotos struktūros (žr. 3.3A Pav.), buvo nuspręsta nustatyti potencialias AagraPyV VP1-Pilnas1 ORF splaisingo vietas, naudojant ASSP įrankį. Splaisingo variantai buvo atrinkti pagal splaisingo vietų patikimumo įverčius: donorinėms vietoms įvertis > 8 , o akceptorinėms > 6 , bei būtinai išlaikant sąlygą, kad numatytas intronas apimtų numanomo VP1-Pilnas1 ORF gale koduojamą neįprastą α -spiralių sritį. Po šios analizės buvo atrinkti du potencialūs VP1-Pilnas1 splaisingo variantai: VP1-930 ir VP1-1168, kuriuose buvo pašalintas vienas intronas, sujungiant 930 bp arba 1168 bp VP1-Pilnas1 ORF pozicijoje esančią donorinę vietą su 1295 bp pozicijoje esančia akceptorine vieta (žr. 2.4.2 ir 3.4 Pav.). Šis sujungimas lėmė VP1-930 ORF +1 rėmelio poslinkį ir priešlaikinio stop kodono susidarymą (žr. 3.4 Pav.).



3.4 Pav. Tyrimui atrinktų AagraPyV VP1-Pilnas1 ORF prognozuotų splaisingo variantų schema

VP1-Pilnas1 ORF sekoje pavaizduotos prognozuotos splaisingo vietos – dvi donorinės (5'ss: 930 ir 1168) ir viena akceptorinė (3'ss: 1295) vieta, kurios patenka į prognozuotą α -spirales koduojančią sritį. ASSP įrankio splaisingo vietų įverčiai: 930 5'ss – 12,3, 1168 5'ss – 13,7, 1295 3'ss – 6,1.

Atrinktų VP1-930 ir VP1-1168 splaisingo variantų koduojamų baltymų (atitinkamai 323 ar. ir 470 ar. ilgio) struktūrų įvertinimui buvo sumodeliuotos jų struktūros iš penkių baltymo kopijų (žr. 3.5 Pav.). Lyginant jas su sumodeliuota VP1-Pilnas1 pentamerine struktūra (žr. 3.3A Pav.), VP1-930 ir VP1-1168 struktūros pasižymi mažesniu α -spiralių kiekiu jų C-galuose, kas labiau atitinka eksperimentiškai nustatytą *M. musculus* pelių PyV VP1 pentamerinę struktūrą (žr. 3.3C Pav.).



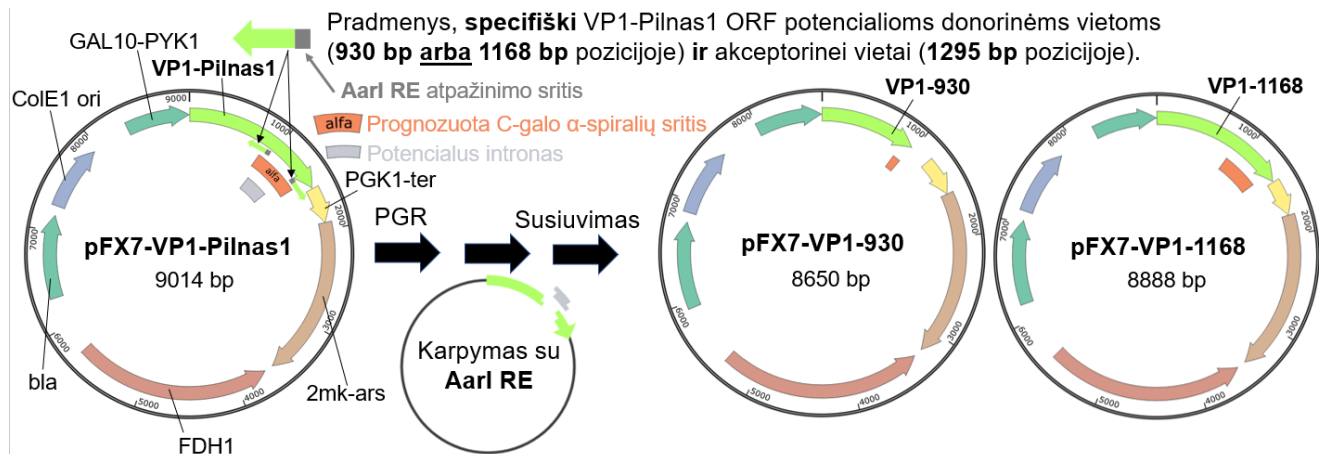
3.5 Pav. AagraPyV VP1-Pilnas1 ORF prognozuotų splaisingo variantų VP1-930 (A) ir VP1-1168 (B) koduojamų baltymų sumodeliuotos struktūros iš penkių baltymo kopijų
 β -klostės pažymėtos geltonai, α -spiralės – raudonai. Struktūros prognozuotos su AlphaFold programa. Iliustracija sukurta su PyMOL programa.

3.3.2 VP1-Pilnas1 ORF ir jo prognozuotų splaisingo variantų raiškos vektorių konstravimas

AagraPyV ORF klonavimo darbams buvo naudojamos AagraPyV-ref ir AagraPyV-20-1 genomo sekos (žr. 2 Priedą), kurios buvo įterptos į pJET1.2 klonavimo vektorių (žr. 2.5). Nuo gauto pJET1.2-AagraPyV-ref plazmidinio vektoriaus buvo padauginti šių ORF: VP1-Pilnas1, VP2-1, Dagno-1, ir Dagno-2-1 DNR sekos, o nuo pJET1.2-AagraPyV-20-1: VP1-Pilnas2 ORF DNR seka (pradmenys – žr. 2.1 lentelę). Išgryninti PGR produktai buvo įterpti į pJET1.2 klonavimo vektorių, o jų sekos patikrintos Sanger sekoskaitos metodu (Azenta, Vokietija) (pradmenys – žr. 2.1 lentelę).

AagraPyV VP1-Pilnas1 ORF ir jo prognozuotų splaisingo variantų baltymų raiškai mielėse buvo sukonstruoti raiškos vektoriai pFX7 vektoriaus pagrindu. Šis vektorius turi bakterijų ColE1 ir mielių dvimikroninės plazmidės replikacijos pradžios regionus (ColE1 ori ir 2mk-ars atitinkamai), *bla* geną (koduoja β-laktamazę), suteikiantį bakterijoms atsparumą ampicilinui, *FDH1* geną (koduoja formaldehido dehidrogenazę), suteikiantį mielėms atsparumą formaldehidui bei turi raiškos kasetę, kurią reguliuoja galaktozės indukuojamas hibridinis GAL10-PYK1 promotorius (žr. 3.6 Pav.).

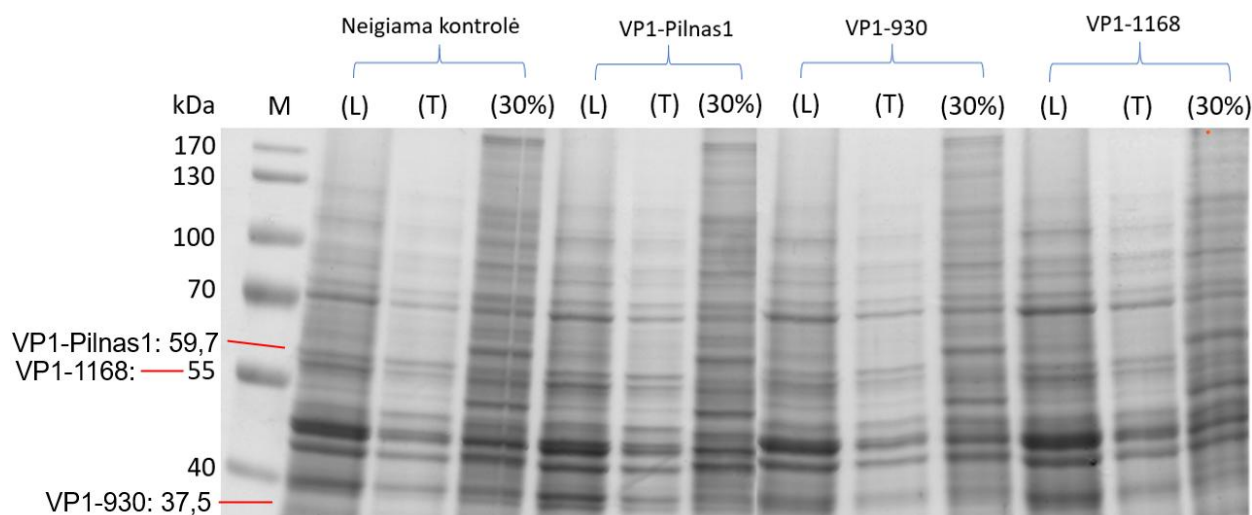
Šių raiškos vektorių konstravimui, pirmiausia VP1-Pilnas1 ORF buvo iškirptas iš pJET1.2-VP1-Pilnas1 plazmidinio vektoriaus su XbaI RE. Gautas DNR fragmentas buvo susiūtas su XbaI RE perkirptu pFX7 raiškos vektoriumi, kurio galai buvo defosforilinti, taip patalpinant šį ORF po GAL10-PYK1 promotoriumi. Sukonstruotas pFX7-VP1-Pilnas1 plazmidinis vektorius buvo panaudotas PGR reakcijai su pradmenimis (žr. 2.1 lentelę), specifiskais numatytoms VP1-Pilnas1 ORF egzono-introno vietoms ir savo galuose turinčiais AarI RE atpažinimo sritį (žr. 3.6 Pav.). Išgryninti PGR produktai buvo sukarpyti su AarI RE, į reakciją papildomai įdėjus ir DpnI RE, kuri karmo tik metilintą DNR – šiuo atveju pFX7-VP1-Pilnas1 plazmidinį vektorių, naudotą kaip matricą PGR reakcijoje. Po restrikcijos reakcijos numatytos egzono-egzono sritys buvo komplementariai susiūtos. Atrinkti pFX7-VP1-Pilnas1, pFX7-VP1-930 ir pFX7-VP1-1168 plazmidiniai vektoriai buvo patikrinti naudojant Sanger sekoskaitą (pradmenys – žr. 2.1 lentelę).



3.6 Pav. pFX7-VP1-930 ir pFX7-VP1-1168 plazmidinių raiškos vektorių konstravimo schema
Iliustracija sukurta naudojant Benchling.com, SnapGene Viewer ir Biorender.com.

3.3.3 VP1-Pilnas1 ORF ir jo prognozuotų splaisingo variantų koduojamų baltymų raiškos ir susirinkimo į VPD įvertinimas

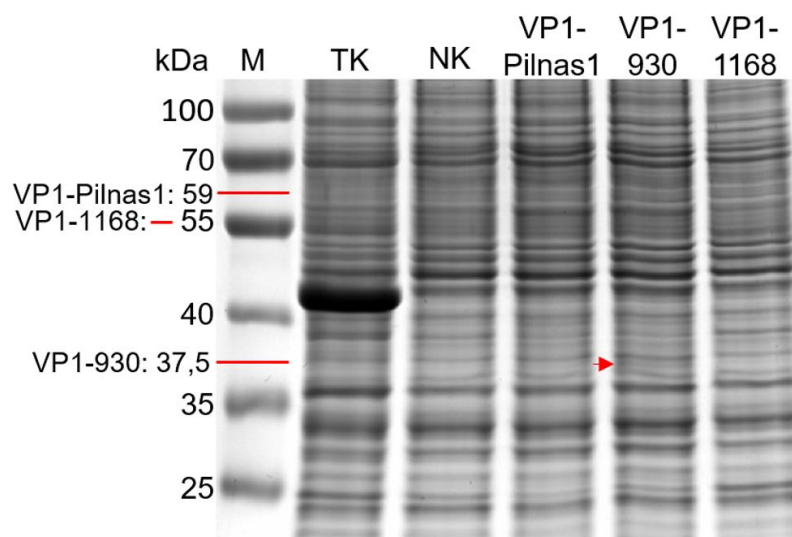
VP1-Pilnas1 ORF ir jo prognozuotų splaisingo variantų VP1-930 ir VP1-1168 (žr. 3.3.1) koduojamų baltymų gebėjimas susirinkti į VPD pirmiausia buvo tirtas *S. cerevisiae* mielių 214c kamieno ląstelėse. Šiam tikslui buvo sukonstruoti trys pFX7 plazmidiniai raiškos vektoriai– pFX7-VP1-Pilnas1, pFX7-VP1-930 ir pFX7-VP1-1168 – su atitinkamų ORF sekomis (žr. 3.3.2). Po šių plazmidinių vektorių transformacijos į mielių ląsteles, baltymų raiškos indukcijos ir užaugintos mielių biomasės ardymo buvo paruošti ląstelių lizato, po lizato centrifugavimo gautos tirpios frakcijos ir po šios frakcijos ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį gautos nuosėdos baltymų mėginiai (žr. 2.8). Šie mėginiai buvo analizuoti NDS-PAGE. Palyginus neigiamos kontrolės ir tiriamųjų mėginių baltymų profilius, skirtumų ties atitinkamų VP1 baltymo variantų prognozuojamų molekulinė masių sritimis neaptikta.



3.6 Pav. AagraPyV VP1-Pilnas1 ORF ir jo prognozuotų splaisingo variantų koduojamų baltymų raiškos analizė NDS-PAGE

Kairėje pažymėtos VP1-Pilnas1, VP1-1168 ir VP1-930 baltymų pozicijos pagal jų prognozuojamą molekulinę masę. Neigiama kontrolė, VP1-Pilnas1, VP1-930 ir VP1-1168 – mėginiai, paruošti iš mielių ląstelių, transformuotų atitinkamai pFX7, pFX7-VP1-Pilnas1, pFX7-VP1-930 ir pFX7-VP1-1168 plazmidiniais vektoriais. M – Baltymų molekulinės masės standartas, L – lizato mėginiai, T – tirpios frakcijos mėginiai, 30 % – mėginiai, gauti po ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį.

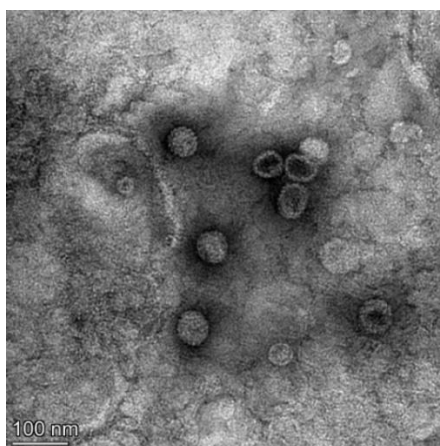
Neaptikus VP1-Pilnas1 ORF ir jo prognozuotų splaisingo variantų koduojamų baltymų raiškos *S. cerevisiae* 214c kamieno, tolimesni raiškos tyrimai buvo atlikti 214c- $\Delta pep4$ kamieno ląstelėse, kuriose proteolizei jautrūs rekombinantiniai baltymai geriau apsaugomi nuo degradacijos (žr. 2.2). Po pFX7-VP1-Pilnas1, pFX7-VP1-930 ir pFX7-VP1-1168 plazmidinių raiškos vektorių transformacijos į mielių 214c- $\Delta pep4$ kamieno ląsteles ir baltymų raiškos indukcijos buvo surinkti analogiškai kaip ir 214c kamieno baltymų mėginiai, tačiau prieš ultracentrifugavimo etapą tirpi baltymų frakcija buvo papildomai koncentruota su amonio sulfatu (žr. 2.8). Po lizato ir tirpios frakcijos mėginių analizės NDS-PAGE, nei vieno VP1-Pilnas1 varianto sintezė nebuvo nustatyta (žr. 5 Priedą). Vis dėlto palyginus neigiamos kontrolės ir tiriamųjų mėginių, gautų po ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį, baltymų profilius - VP1-930 mėginyje buvo aptikta silpna baltymo juosta, atitinkanti jo prognozuojamą molekulinę masę (žr. 3.7 Pav.).



3.7 Pav. AagraPyV VP1-Pilnas1 ORF ir jo prognozuotų splaisingo variantų koduojamų baltymų raiškos analizė NDS-PAGE

Kairėje pažymėtos VP1-Pilnas1, VP1-930 ir VP1-1168 baltymų pozicijos pagal jų prognozuojamą molekulinę masę. TK (teigiama kontrolė), NK (neigiama kontrolė), VP1-Pilnas1, VP1-930 ir VP1-1168 – baltymų mėginiai, gauti po koncentravimo amonio sulfatu ir ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį, buvo paruošti iš mielių ląstelių, transformuotų atitinkamai: pFX7-CglPyV-VP1 (CglPyV VP1 ~45 kDa), pFX7, pFX7-VP1-Pilnas1, pFX7-VP1-930 ir pFX7-VP1-1168 plazmidiniais vektoriais.

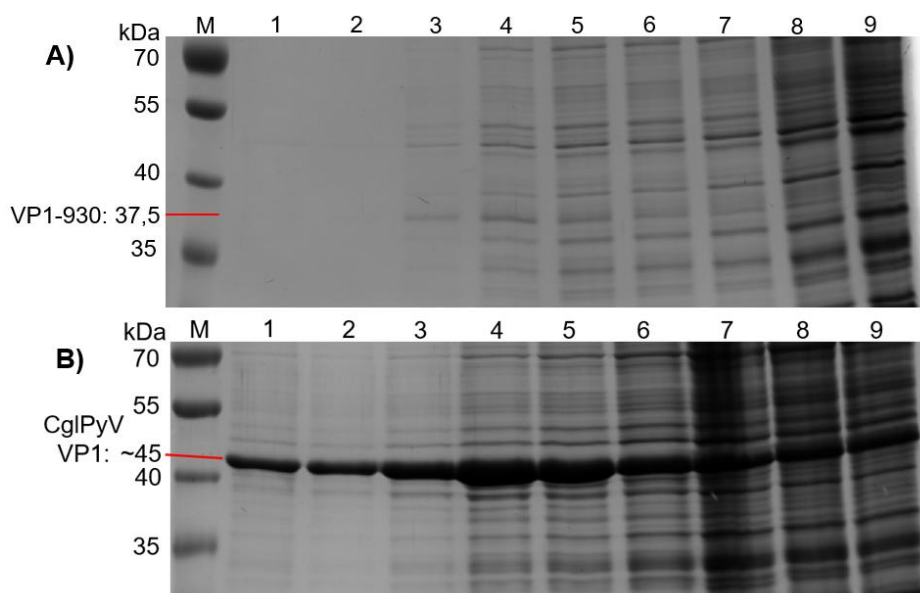
Analizuojant VP1-930 baltymo mėginį transmisiniu elektroniniu mikroskopu (žr. 2.8) buvo aptiktas mažas kiekis struktūrų, panašių į PyV VP1 baltymų formuojamas ~45 nm dydžio VPD (žr. 3.8 Pav.) (Zielonka et al., 2006; Norkienė et al., 2015). Kituose tirtuose mėginiuose (VP1-Pilnas1 ir VP1-1168) analogiškos struktūros nebuvo aptiktos.



3.8 Pav. VP1-930 baltymo mėginyje aptiktų VPD transmisinės elektroninės mikroskopijos nuotrauka

Skalė žymi 100 nm. Aptiktų VPD dydis apie 45 nm.

Iš VP1-930 baltymų potencialiai susirenkančių VPD gryninimui jodiksanolio tankio gradiente (žr. 2.9) buvo panaudotas baltymų mėginys, gautas po tirpios frakcijos ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį. Po jodiksanolio tankio gradiento ultracentrifugavimo surinktų skirtingų frakcijų baltymų mėginių frakcionavimo NDS-PAGE, baltymų juosta, atitinkanti VP1-930 baltymo prognozuojamą molekulinę masę (žr. 3.9A Pav.), vis dar buvo matoma, tačiau nepavyko gauti ryškaus jos praturtinimo atskirose frakcijose. Skirtingai nei VP1-930 atveju, CglPyV VP1 baltymo, kuris šiame darbe buvo naudotas kaip į VPD susirenkančio VP1 pavyzdys, frakcijų mėginių NDS-PAGE analizėje buvo matomas jo dydį atitinkančios juostos praturtinimas (žr. 3.9B Pav.). Vis dėlto, lyginant VP1-930 ir CglPyV VP1 trečiosios ir ketvirtosios frakcijų mėginių NDS-PAGE baltymų profilius, VP1-930 atveju ~37,5 kDa baltymų juosta buvo šiek tiek intensyvesnė už žemiau esančią ~36 kDa baltymų juostą, o CglPyV VP1 atveju šių juostų intensyvumas buvo panašus (žr. 3.9A ir B Pav.).



3.9 Pav. Po ultracentrifugavimo jodiksanolio tankio gradiente surinktų frakcijų analizė NDS-PAGE

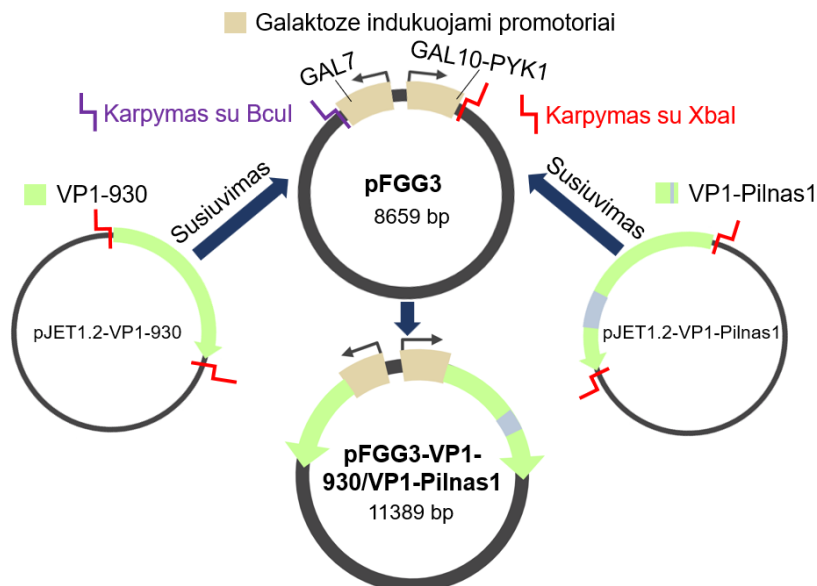
Kairėje pažymėtos VP1-930 ir CglPyV VP1 baltymo pozicijos pagal jų prognozuojamą molekulinę masę. M – Baltymų molekulinės masės standartas. Skaičiai 1–9 žymi po ultracentrifugavimo gautas frakcijas. VP1-930 (A) ir CglPyV VP1(B) baltymų mėginiai buvo paruošti iš mielių ląstelių, transformuotų atitinkamai: pFX7-VP1-930 ir pFX7-CglPyV-VP1 plazmidiniais vektoriais.

3.4 VP1-930 variantu ko-raiškos su kitais poliomos virusų baltymais ir susirinkimo į VPD tyrimas

3.4.1 VP1-930 variantu ir kitų poliomos virusų baltymus koduojančių ORF ko-raiškos vektorių konstravimas

Po gryninimo jodksanolio tankio gradientu VP1-930 frakcijų mėginiuose neaptikus ryškaus baltymų juostos praturtinimo ties jo prognozuojama molekulinė masė (susirinkimo į VPD požymis), toliau buvo atlikta VP1-930 ko-raiška su kitais poliomos virusų baltymais, tikintis, kad kuris nors iš jų prisidės prie VPD formavimo.

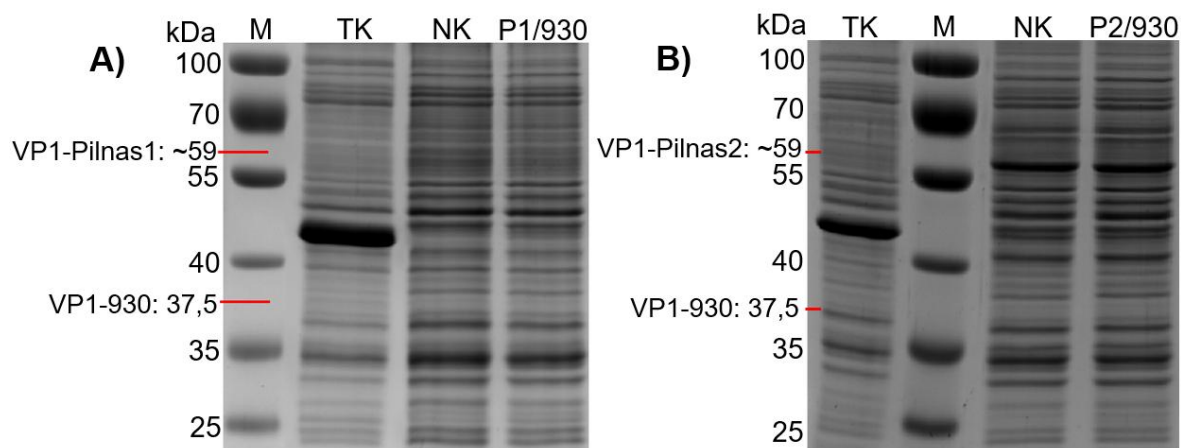
Ko-raiškos vektoriai buvo konstruoti pFGG3 vektoriaus pagrindu. Šis vektorius turi tuos pačius plazmidinius komponentus kaip ir pFX7 raiškos vektorius (žr. 3.3.2), tačiau be GAL10-PYK1 raiškos kasetės, jis taip pat turi ir GAL7 raiškos kasetę. Abi raiškos kasetės leidžia galaktoze indukuoti dviejų baltymų raišką vienu metu. Vis dėlto šios indukcijos lygis skiriasi: ORF raiška nuo GAL7 promotoriaus yra apie 5 kartus stipresnė negu nuo GAL10-PYK1 promotoriaus. Ko-raiškos vektorių konstravimui su VP1-930 variantu (schemos pvz., žr. 3. 10 Pav.), iš pradžių pJET1.2-VP1-930 plazmidinis vektorius (žr. 3.3.2) buvo sukarpytas su XbaI RE. Gautas VP1-930 DNR fragmentas buvo susiūtas per komplementarius galus su pFGG3 vektoriumi, perkirptu BcuI RE ir defosforilintais DNR galais, taip sukonstruojant pFGG3-VP1-930 plazmidinį vektorių. Su XbaI RE sukarpius pJET1.2 klonavimo vektorius, turinčius įterptus VP1-Pilnas1, VP1-Pilnas2, VP2-1, Dagno-1, Dagno-2-1 ORF (žr. 3.3.2) arba MarPyV2 sTAg geną (žr. 2.3), šie ORF/geno DNR fragmentai buvo išgryninti ir susiūti su pFGG3-VP1-930 plazmidiniu vektoriumi, prieš tai jį perkirpus su XbaI RE, o DNR galus defosforilinus. pFGG3-VP1-930/VP1-Pilnas1 ko-raiškos vektoriaus konstravimo schema parodyta 3.10 Pav. Analogišku būdu kaip ir pFGG3-VP1-930/VP1-Pilnas1 buvo sukonstruoti: pFGG3-VP1-930/VP1-Pilnas2, pFGG3-VP1-930/VP2-1, pFGG3-VP1-930/Dagno-1, pFGG3-VP1-930/Dagno-2-1, ir pFGG3-VP1-930/MarPyV2-sTAg ko-raiškos vektoriai, o jų visų sekos patikrintos Nanopore sekoskaitos metodu (SeqVision, Lietuva). Tokiu būdu sukonstruoti pFGG3-VP1-930/VP1-Pilnas1, pFGG3-VP1-930/VP1-Pilnas2, pFGG3-VP1-930/VP2-1, pFGG3-VP1-930/Dagno-1, pFGG3-VP1-930/Dagno-2-1, ir pFGG3-VP1-930/MarPyV2-sTAg ko-raiškos vektoriai buvo patikrinti naudojant Nanopore sekoskaitą.



3.10 Pav. pFGG3-VP1-930/VP1-Pilnas1 ko-raiškos vektoriaus konstravimo schema
Iliustracija sukurta su Biorender.com

3.4.2 VP1-930 varianto ko-raiškos su kitais poliomos virusų baltymais ir susirinkimo į VPD tyrimas

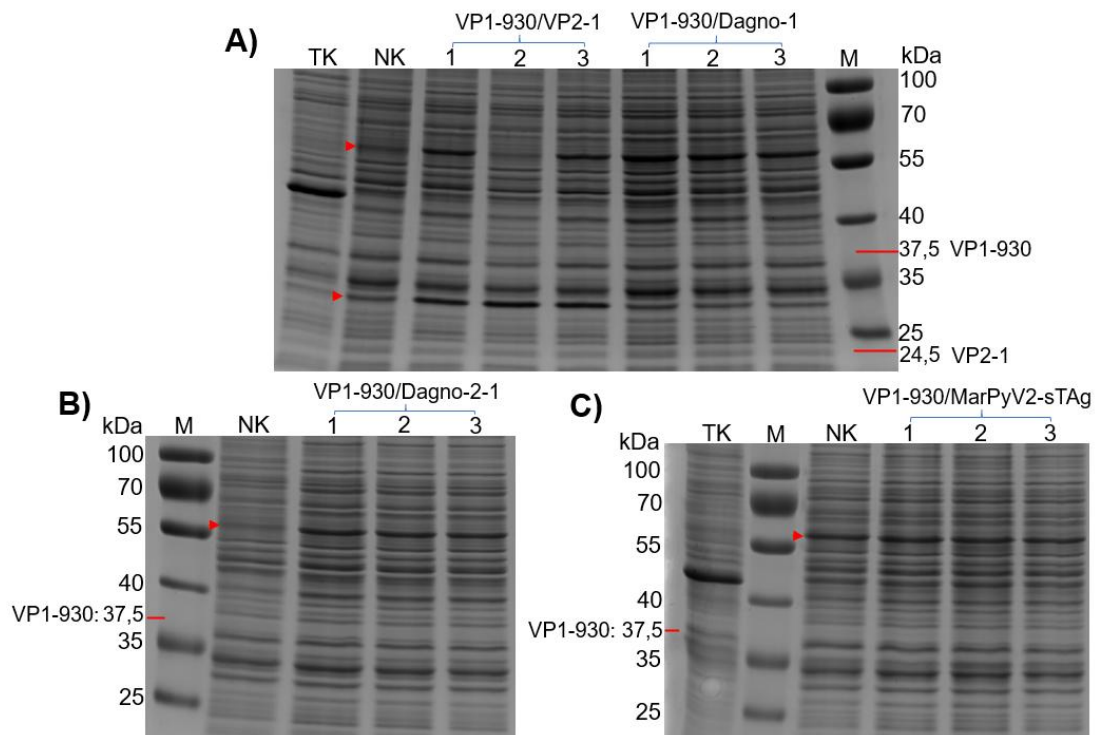
Sukonstruoti pFGG3-VP1-930/VP1-Pilnas1, pFGG3-VP1-930/VP1-Pilnas2, pFGG3-VP1-930/VP2-1, pFGG3-VP1-930/Dagno-1, pFGG3-VP1-930/Dagno-2-1 ir pFGG3-VP1-930/MarPyV2-sTA_g ko-raiškos plazmidiniai vektoriai buvo transformuoti į mielių ląsteles ir po baltymų raiškos indukcijos paruošti baltymų mėginiai buvo analizuoti NDS-PAGE (žr. 6 Priedą, 3.11 Pav. ir 3.12). Palyginus po ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį gautų VP1-Pilnas1 ir VP1-Pilnas2 ko-raiškos mėginių baltymų profilius su neigiama kontrole, akivaizdžių skirtumų neaptikta (3.11 Pav.).



3.11 Pav. AagraPyV VP1-Pilnas1 ir VP1-930 (A) bei VP1-Pilnas2 ir VP1-930 (B) ORF koduojamų baltymų ko-raiškos analizė NDS-PAGE metodu

Kairėje gelių pusėje pažymėtos VP1-Pilnas1, VP1-930 ir VP1-Pilnas2 baltymų pozicijos pagal jų prognozuojamą molekulinę masę. M – Baltymų molekulinės masės standartas. TK (teigiama kontrolė), NK (neigiama kontrolė), P1/930 ir P2/930 - po ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį gauti baltymų mėginiai, paruošti iš mielių ląstelių, transformuotų atitinkamai: pFX7-CglPyV-VP1 (CglPyV VP1 ~45 kDa), pFGG3, pFGG3-VP1-Pilnas1/930 ir pFGG3-VP1-Pilnas2/930 plazmidiniais vektoriais.

Lyginant kitų ko-raiškos partnerių ir neigiamos kontrolės mėginių, gautų po ultracentrifugavimo, NDS-PAGE baltymų profilius, nei vienu ko-raiškos atveju taip pat nebuvo aptikta skirtumų ~37,5 kDa baltymų molekulinės masės srityje, atitinkančioje VP1-930 varianto prognozuojamą dydį (žr. 3.12 Pav.). Vis dėlto skirtumų nustatyta kitose molekulinė masių srityse. VP2-1, Dagno-1 ir Dagno-2-1 ko-raiškos atvejais, atliktais to paties mielių auginimo metu, nei neigiamos kontrolės mėginyje, nei viename iš trijų VP2-1 ko-raiškos mėginių (paruoštame iš 2-ojo mielių klonu) nebuvo aptiktas ~60 kDa baltymų juostos praturtinimas (žr. 3.12A ir B Pav.). Vis dėlto šios juostos praturtinimas buvo aptiktas neigiamos kontrolės mėginyje, paruoštame iš kito (atskiro) mielių auginimo (žr. 3.12C Pav.). Išskirtinai tik VP2-1 ko-raiškos mėginiuose buvo aptiktas ~32 kDa baltymų juostos praturtinimas (žr. 3.12A Pav.).



3.12 Pav. AagraPyV VP1-930 variantu ko-raiškos su AagraPyV numanomais baltymais: VP2-1 (A), Dagno-1 (A), Dagno-2-1 (B) bei su MarPyV2 sTAag (C) analizė NDS-PAGE

Atitinkamų gelių šonuose pažymėtos VP1-930 ir VP2-1 baltymų pozicijos pagal jų prognozuojamą molekulinę masę. Geliuose rodyklėmis pažymėtos pozicijos, kuriose aptinkami baltymų profilio skirtumai tarp mėginių. M – Baltymų molekulinės masės standartas. TK (teigiama kontrolė), NK (neigiama kontrolė) ir kiti iš eilės virš gelių sužymėti tiriamieji mėginiai - po ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį gauti baltymų mėginiai, paruošti iš mielių ląstelių, transformuotų atitinkamai: pFX7-CglPyV-VP1 (CglPyV VP1 ~45 kDa), pFGG3, pFGG3-VP1-930/VP2-1, pFGG3-VP1-930/Dagno-1, pFGG3-VP1-930/Dagno-2-1, ir pFGG3-VP1-930/MarPyV2-sTAag plazmidiniais vektoriais.

4. Rezultatų aptarimas

Šiame magistro darbe buvo tiriamos *Apodemus agrarius* pelių inkstų DNR mėginiuose identifikuotos AagraPyV sekos, kurios mūsų žiniomis yra pirmosios ir kol kas vienintelės NGO PyV sekos, nustatytos konkretaus organizmo audinio mėginyje. Vis dėlto pirmosios NGO tipo PyV sekos buvo neseniai atrastos metagenominių mėginių sekoskaitos duomenyse (Buck et al., 2024). Lyginant su metagenominiais radiniais, AagraPyV sekų identifikavimas audinio mėginiuose suteikia stipresnį biologinį pagrindą šio viruso ryšiui su tiriamu šeimininku, tačiau siekiant įvertinti, ar AagraPyV natūralus šeimininkas yra *A. agrarius* pelės reikalingi papildomi tyrimai. Šiame darbe buvo įvertintas AagraPyV paplitimas *A. agrarius* inkstų DNR mėginiuose, nustatytos ir bioinformatiniais metodais išanalizuotos naujos AagraPyV genomo sekos, taip pat ištirtas numanomų struktūrinių baltymų gebėjimas susirinkti į VPD *S. cerevisiae* mielėse. VPD susiformavimo atveju jos galėtų būti panaudotos kaip antigenai serologiniuose tyrimuose su *A. agrarius* kraujo serumo mėginiais, siekiant nustatyti galimai buvusią AagraPyV infekciją.

Diagnosticine PGR tiriant iš 19 Lietuvos vietovių sugautų *A. agrarius* pelių inkstų DNR mėginius, AagraPyV DNR sekos buvo aptiktos tik kai kuriuose Rusnės vietovėje, esančioje Lietuvos vakarų pakraštyje, sugautų pelių mėginiuose. Šios vietovės *A. agrarius* pelių inkstų DNR mėginyje buvo aptikta ir pirmoji – AagraPyV-ref seka. Vis dėlto kai kuriose vietovėse sugautų pelių mėginiuose AagraPyV DNR galėjo likti neaptikta, nes mėginiai buvo paruošti sujungus palyginti nedidelį kiekį skirtingų graužikų DNR mėginių, todėl neigiami rezultatai nebūtinai gali reikšti, kad šis virusas nėra paplitęs tose vietovėse.

AagraPyV DNR sekos diagnosticine PGR galėjo būti aptiktos tik tais atvejais, jei mėginiai prieš tai buvo praturtinti žiedinėmis DNR molekulėmis. Tai rodo, kad tiriamuose mėginiuose viruso DNR kiekis buvo labai mažas, o pakankamam diagnostinės PGR jautrumui pasiekti buvo reikalinga praturtinti viruso žiedinę DNR. Tokio praturtinimo svarbą PyV sekų aptikimui pagrindžia ir vienas tyrimas, kuriame phi29 DNR polimerazės pagrindu taikomas žiedinių DNR molekulių praturtinimas leido efektyviai padauginti PyV žiedinę DNR seką žmogaus genominės DNR fone – iki $\sim 10^8$ karto, net, kai reakcijoje buvo tik ~ 10 PyV genomo kopijų (Rockett et al., 2015).

Inkstų mėginiuose nustačius 11 tarpusavyje besiskiriančių AagraPyV genomo sekų ir jas palyginus su AagraPyV-ref, kai kurių sekų sutapimas siekė tik 93,1 %, nors įprastai tos pačios PyV rūšies variantų genomo sekų sutapimas būna labai aukštas ir siekia 98-100 % (Gaynor et al., 2007; Agostini et al., 2014; Ehlers et al., 2015; Zheng et al., 2015; Ranjan et al., 2017; Makvandi et al.,

2018). Vis dėlto literatūroje randama pavyzdžių, kad kai kurių PyV rūšių variantų sekos tarpusavyje skiriasi net ir apie 5 % (Siebrasse et al., 2012; Lim et al., 2014).

Analizuojant AagraPyV genomo sekas, visose buvo nustatyti numanomi LTag, VP1 ir VP2 ORF bei hipotetiniai Dagno-1 ir Dagno-2-1 ORF. Keturių iš vienuolikos naujai nustatytų AagraPyV PyV sekų numanomi LTag ORF pakitę ir koduoja trumpesnes LTag baltymų formas: dviejų AagraPyV LTag ORF koduoja baltymą su trumpesniu prognozuotu helikazės domenu, o kitų dviejų AagraPyV LTag ORF koduojamas baltymas neturi prognozuoto J-domeno. Nežinoma ar šie LTag ORF pakitimai galėjo atsirasti dėl sekoskaitos klaidų (genomų sekų sekoskaita buvo atlikta vieną kartą), ar tai tikros AagraPyV sekose esančios mutacijos, dėl kurių jos galėtų būti defektyvios virusų sekos. Tyrimai su kitų PyV LTag J-domenu, rodo, kad jame įvesti amino rūgščių pokyčiai gerokai sumažina virusų gebėjimą replikuoti virusinę DNR (Campbell et al., 1997; Lemieux ir Bastin, 2000), panaikina LTag gebėjimą transformuoti ląsteles (Srinivasan et al., 1997), sumažina jo sintezės lygį ir manoma jį destabilizuoja (Whalen et al., 2005).

LTag yra konservatyviausias PyV baltymas (Spencer et al., 2016), o AagraPyV sekų numanomi LTag baltymai yra artimesni skorpionuose aptikto PyV LTag baltymo sekai nei žinduolių, pvz. pelių MPyV LTag sekai. LTag baltymų J-domenui yra būdingas ypač konservatyvus HPDKGG motyvas (An et al., 2012), kuris yra atsakingas už LTag sąveiką su ląstelės šeimininkės Hsc70 šaperonu. Tiek šis, tiek LTag LXCXE motyvas (sąveika su šeimininko ląstelių Rb baltymais; An et al., 2012) yra aptinkamas net skorpionuose rastų PyV LTag sekose (QTH80103.1, QTH80097.1), o AagraPyV numanomo LTag baltymo sekose HPDKGG motyvas yra pakitęs į HPDKNI seką, o LXCXE motyvas į IYCDE seką. Tai galėtų papildyti ankstesnių tyrimų metu iškeltą hipotezę, kad AagraPyV sekos gali būti kilusios iš *A. agrarius* parazitų, nes pakitę konservatyvūs motyvai gali būti prisitaikymo prie jų ląstelinės aplinkos požymis. Kiek tai tikėtina įvertinti sudėtinga, kadangi šiuo metu konservatyvių motyvų žinios daugiausia remiasi žinduolių ir paukščių PyV sekomis (An et al., 2012), o skorpionų, kol kas vienintelių nariuotakojų, kuriuose aptiktos pilnos PyV genomo sekos, PyV LTag baltymų minėtų motyvų sekos išlieka konservatyvios (Schmidlin et al., 2021).

PyV VP1 baltymų ilgis įprastai siekia 360–380 ar., o MCPyV VP1 baltymai yra šiek tiek ilgesni (423 ar.) dėl papildomų ar. C-gale, kurių funkcija nežinoma (Bayer et al., 2020). Vis dėlto nustatytose AagraPyV sekose numanomi VP1 ORF (VP1-Pilnas1 ir VP1-Pilnas2) koduoja gerokai ilgesnius baltymus – 511 ar. (VP1-Pilnas2) ir 512 ar. (VP1-Pilnas1), turinčius dar ilgesnę C-galo sritį, kurioje prognozuojami α -spiralių segmentai. Šiems baltymams artimiausios tokio tipo VP1

sekos (VP1-Cah), kurių C-gale taip pat prognozuojami α -spiralių segmentai, yra nustatytos ir kitose PyV sekose, aptiktose įvairių organizmų metagenominių sekoskaitos duomenyse (Buck et al., 2024). Pastarajame Buck et al., (2024) tyrime keliama hipotezė apie šiuos VP1-Cah tipo baltymą koduojančius PyV, kad jie galėjo kilti iš meldvirusų (vidutinio dydžio eukariotinių linijinės dvigrandės DNR virusų) protėvių per kelis genų praradimo įvykius. Iki šiol VP1-Cah tipo VP1 baltymų C-gale prognozuojamų α -spiralių segmentų egzistavimas nėra eksperimentiškai patvirtintas.

Nepaisant to, kad PyV VP1 genams įprastai nėra būdingi intronai (Barrett et al., 1991), vis dėlto skorpionų transkriptomikos duomenyse neseniai buvo nustatyti splaisuoti transkriptai, kuriuose pašalintas numanomo VP1 intronas (Schmidlin et al., 2021). Tokie transkriptai galimai koduoja ~440 ar. VP1 baltymus (QWB13314.1, QWB13302.1), turinčius ilgesnę C-galo sritį, tačiau ši ilgesnė C-galo sritis transkriptuose atsiranda tik po splaisingo, bet nėra koduojama numanomo VP1 ORF, kaip VP1-Cah atveju. Remiantis AagraPyV numanomų VP1 ORF koduojamų baltymų neįprastai pailgėjusia C-galo sritimi, šiame darbe buvo iškelta hipotezė, kad ši sritis gali būti pašalinama po splaisingo. Po VP1-Pilnas1 splaisingo vietų prognozavimo atrinkus potencialius jo splaisingo variantus – VP1-930 (323 ar.) ir VP1-1168 (470 ar.), *S. cerevisiae* mielėse buvo tiriama šių trijų VP1 variantų baltymų raiška bei jų potencialus susirinkimas į VPD. Iki šiol daugumos mielių raiškos sistemoje tirtų PyV atveju vien VP1 baltymo raiškos pakanka, kad jis savaime susirinktų į VPD (Zielonka et al., 2006; Norkienė et al., 2015). NDS-PAGE tiriant lizato ir tirpios frakcijos mėginius, nė vieno VP1 varianto sintezė nebuvo pakankama, kad būtų aptikta. Toks rezultatas gali būti siejamas su žemu baltymų raiškos lygiu, kurį galėjo lemti mRNR nestabilumas, netinkamas baltymų susilankstymas ir jų degradacija. Vis dėlto tik VP1-930 baltymo mėginio, gauto po baltymų koncentravimo amonio sulfatu ir ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį, NDS-PAGE analizėje buvo aptikta silpna baltymų juosta, atitinkanti jo prognozuojamą baltymo dydį, kas gali būti laikoma galimu susirinkimo į VPD požymiu. Analizuojant šį VP1-930 baltymo mėginį TEM, buvo aptiktas mažas kiekis struktūrų, panašių į PyV formuojamas ~45 nm dydžio VPD (Zielonka et al., 2006; Norkienė et al., 2015). NDS-PAGE analizėje aptikus labai neryškią VP1-930 baltymo juostelę, nebuvo galima tikėtis, kad analizuojant šį mėginį TEM bus aptikta daug VPD. Vis dėlto, toks mažas jų kiekis rodo, kad VP1-930 baltymai arba į VPD susirenka neefektyviai, ir/arba VPD yra nestabilios ir galimai subyra jų koncentravimo metu. Žinoma, nereikėtų atmesti galimybės, kad šios struktūros galėjo atsirasti ir dėl kitų priežasčių. Pavyzdžiui, jos galėjo atsirasti dėl mėginio užteršimo ant žmogaus odos aptinkamais PyV (Schowalter et al., 2010) arba tai galėtų būti mielių virusai, pavyzdžiui totivirusai, formuojantys į

PyV panašaus dydžio ir struktūros (~40 nm) kapsides (Grybchuk et al., 2022). Kitas argumentas, kad TEM aptiktos struktūros buvo VPD, į kurias susirinko VP1-930 baltymas, galėtų būti: po gryninimo jodkiksanolio tankio gradientu gautų frakcijų mėginių NDS-PAGE analizėje aptikta baltymų juosta, atitinkanti VP1-930 baltymo prognozuojamą molekulinę masę (~37,5 kDa). Šios juostos minimalus praturtinimas 3-4 frakcijų mėginiuose galėtų atspindėti to nedidelio VP1-930 baltymo kiekio, aptikto po ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį, susikoncentravimą būtent tose frakcijose, kuriose susikoncentravo ir CglPyV VP1 baltymo VPD. Juo labiau, kad analogiškuose CglPyV VP1 baltymo, susirenkančio į VPD, frakcijų mėginiuose irgi aptinkamos ~37,5 kDa baltymų juostos praturtinimas buvo mažesnis. Atsižvelgiant į visus išdėstytus argumentus labai tikėtina, kad VP1-930 baltymai galėjo susirinkti į VPD, bet prastu efektyvumu ir/arba VPD galėjo būti nestabilios ir subirti koncentravimo/gryninimo metu.

Tolimesniuose tyrimuose buvo atlikta VP1-930 varianto ko-raiška su kitais poliomos virusų baltymais, tikintis, kad kuris nors iš jų prisidės prie VPD formavimo. Tuo tikslu pirmiausia buvo atlikta ko-raiška su AagraPyV numanomo VP1 ORF pilno ilgio variantais – VP1-Pilnas1 ir VP1-Pilnas2. Tai buvo atlikta remiantis hipoteze, kad efektyviam AagraPyV baltymų susirinkimui į VPD yra reikalinga pilno ilgio VP1 izoforma (VP1-Pilnas1/Pilnas2) ir trumpesnė VP1-930 izoforma, analogiškai kaip formuojamos parvovirusų kapsidės: iš dviejų to paties baltymo izoformų – trumpesnės VP2 izoformos, kuri sudaro didžiąją dalį (95 %) kapsidės ir pilno ilgio VP1 izoformos (Ozawa ir Young, 1987). Be to, reikėtų pabrėžti, kad VP1-Pilnas2 ORF splaisingo vietų prognozė neidentifikavo VP1-Pilnas1 ORF analogiško VP1-930 splaisingo varianto. VP1-Pilnas2 ORF sekoje prognozuota VP1-Pilnas1 sekai analogiška donorinė vieta ties 930 bp, tačiau vienintelė 1295 bp pozicijai artima akceptorinė vieta buvo prognozuota ties 1271 bp, bet jos patikimumo įvertis (3,4) buvo mažesnis nei tyrime taikytas patikimumo įvertis (įvertis > 6). NDS-PAGE analizuojant po ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį gautus ko-raiškos mėginius, susirinkimo į VPD požymių nenustatyta, kas leidžia manyti, kad VP1-Pilnas1 ir VP1-Pilnas2 variantų ko-raiška nepagerino VP1-930 varianto potencialaus susirinkimo į VPD.

VP1-930 varianto ko-raiška taip pat buvo atlikta su kiekvienu iš šių poliomos virusų baltymų: AagraPyV numanomu VP2 struktūriniu baltymu, hipotetiniais Dagno-1 ir Dagno-2-1 baltymais bei MarPyV2 sTAg baltymu. VP2 ko-raiškos poveikio VPD formavimuisi pavyzdys literatūroje aprašytas žasų hemoraginio poliomos viruso (GHPV) atveju: atliekant vien VP1 raišką *S. cerevisiae* mielėse susidarydavo tik mažesnės – apie 20 nm dydžio VPD, o papildomai atlikus ir VP2 ko-raišką susiformuodavo normalaus dydžio (~45 nm) VPD (Zielonka et al., 2006). Be to, viename

tyrime buvo parodyta, kad *in vitro* sąlygomis SV40 VP2 gali paskatinti VP1 susirinkimą į VPD (Kawano et al., 2006). Kiek žinoma, literatūroje nėra duomenų, rodančių sTAg baltymų poveikį VP1 baltymų susirinkimui į VPD, o šiame darbe VP1-930 ko-raiška su MarPyV2 sTAg buvo atlikta, remiantis šio baltymo raiškos teigiamu poveikiu *S. cerevisiae* mielių ląstelių augimui (Šedytė, 2025), kas galbūt galėtų netiesiogiai lemti didesnę VP1-930 sintezę. NDS-PAGE tiriant šių minėtų ko-raiškos variantų mėginius, gautus po ultracentrifugavimo per 30 % sacharozę, vėlgi visuose nebuvo aptikta susirinkimo į VPD požymių. Vis dėlto tam tikrų baltymų profilių skirtumų tarp mėginių buvo aptikta. Daugumos ko-raiškos mėginių NDS-PAGE baltymų profiluose buvo aptiktas ~60 kDa baltymų juostos praturtinimas, kuris stebimas ir kitų ko-raiškos mėginių atveju (3.11B Pav.), kai mielių auginimui buvo pradėtas naudoti naujas, bet to paties gamintojo mielių ekstraktas. Mėginiuose, paruoštuose, kai auginimui buvo naudojamas senesnis mielių ekstraktas, šios juostos praturtinimas nebuvo aptinkamas (3.7 Pav. ir 3.11A Pav.). Manoma, kad per ilgesnį laiką senesnio mielių ekstrakto komponentų sudėtis pakito, o naujesnis ekstraktas dėl neaiškių priežasčių daugumos mielių auginimo atvejų galėjo indukuoti stipresnę, tam tikrų mielių baltymų (~60 kDa) raišką. Kitas NDS-PAGE baltymų profilių skirtumas tarp ko-raiškos mėginių buvo ~32 kDa baltymų juostos praturtinimas, nustatytas tik VP2-1 ko-raiškos mėginiuose. Ši baltymų juosta neatitinka VP2-1 prognozuojamos molekulinės masės (~24,5 kDa), tačiau neatmetama galimybė, kad ji galėtų atitikti VP2 baltymą, kurio migracija NDS-PAGE gelyje galėjo būti pakitusi dėl potransliacinių modifikacijų ir/arba netipinių sąveikų su NDS, tačiau taip pat tikėtina, kad tai galėtų būti praturtintas mielių baltymas, kurio kiekis galėjo padidėti dėl VP2 ko-raiškos sąlygų.

Apibendrinant, šiame darbe tirtas AagraPyV yra pirmasis nekanoninės genomo organizacijos PyV, kuris buvo aptiktas konkretaus organizmo audinio mėginyje – *A. agrarius* pelių inkstų mėginyje. Tiriant *A. agrarius* pelių inkstų DNR mėginius buvo nustatyta 11 tarpusavyje besiskiriančių AagraPyV genomo sekų, kurių mažiausias tarpusavio sutapimas siekė 93,1 %, o tai yra mažiau nei įprastai aprašoma tos pačios PyV rūšies variantų atveju. Visų AagraPyV sekų numanomų LTAg baltymų pakitę konservatyvūs motyvai papildė ankstesnių tyrimų metu iškeltą hipotezę, kad AagraPyV sekos gali būti kilusios iš skirtingų *A. agrarius* parazitų rūšių. *S. cerevisiae* mielėse atlikus AagraPyV numanomo VP1, jo prognozuotų splasingo variantų (VP1-930 ir VP1-1168) raišką bei VP1-930 varianto ko-raišką su kitais PyV baltymais, nė vienu atveju nebuvo aptikta aiškių AagraPyV baltymų sintezės ir susirinkimo į VPD požymių. Vis dėlto VP1-930 varianto raiškos atveju buvo aptikta tik galimų VPD susiformavimo požymių, leidžiančių manyti, kad šio baltymo susirinkimas į VPD galėjo vykti labai neefektyviai ir/arba susidariusios dalelės galėjo būti nestabilios taikytomis VPD koncentravimo ir gryninimo sąlygomis.

Tolimesniuose tyrimuose, siekiant įvertinti šio neįprasto PyV numanomų VP1 variantų susirinkimą į VPD, būtų vertinga jautresniais metodais ištirti ar *S. cerevisiae* mielėse bent žemu lygiu vyksta VP1 variantų sintezė (pvz., sukonstruojant His inkarą turinčius VP1 variantus ir juos bandyti aptikti imunoblotingu, naudojant anti-His antikūnus). Toliau būtų galima sukonstruoti VP1 ORF variantą, kurio koduojamam baltymui pašalinta visa pailgėjusi C-galo sritis, ir įvertinti jo gebėjimą susirinkti į VPD. Ypač kuomet literatūroje buvo parodyta, kad žiurkėno PyV VP1 gebėjimas susirinkti į VPD *S. cerevisiae* mielėse priklausė nuo C-galo sutrumpinimo ilgio ir vietos, o pašalinus net visą C-galo sritį šis baltymas vis tiek galėjo susirinkti į normalaus dydžio VPD (Gedvilaitė et al., 2006). Neatmestina galimybė ir tai, kad AagraPyV VPD formavimui gali būti reikalingi ir kiti vėlyvajame regione koduojami baltymai, todėl tolimesniuose tyrimuose būtų galima atlikti hipotetinių Dagno baltymų ko-raišką kartu su numanomais VP1 ir VP2 baltymais. Be to, tolimesniuose eksperimentuose būtų galima išbandyti AagraPyV VP1 variantų raišką vabzdžių ląstelių sistemoje, kurios ląstelinė aplinka ir veiksniai galėtų būti artimesni AagraPyV ląstelės šeimininkės aplinkai, o tai galbūt pagerintų VP1 baltymų susirinkimą į VPD.

Išvados

1. Diagnostine PGR tiriant devyniolikoje Lietuvos vietovių sugautų *A. agrarius* pelių inkstų DNR mėginius, AagraPyV DNR sekos buvo aptiktos tik Rusnės vietovėje sugautų pelių mėginiuose. AagraPyV DNR sekų aptikimui buvo reikalingas mėginių žiedinių DNR molekulių praturtinimas prieš diagnostinę PGR.
2. AagraPyV genomo sekos pasižymėjo mažesniu tarpusavio sutapimu (93,1 %) nei įprastai aprašoma tos pačios PyV rūšies variantų atveju. AagraPyV sekų numanomų LTag baltymų pakitę konservatyvūs motyvai papildė hipotezę, kad AagraPyV sekos gali būti kilusios iš *A. agrarius* pelių parazitų.
3. *In silico* prognozuoti pilno ilgio VP1 baltymų (VP1-Pilnas1 ir VP1-Pilnas2) struktūriniai modeliai atitiko pentamerinę organizaciją, tačiau C-gale pasižymėjo papildomais α -spiralių segmentais, o prognozuotų splaisingo variantų (VP1-930 ir VP1-1168) baltymų modeliai dėl trumpesnės C-galo srities buvo struktūriškai artimesni kanoninei VP1 pentamerinei struktūrai.
4. *S. cerevisiae* mielėse nebuvo nustatyta aiškių AagraPyV VP1-Pilnas1 ir jo prognozuotų splaisingo variantų (VP1-930 ir VP1-1168) baltymų raiškos bei susirinkimo į VPD požymių.
5. VP1-930 varianto ko-raiška su vienu iš AagraPyV baltymų (VP1-Pilnas1, VP1-Pilnas2, VP2-1, Dagno-1, Dagno-2-1) arba MarPyV2 sTag nepagerino VP1-930 baltymo susirinkimo į VPD *S. cerevisiae* mielėse.

Vilius Tarutis

Magistro baigiamasis darbas

Naujo poliomos viruso, pasižyminčio nekanonine organizacija, įvairovės ir struktūrinių baltymų gebėjimo susirinkti į virusus panašias daleles tyrimas

SANTRAUKA

Ankstesniuose mūsų laboratorijos tyrimuose, naujos kartos sekoskaitos metodais tiriant dirvinių pelių (*Apodemus agrarius*) inkstų DNR mėginius, buvo identifikuota nekanoninės genomo organizacijos (NGO) poliomos viruso (PyV) seka, pavadinta AagraPyV. Ši seka pasižymi ankstyvųjų bei vėlyvųjų genų homologų kodavimu ta pačia kryptimi, nors įprastai PyV genomuose jie koduojami priešingomis. Mūsų žiniomis, tai pirmoji ir kol kas vienintelė NGO PyV seka, nustatyta konkretaus organizmo audinio mėginyje. AagraPyV seka yra labai filogenetiškai nutolusi nuo žinduolių PyV, todėl neaišku ar AagraPyV natūralus šeimininkas yra *A. agrarius* pelės. Siekiant ateityje tai įvertinti, šiame darbe buvo tiriamas AagraPyV struktūrinių baltymų gebėjimas susirinkti į virusus panašias daleles (VPD) *S. cerevisiae* mielėse, kad VPD susiformavimo atveju jos vėliau galėtų būti panaudotos kaip antigenai serologiniuose tyrimuose.

Atsižvelgiant į AagraPyV numanomo VP1 baltymo (VP1-Pilnas1) neįprastai pailgėjusią C-galo sritį, susirinkimas į VPD buvo tiriamas, tiek atliekant VP1-Pilnas1 raišką, tiek jo prognozuotų splaisingo variantų (VP1-930 ir VP1-1168) raišką. Nė vienu atveju nebuvo nustatyta aiškių VP1 baltymų raiškos ir susirinkimo į VPD požymių. Vis dėlto VP1-930 varianto mėginio natrio dodecil sulfato-poliakrilamido gelio elektroforezės (NDS-PAGE) ir transmisinės elektroninės mikroskopijos (TEM) analizės rezultatai parodė galimus VPD susiformavimo požymius. Atlikus VP1-930 varianto ko-raišką su atskirais AagraPyV baltymais arba MarPyV2 sTAg, VP1-930 baltymo susirinkimas į VPD nepagerėjo.

Be to, šiame tyrime *A. agrarius* inkstų DNR mėginiuose buvo nustatyta vienuolika tarpusavyje besiskiriančių AagraPyV genomo sekų. Jos pasižymėjo mažesniu tarpusavio sutapimu (93,1 %) nei įprastai aprašoma tos pačios PyV rūšies variantų atveju. Visų AagraPyV sekų numanomi LTA g baltymai turėjo pakitusius konservatyvius motyvus, o tai papildė ankstesnių tyrimų metu iškeltą hipotezę, kad AagraPyV sekos gali būti kilusios ne iš *A. agrarius* pelių, o iš jų parazitų.

Vilius Tarutis

Master's thesis

A novel polyomavirus with non-canonical genome organization: analysis of its diversity and the capacity of its structural proteins to assemble into virus-like particles

ABSTRACT

In our laboratory's previous studies, using next-generation sequencing methods to examine kidney DNA samples from the striped field mice (*Apodemus agrarius*), a non-canonical genome organization (NGO) polyomavirus (PyV) sequence was identified and named AagraPyV. This sequence is characterized by early and late gene homologues encoded in the same direction, whereas in PyV genomes they are usually encoded in the opposite directions. To our knowledge, this is the first and so far the only NGO PyV sequence identified in a tissue sample from a specific organism. The AagraPyV sequence is phylogenetically very distant from mammalian PyVs, so it is unclear whether the natural host of AagraPyV is *A. agrarius* mice. In order to investigate this in the future, this work examined the ability of AagraPyV structural proteins to assemble into virus-like particles (VLPs) in *S. cerevisiae* yeast, so that in case of VLP formation, they could later be used as antigens in serological experiments.

Considering the unusually elongated C-terminal region of the putative VP1 protein (VP1-Pilnas1), assembly into VLPs was investigated either by expressing VP1-Pilnas1 or its predicted splicing variants (VP1-930 and VP1-1168). In none of these cases was there any clear signs of VP1 protein expression and assembly into VLPs. However, the results of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transmission electron microscopy (TEM) analysis of the VP1-930 variant sample showed possible signs of VLPs formation. Co-expression of the VP1-930 variant with individual AagraPyV proteins or MarPyV2 sTAg did not improve VP1-930 protein assembly into VLPs.

In addition, a total of eleven distinct AagraPyV genome sequences were identified from *A. agrarius* kidney DNA samples in this study. They differed from each other by 93,1 %, which is less than is usually described for variants of the same PyV species. The putative LTA_g proteins of all AagraPyV sequences contained altered conserved motifs, which supports the hypothesis raised in the previous studies that AagraPyV sequences may have originated not from *A. agrarius* mice, but from their parasites.

Padėka

Dėkoju J. m. d. Emiljai Vasiliūnaitei už suteiktą galimybę magistro studijų metu atlikti praktiką ir dirbti su įdomia darbo tema, dėkoju už naudingus patarimus rašant darbą ir atliekant laboratoriniais metodus bei už apmokymą dirbti naujais metodais. Taip pat dėkoju Habil. Dr. Almai Gedvilaitei už skirtą laiką ir konsultacijas, nuoširdžią pagalbą tinkamai ir moksliškai aprašant literatūrą, rengiant iliustracijas ir interpretuojant gautus rezultatus. Noriu padėkoti Dr. Mildai Norkienei už naudingus patarimus ir įžvalgas sprendžiant problemas bei už pagalbą rengiant magistro darbą. Be to, norėčiau skirti nemažą ačiū ir dokt. Monikai Rupytei už pagalbą ir patarimus laboratorijoje, ištrauktus mėgintuvėlius ir lėkšteles. Šią mėgintuvėlių ir lėkštelių padėką būtinai skiriu ir mūsų laboratorijoje praktiką atlikusiai bakalauro studijų absolventei Lolitai Šedytei.

Literatūros sąrašas

- Abrantes, J., Varsani, A., Pereira, P., Maia, C., Farias, I., Veríssimo, A., & Neves, F. (2023). Identification and characterization of a polyomavirus in the thornback skate (*Raja clavata*). *Virology Journal*, 20(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02149-1>
- Aghebatrafat, A.-A., Lauber, C., Merkel, K., Fruth, B., Langergraber, K., Robbins, M. M., Wittig, R. M., Leendertz, F. H., & Calvignac-Spencer, S. (2023). Evolutionary Insight into the Association between New Jersey Polyomavirus and Humans. *Viruses*, 15(11), 2248. <https://doi.org/10.3390/v15112248>
- Agostini, H. T., Ryschkewitsch, C. F., Brubaker, G. R., Shao, J., & Stoner, G. L. (1997). Five complete genomes of JC virus Type 3 from Africans and African Americans. *Archives of Virology*, 142(4), 637–655. <https://doi.org/10.1007/s007050050108>
- Ahuja, D., Sáenz-Robles, M. T., & Pipas, J. M. (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*, 24(52), 7729–7745. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209046>
- Akan, I., Sariyer, I. K., Biffi, R., Palermo, V., Woolridge, S., White, M. K., Amini, S., Khalili, K., & Safak, M. (2006). Human polyomavirus JCV late leader peptide region contains important regulatory elements. *Virology*, 349(1), 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.025>
- Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M. A. A., Dalianis, T., Ramqvist, T., & Andersson, B. (2007). Identification of a Third Human Polyomavirus. *Journal of Virology*, 81(8), 4130–4136. <https://doi.org/10.1128/JVI.00028-07>
- An, K., Smiley, S. A., Gillock, E. T., Reeves, W. M., & Consigli, R. A. (1999). Avian polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the minor capsid proteins and is transported into the cell nucleus but does not assemble into capsid-like particles when expressed in the baculovirus system. *Virus Research*, 64(2), 173–185. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00093-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00093-3)
- An, P., Sáenz Robles, M. T., & Pipas, J. M. (2012). Large T Antigens of Polyomaviruses: Amazing Molecular Machines. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 213–236. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150154>
- An, P., Sáenz Robles, M. T., Duray, A. M., Cantalupo, P. G., & Pipas, J. M. (2019). Human polyomavirus BKV infection of endothelial cells results in interferon pathway induction and persistence. *PLOS Pathogens*, 15(1), e1007505. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007505>
- Ashok, A., & Atwood, W. J. (2003). Contrasting Roles of Endosomal pH and the Cytoskeleton in Infection of Human Glial Cells by JC Virus and Simian Virus 40. *Journal of Virology*, 77(2), 1347–1356. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.2.1347-1356.2003>
- Bayer, N. J., Januliene, D., Zocher, G., Stehle, T., Moeller, A., & Blaum, B. S. (2020). Structure of Merkel Cell Polyomavirus Capsid and Interaction with Its Glycosaminoglycan Attachment Receptor. *Journal of Virology*, 94(20), e01664-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01664-19>
- Baker, T. S., Drak, J., & Bina, M. (1988). Reconstruction of the three-dimensional structure of simian virus 40 and visualization of the chromatin core. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(2), 422–426. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.2.422>
- Barrett, N. L., Carmichael, G. G., & Luo, Y. (1991). Splice site requirement for the efficient accumulation of polyoma virus late mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 19(11), 3011–3017. <https://doi.org/10.1093/nar/19.11.3011>

- Becker, M., Dominguez, M., Greune, L., Soria-Martinez, L., Pfleiderer, M. M., Schowalter, R., Buck, C. B., Blaum, B. S., Schmidt, M. A., & Schelhaas, M. (2019). Infectious Entry of Merkel Cell Polyomavirus. *Journal of Virology*, 93(6), e02004-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.02004-18>
- Benchling. Biology Software. (2024). <https://benchling.com/>
- Bennett, S. M., Zhao, L., Bosard, C., & Imperiale, M. J. (2015). Role of a nuclear localization signal on the minor capsid Proteins VP2 and VP3 in BKPyV nuclear entry. *Virology*, 474, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.10.013>
- Biffi, R., Benoit, S. W., Sariyer, I. K., & Safak, M. (2024). JC virus small tumor antigen promotes S phase entry and cell cycle progression. *Tumour Virus Research*, 18, 200298. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2024.200298>
- Blum, M., Andreeva, A., Florentino, L. C., Chuguransky, S. R., Grego, T., Hobbs, E., Pinto, B. L., Orr, A., Paysan-Lafosse, T., Ponamareva, I., Salazar, G. A., Bordin, N., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Llinares-López, F., ... Bateman, A. (2025). InterPro: The protein sequence classification resource in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D444–D456. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1082>
- Bochkareva, E., Martynowski, D., Seitova, A., & Bochkarev, A. (2006). Structure of the origin-binding domain of simian virus 40 large T antigen bound to DNA. *The EMBO Journal*, 25(24), 5961–5969. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601452>
- Bodaghi, S., Comoli, P., Bösch, R., Azzi, A., Gosert, R., Leuenberger, D., Ginevri, F., & Hirsch, H. H. (2009). Antibody Responses to Recombinant Polyomavirus BK Large T and VP1 Proteins in Young Kidney Transplant Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(8), 2577–2585. <https://doi.org/10.1128/JCM.00030-09>
- Bollag, B., Hofstetter, C. A., Reviriego-Mendoza, M. M., & Frisque, R. J. (2010). JC Virus Small t Antigen Binds Phosphatase PP2A and Rb Family Proteins and Is Required for Efficient Viral DNA Replication Activity. *PLoS ONE*, 5(5), e10606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010606>
- Bologna, G., Yvon, C., Duvaud, S., & Veuthey, A. (2004). N -Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *PROTEOMICS*, 4(6), 1626–1632. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300783>
- Bouvard, V., Baan, R. A., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., & Straif, K. (2012). Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *The Lancet Oncology*, 13(4), 339–340. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70125-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70125-0)
- Broekema, N. M., & Imperiale, M. J. (2013). miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(20), 8200–8205. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301907110>
- Buck, C. B., Van Doorslaer, K., Peretti, A., Geoghegan, E. M., Tisza, M. J., An, P., Katz, J. P., Pipas, J. M., McBride, A. A., Camus, A. C., McDermott, A. J., Dill, J. A., Delwart, E., Ng, T. F. F., Farkas, K., Austin, C., Kraberger, S., Davison, W., Pastrana, D. V., & Varsani, A. (2016). The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLOS Pathogens*, 12(4), e1005574. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005574>
- Buck, C. B., Welch, N., Belford, A. K., Varsani, A., Pastrana, D. V., Tisza, M. J., & Starrett, G. J. (2024). *Widespread Horizontal Gene Transfer Among Animal Viruses*. <https://doi.org/10.1101/2024.03.25.586562>

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Campbell, K. S., Mullane, K. P., Aksoy, I. A., Stubbald, H., Zalvide, J., Pipas, J. M., Silver, P. A., Roberts, T. M., Schaffhausen, B. S., & DeCaprio, J. A. (1997). DnaJ/hsp40 chaperone domain of SV40 large T antigen promotes efficient viral DNA replication. *Genes & Development*, 11(9), 1098–1110. <https://doi.org/10.1101/gad.11.9.1098>
- Carmichael, G. G., Schaffhausen, B. S., Dorsky, D. I., Oliver, D. B., & Benjamin, T. L. (1982). Carboxy terminus of polyoma middle-sized tumor antigen is required for attachment to membranes, associated protein kinase activities, and cell transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(11), 3579–3583. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.11.3579>
- Carr, M., Gonzalez, G., Sasaki, M., Dool, S. E., Ito, K., Ishii, A., Hang'ombe, B. M., Mweene, A. S., Teeling, E. C., Hall, W. W., Orba, Y., & Sawa, H. (2017). Identification of the same polyomavirus species in different African horseshoe bat species is indicative of short-range host-switching events. *Journal of General Virology*, 98(11), 2771–2785. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000935>
- Carter, J. J., Daugherty, M. D., Qi, X., Bheda-Malge, A., Wipf, G. C., Robinson, K., Roman, A., Malik, H. S., & Galloway, D. A. (2013). Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(31), 12744–12749. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303526110>
- Chang, D., Cai, X., & Consigli, R. A. (1993). Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *Journal of Virology*, 67(10), 6327–6331. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.10.6327-6331.1993>
- Chen, Y., Xu, Y., Bao, Q., Xing, Y., Li, Z., Lin, Z., Stock, J. B., Jeffrey, P. D., & Shi, Y. (2007). Structural and biochemical insights into the regulation of protein phosphatase 2A by small t antigen of SV40. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(6), 527–534. <https://doi.org/10.1038/nsmb1254>
- Chen, X. S. (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *The EMBO Journal*, 17(12), 3233–3240. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3233>
- Cheng, J., DeCaprio, J. A., Fluck, M. M., & Schaffhausen, B. S. (2009). Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Seminars in Cancer Biology*, 19(4), 218–228. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.03.002>
- Cheng, S., & Brooks, C. L. (2013). Viral Capsid Proteins Are Segregated in Structural Fold Space. *PLoS Computational Biology*, 9(2), e1002905. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002905>
- Choi, Y., Lee, I., & Ross, S. R. (1988). Requirement for the Simian Virus 40 Small Tumor Antigen in Tumorigenesis in Transgenic Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 8(8), 3382–3390. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.8.3382-3390.1988>
- Chromy, L. R., Oltman, A., Estes, P. A., & Garcea, R. L. (2006). Chaperone-Mediated In Vitro Disassembly of Polyoma- and Papillomaviruses. *Journal of Virology*, 80(10), 5086–5091. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.5086-5091.2006>
- Clever, J., Dean, D. A., & Kasamatsu, H. (1993). Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(28), 20877–20883.
- Dalianis, T., & Hirsch, H. H. (2013). Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology*, 437(2), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.12.015>

- Damm, E.-M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., & Helenius, A. (2005). Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 168(3), 477–488. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407113>
- DeCaprio, J. A., & Garcea, R. L. (2013). A cornucopia of human polyomaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 264–276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2992>
- Dilworth, S. M. (1990). Cell alterations induced by the large T-antigens of SV40 and polyoma virus. *Seminars in Cancer Biology*, 1(6), 407–414.
- Diotti, R. A., Nakanishi, A., Clementi, N., Mancini, N., Criscuolo, E., Solforosi, L., & Clementi, M. (2013). JC Polyomavirus (JCV) and Monoclonal Antibodies: Friends or Potential Foes? *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/967581>
- Dolz, G., Sheleby-Elías, J., Romero-Zuñiga, J. J., Vargas-Leitón, B., Gutiérrez-Espeleta, G., & Madriz-Ordeñana, K. (2013). Prevalence of Psittacine Beak and Feather Disease Virus and Avian Polyomavirus in Captivity Psittacines from Costa Rica. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 03(04), 240–245. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2013.34038>
- Doorslaer, K., Kraberger, S., Austin, C., Farkas, K., Bergeman, M., Paunil, E., Davison, W., & Varsani, A. (2018). Fish polyomaviruses belong to two distinct evolutionary lineages. *Journal of General Virology*, 99(4), 567–573. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001041>
- Durairaj, J., Follonier, O. M., Leuzinger, K., Alexander, L. T., Wilhelm, M., Pereira, J., Hillenbrand, C. A., Weissbach, F. H., Schwede, T., & Hirsch, H. H. (2024). Structural implications of BK polyomavirus sequence variations in the major viral capsid protein Vp1 and large T-antigen: A computational study. *mSphere*, 9(4), e00799-23. <https://doi.org/10.1128/msphere.00799-23>
- Eash, S., Querbes, W., & Atwood, W. J. (2004). Infection of Vero Cells by BK Virus Is Dependent on Caveolae. *Journal of Virology*, 78(21), 11583–11590. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11583-11590.2004>
- Ehlers, B., Richter, D., Matuschka, F.-R., & Ulrich, R. G. (2015). Genome Sequences of a Rat Polyomavirus Related to Murine Polyomavirus, *Rattus norvegicus* Polyomavirus 1. *Genome Announcements*, 3(5), e00997-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00997-15>
- Ehlers, B., Anoh, A. E., Ben Salem, N., Broll, S., Couacy-Hymann, E., Fischer, D., Gedvilaite, A., Ingenhütt, N., Liebmann, S., Martin, M., Mossoun, A., Mugisha, L., Muyembe-Tamfum, J.-J., Pauly, M., Pérez De Val, B., Preugschas, H., Richter, D., Schubert, G., Szentiks, C. A., ... Calvignac-Spencer, S. (2019). Novel Polyomaviruses in Mammals from Multiple Orders and Reassessment of Polyomavirus Evolution and Taxonomy. *Viruses*, 11(10), 930. <https://doi.org/10.3390/v11100930>
- Erickson, K. D., Garcea, R. L., & Tsai, B. (2009). Ganglioside GT1b Is a Putative Host Cell Receptor for the Merkel Cell Polyomavirus. *Journal of Virology*, 83(19), 10275–10279. <https://doi.org/10.1128/JVI.00949-09>
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., & Moore, P. S. (2008). Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science*, 319(5866), 1096–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1152586>
- Fisher, S. E., Dawe, C. J., Williams, J. E., & Morgan, W. D. (1983). Isozyme phenotypes of polyoma virus tumors in mice. *Cancer Research*, 43(8), 3783–3792.
- Freund, R., Sotnikov, A., Bronson, R. T., & Benjamin, T. L. (1992). Polyoma virus middle T is essential for virus replication and persistence as well as for tumor induction in mice. *Virology*, 191(2), 716–723. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90247-M](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90247-M)

- Fuenmayor, J., Gòdia, F., & Cervera, L. (2017). Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnology*, 39, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.010>
- Gaboriaud, P., Ferté, M., Arnold, F., Leblond, V., Nicol, J., Debare, H., Le Meur, M., Martini, F., Tognon, M., & Touzé, A. (2018). Age-specific seroprevalence of human polyomavirus 12 and Saint Louis and New Jersey polyomaviruses. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1–5. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0026-0>
- Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whiley, D. M., Mackay, I. M., Lambert, S. B., Wu, G., Brennan, D. C., Storch, G. A., Sloots, T. P., & Wang, D. (2007). Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections. *PLoS Pathogens*, 3(5), e64. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030064>
- Gardner, S.D., Field, AnneM., Coleman, DulcieV., & Hulme, B. (1971). NEW HUMAN PAPOVAVIRUS (B.K.) ISOLATED FROM URINE AFTER RENAL TRANSPLANTATION. *The Lancet*, 297(7712), 1253–1257. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91776-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91776-4)
- Gardner, S. D. (1973). Prevalence in England of Antibody to Human Polyomavirus (B.K.). *BMJ*, 1(5845), 77–78. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5845.77>
- Garren, S. B., Kondaveeti, Y., Duff, M. O., & Carmichael, G. G. (2015). Global Analysis of Mouse Polyomavirus Infection Reveals Dynamic Regulation of Viral and Host Gene Expression and Promiscuous Viral RNA Editing. *PLOS Pathogens*, 11(9), e1005166. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005166>
- Gascun, C. F., & Carr, M. J. (2013). Human Polyomavirus Reactivation: Disease Pathogenesis and Treatment Approaches. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 1–27. <https://doi.org/10.1155/2013/373579>
- Gasparovic, M. L., Gee, G. V., & Atwood, W. J. (2006). JC Virus Minor Capsid Proteins Vp2 and Vp3 Are Essential for Virus Propagation. *Journal of Virology*, 80(21), 10858–10861. <https://doi.org/10.1128/JVI.01298-06>
- Ge, H., Noble, J., Colgan, J., & Manley, J. L. (1990). Polyoma virus small tumor antigen pre-mRNA splicing requires cooperation between two 3' splice sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(9), 3338–3342. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.9.3338>
- Gedvilaite, A., Aleksaite, E., Staniulis, J., Ulrich, R., & Sasnauskas, K. (2006). 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. *Archives of Virology*, 151(9), 1811–1825. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0745-8>
- Geiger, R., Andrichske, D., Friebe, S., Herzog, F., Luisoni, S., Heger, T., & Helenius, A. (2011). BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Nature Cell Biology*, 13(11), 1305–1314. <https://doi.org/10.1038/ncb2339>
- Gerits, N., & Moens, U. (2012). Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology*, 432(2), 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.05.024>
- Gerits, N., Johannessen, M., Tümmeler, C., Walquist, M., Kostenko, S., Snapkov, I., Van Loon, B., Ferrari, E., Hübscher, U., & Moens, U. (2015). Agnoprotein of polyomavirus BK interacts with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication. *Virology Journal*, 12(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0220-1>
- Ghosh, P. K., Reddy, V. B., Swinscoe, J., Choudary, P. V., Lebowitz, P., & Weissman, S. M. (1978). The 5'-terminal leader sequence of late 16 S mRNA from cells infected with simian virus 40. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(10), 3643–3647.

- Gilbert, J., & Benjamin, T. (2004). Uptake Pathway of Polyomavirus via Ganglioside GD1a. *Journal of Virology*, 78(22), 12259–12267. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12259-12267.2004>
- Gilbert, J., Dahl, J., Riney, C., You, J., Cui, C., Holmes, R., Lencer, W., & Benjamin, T. (2005). Ganglioside GD1a Restores Infectibility to Mouse Cells Lacking Functional Receptors for Polyomavirus. *Journal of Virology*, 79(1), 615–618. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.615-618.2005>
- Giorda, K. M., Raghava, S., Zhang, M. W., & Hebert, D. N. (2013). The Viroporin Activity of the Minor Structural Proteins VP2 and VP3 Is Required for SV40 Propagation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2510–2520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.428425>
- Good, P. J., Welch, R. C., Barkan, A., Somasekhar, M. B., & Mertz, J. E. (1988). Both VP2 and VP3 are synthesized from each of the alternative spliced late 19S RNA species of simian virus 40. *Journal of Virology*, 62(3), 944–953. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.3.944-953.1988>
- Googins, M. R., An, P., Gauthier, C. H., & Pipas, J. M. (2025). Polyomavirus large T antigens: Unraveling a complex interactome. *Tumour Virus Research*, 19, 200306. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2024.200306>
- Gossai, A., Waterboer, T., Nelson, H. H., Michel, A., Willhauck-Fleckenstein, M., Farzan, S. F., Hoen, A. G., Christensen, B. C., Kelsey, K. T., Marsit, C. J., Pawlita, M., & Karagas, M. R. (2016). Seroepidemiology of Human Polyomaviruses in a US Population. *American Journal of Epidemiology*, 183(1), 61–69. <https://doi.org/10.1093/aje/kwv155>
- Gottlieb, K. A., & Villarreal, L. P. (2001). Natural Biology of Polyomavirus Middle T Antigen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 288–318. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.288-318.2001>
- Grybchuk, D., Procházková, M., Füzik, T., Konovalovas, A., Serva, S., Yurchenko, V., & Plevka, P. (2022). Structures of L-BC virus and its open particle provide insight into Totivirus capsid assembly. *Communications Biology*, 5(1), 847. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03793-z>
- Gross, L. (1953). A Filterable Agent, Recovered from Ak Leukemic Extracts, Causing Salivary Gland Carcinomas in C3H Mice. *Experimental Biology and Medicine*, 83(2), 414–421. <https://doi.org/10.3181/00379727-83-20376>
- Halami, M. Y., Dorrestein, G. M., Couteel, P., Heckel, G., Muller, H., & Johne, R. (2010). Whole-genome characterization of a novel polyomavirus detected in fatally diseased canary birds. *Journal of General Virology*, 91(12), 3016–3022. <https://doi.org/10.1099/vir.0.023549-0>
- Handala, L., Blanchard, E., Raynal, P.-I., Roingeard, P., Morel, V., Descamps, V., Castelain, S., Francois, C., Duverlie, G., Brochot, E., & Helle, F. (2020). BK Polyomavirus Hijacks Extracellular Vesicles for *En Bloc* Transmission. *Journal of Virology*, 94(6), e01834-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01834-19>
- Hein, J., Boichuk, S., Wu, J., Cheng, Y., Freire, R., Jat, P. S., Roberts, T. M., & Gjoerup, O. V. (2009). Simian Virus 40 Large T Antigen Disrupts Genome Integrity and Activates a DNA Damage Response via Bub1 Binding. *Journal of Virology*, 83(1), 117–127. <https://doi.org/10.1128/JVI.01515-08>
- Helle, F., Brochot, E., Handala, L., Martin, E., Castelain, S., Francois, C., & Duverlie, G. (2017). Biology of the BKPyV: An Update. *Viruses*, 9(11), 327. <https://doi.org/10.3390/v9110327>
- Henson, J. W. (1994). Regulation of the glial-specific JC virus early promoter by the transcription factor Sp1. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(2), 1046–1050.

- Hirsch, H. H., Babel, N., Comoli, P., Friman, V., Ginevri, F., Jardine, A., Lautenschlager, I., Legendre, C., Midtvedt, K., Muñoz, P., Randhawa, P., Rinaldo, C. H., & Wieszek, A. (2014). European perspective on human polyomavirus infection, replication and disease in solid organ transplantation. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 74–88. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12538>
- Horníková, L., Žíla, V., Španielová, H., & Forstová, J. (2015). Mouse Polyomavirus: Propagation, Purification, Quantification, and Storage. *Current Protocols in Microbiology*, 38(1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc14f01s38>
- Horníková, L., Brušítková, K., & Forstová, J. (2020). Microtubules in Polyomavirus Infection. *Viruses*, 12(1), 121. <https://doi.org/10.3390/v12010121>
- Hortala, H., Vilchez-Pinto, G., Diaz-Perales, A., Garrido-Arandia, M., & Tome-Amat, J. (2024). Virus-like Particles as Vaccines for Allergen-Specific Therapy: An Overview of Current Developments. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 7429. <https://doi.org/10.3390/ijms25137429>
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server), W585–W587. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm259>
- Houben, R., Celikdemir, B., Kervarrec, T., & Schrama, D. (2023). Merkel Cell Polyomavirus: Infection, Genome, Transcripts and Its Role in Development of Merkel Cell Carcinoma. *Cancers*, 15(2), 444. <https://doi.org/10.3390/cancers15020444>
- Huang, Y. (2009). RNA processing in the polyoma virus life cycle. *Frontiers in Bioscience*, 14(1), 4968. <https://doi.org/10.2741/3581>
- Huérffano, S., Ryabchenko, B., Španielová, H., & Forstová, J. (2017). Hydrophobic domains of mouse polyomavirus minor capsid proteins promote membrane association and virus exit from the ER. *The FEBS Journal*, 284(6), 883–902. <https://doi.org/10.1111/febs.14033>
- Hurdiss, D. L., Morgan, E. L., Thompson, R. F., Prescott, E. L., Panou, M. M., Macdonald, A., & Ranson, N. A. (2016). New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure*, 24(4), 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.02.008>
- Hurdiss, D. L., Frank, M., Snowden, J. S., Macdonald, A., & Ranson, N. A. (2018). The Structure of an Infectious Human Polyomavirus and Its Interactions with Cellular Receptors. *Structure*, 26(6), 839–847.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.03.019>
- Imperiale, M. J. (2014). Polyomavirus miRNAs: The beginning. *Current Opinion in Virology*, 7, 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.012>
- Imperiale, M. J., & Jiang, M. (2016). Polyomavirus Persistence. *Annual Review of Virology*, 3(1), 517–532. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042226>
- Ishizu, K.-I., Watanabe, H., Han, S.-I., Kanesashi, S.-N., Hoque, M., Yajima, H., Kataoka, K., & Handa, H. (2001). Roles of Disulfide Linkage and Calcium Ion-Mediated Interactions in Assembly and Disassembly of Virus-Like Particles Composed of Simian Virus 40 VP1 Capsid Protein. *Journal of Virology*, 75(1), 61–72. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.1.61-72.2001>
- Yuan, H., Veldman, T., Rundell, K., & Schlegel, R. (2002). Simian Virus 40 Small Tumor Antigen Activates AKT and Telomerase and Induces Anchorage-Independent Growth of Human Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 76(21), 10685–10691. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.21.10685-10691.2002>

- Jiang, M., Abend, J. R., Tsai, B., & Imperiale, M. J. (2009). Early Events during BK Virus Entry and Disassembly. *Journal of Virology*, 83(3), 1350–1358. <https://doi.org/10.1128/JVI.02169-08>
- Johannessen, M., Myhre, M. R., Dragset, M., Tümmler, C., & Moens, U. (2008). Phosphorylation of human polyomavirus BK agnoprotein at Ser-11 is mediated by PKC and has an important regulative function. *Virology*, 379(1), 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.007>
- Johne, R., Jungmann, A., & Müller, H. (2000). Agnoprotein 1a and agnoprotein 1b of avian polyomavirus are apoptotic inducers. *Microbiology*, 81(5), 1183–1190. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-5-1183>
- Johne, R., & Müller, H. (2001). Avian polyomavirus agnoprotein 1a is incorporated into the virus particle as a fourth structural protein, VP4. *Journal of General Virology*, 82(4), 909–918. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-4-909>
- Johne, R., & Müller, H. (2004). Nuclear Localization of Avian Polyomavirus Structural Protein VP1 Is a Prerequisite for the Formation of Virus-Like Particles. *Journal of Virology*, 78(2), 930–937. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.2.930-937.2004>
- Johne, R., Wittig, W., Fernández-de-Luco, D., Höfle, U., & Müller, H. (2006). Characterization of Two Novel Polyomaviruses of Birds by Using Multiply Primed Rolling-Circle Amplification of Their Genomes. *Journal of Virology*, 80(7), 3523–3531. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3523-3531.2006>
- Johne, R., & Müller, H. (2007). Polyomaviruses of Birds: Etiologic Agents of Inflammatory Diseases in a Tumor Virus Family. *Journal of Virology*, 81(21), 11554–11559. <https://doi.org/10.1128/JVI.01178-07>
- Johne, R., Paul, G., Enderlein, D., Stahl, T., Grund, C., & Müller, H. (2007). Avian polyomavirus mutants with deletions in the VP4-encoding region show deficiencies in capsid assembly and virus release, and have reduced infectivity in chicken. *Journal of General Virology*, 88(3), 823–830. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82506-0>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kamen, R., Favaloro, J., & Parker, J. (1980). Topography of the three late mRNA's of polyoma virus which encode the virion proteins. *Journal of Virology*, 33(2), 637–651. <https://doi.org/10.1128/jvi.33.2.637-651.1980>
- Kamminga, S., Van Der Meijden, E., Feltkamp, M. C. W., & Zaaijer, H. L. (2018). Seroprevalence of fourteen human polyomaviruses determined in blood donors. *PLOS ONE*, 13(10), e0206273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206273>
- Kamminga, S., Van Der Meijden, E., Pesavento, P., Buck, C. B., & Feltkamp, M. C. W. (2023). Serology Identifies LIPyV as a Feline Rather than a Human Polyomavirus. *Viruses*, 15(7), 1546. <https://doi.org/10.3390/v15071546>
- Kawano, M., Inoue, T., Tsukamoto, H., Takaya, T., Enomoto, T., Takahashi, R., Yokoyama, N., Yamamoto, N., Nakanishi, A., Imai, T., Wada, T., Kataoka, K., & Handa, H. (2006). The VP2/VP3 Minor Capsid Protein of Simian Virus 40 Promotes the in Vitro Assembly of the Major Capsid Protein VP1 into Particles. *Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 10164–10173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511261200>

- Kean, J. M., Rao, S., Wang, M., & Garcea, R. L. (2009). Seroepidemiology of Human Polyomaviruses. *PLoS Pathogens*, 5(3), e1000363. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000363>
- Kim, H. J., & Kim, H.-J. (2017). Yeast as an expression system for producing virus-like particles: What factors do we need to consider? *Letters in Applied Microbiology*, 64(2), 111–123. <https://doi.org/10.1111/lam.12695>
- Kim, S., Kim, S.-J., & Na, K.-J. (2022). Molecular characteristics of Budgerigar fledgling disease polyomavirus detected from parrots in South Korea. *Journal of Veterinary Science*, 23(5), e67. <https://doi.org/10.4142/jvs.22082>
- Koonin, E. V., Dolja, V. V., & Krupovic, M. (2015). Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology*, 479–480, 2–25. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.039>
- Krauzewicz, N., Streuli, C. H., Stuart-Smith, N., Jones, M. D., Wallace, S., & Griffin, B. E. (1990). Myristylated polyomavirus VP2: Role in the life cycle of the virus. *Journal of Virology*, 64(9), 4414–4420. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.9.4414-4420.1990>
- Krumbholz, A., Bininda-Emonds, O. R. P., Wutzler, P., & Zell, R. (2009). Phylogenetics, evolution, and medical importance of polyomaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), 784–799. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.04.008>
- Kwun, H. J., Guastafierro, A., Shuda, M., Meinke, G., Bohm, A., Moore, P. S., & Chang, Y. (2009). The Minimum Replication Origin of Merkel Cell Polyomavirus Has a Unique Large T-Antigen Loading Architecture and Requires Small T-Antigen Expression for Optimal Replication. *Journal of Virology*, 83(23), 12118–12128. <https://doi.org/10.1128/JVI.01336-09>
- Kwun, H. J., Shuda, M., Feng, H., Camacho, C. J., Moore, P. S., & Chang, Y. (2013). Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Controls Viral Replication and Oncoprotein Expression by Targeting the Cellular Ubiquitin Ligase SCFFbw7. *Cell Host & Microbe*, 14(2), 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.06.008>
- Kwun, H. J., Shuda, M., Camacho, C. J., Gamper, A. M., Thant, M., Chang, Y., & Moore, P. S. (2015). Restricted Protein Phosphatase 2A Targeting by Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen. *Journal of Virology*, 89(8), 4191–4200. <https://doi.org/10.1128/JVI.00157-15>
- Laine, H. K., Waterboer, T., Syrjänen, K., Grenman, S., Louvanto, K., & Syrjänen, S. (2023). Seroprevalence of polyomaviruses BK and JC in Finnish women and their spouses followed-up for three years. *Scientific Reports*, 13(1), 879. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27850-7>
- Leendertz, F. H., Scuda, N., Cameron, K. N., Kidega, T., Zuberbühler, K., Leendertz, S. A. J., Couacy-Hymann, E., Boesch, C., Calvignac, S., & Ehlers, B. (2011). African Great Apes Are Naturally Infected with Polyomaviruses Closely Related to Merkel Cell Polyomavirus. *Journal of Virology*, 85(2), 916–924. <https://doi.org/10.1128/JVI.01585-10>
- Lemieux, B., & Bastin, M. (2000). Polyomavirus Large T Antigen Mutants Affected in Viral DNA Replication. *Virology*, 269(2), 370–376. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0231>
- Liddington, R. C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T. L., & Harrison, S. C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature*, 354(6351), 278–284. <https://doi.org/10.1038/354278a0>
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Štokrová, J., & Forstová, J. (2006). Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes, Requires Their Acidic pH for Productive Infection, and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. *Journal of Virology*, 80(9), 4610–4622. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.9.4610-4622.2006>

- Lim, E. S., Reyes, A., Antonio, M., Saha, D., Ikumapayi, U. N., Adeyemi, M., Stine, O. C., Skelton, R., Brennan, D. C., Mkakosya, R. S., Manary, M. J., Gordon, J. I., & Wang, D. (2013). Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology*, 436(2), 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.12.005>
- Liu, Z., & Carmichael, G. G. (1993). Polyoma virus early-late switch: Regulation of late RNA accumulation by DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18), 8494–8498. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8494>
- Loeber, G., Stenger, J. E., Ray, S., Parsons, R. E., Anderson, M. E., & Tegtmeyer, P. (1991). The zinc finger region of simian virus 40 large T antigen is needed for hexamer assembly and origin melting. *Journal of Virology*, 65(6), 3167–3174. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.6.3167-3174.1991>
- Losada, M., Christensen, R. G., McClellan, D. A., Adams, B. J., Viscidi, R. P., Demma, J. C., & Crandall, K. A. (2006). Comparing Phylogenetic Codivergence between Polyomaviruses and Their Hosts. *Journal of Virology*, 80(12), 5663–5669. <https://doi.org/10.1128/JVI.00056-06>
- Love, J., Gee, G. V., O'Hara, B. A., Assetta, B., Atkinson, A. L., Dugan, A. S., Haley, S. A., & Atwood, W. J. (2019). JC Polyomavirus Uses Extracellular Vesicles To Infect Target Cells. *mBio*, 10(2), e00379-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00379-19>
- Luo, Y., Motamedi, N., Magaldi, T. G., Gee, G. V., Atwood, W. J., & DiMaio, D. (2016). Interaction between Simian Virus 40 Major Capsid Protein VP1 and Cell Surface Ganglioside GM1 Triggers Vacuole Formation. *mBio*, 7(2), e00297-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00297-16>
- Ma, J., Wu, R., Tian, Y., Zhang, M., Wang, W., Li, Y., Tian, F., Cheng, Y., Yan, Y., & Sun, J. (2019). Isolation and characterization of an Aves polyomavirus 1 from diseased budgerigars in China. *Veterinary Microbiology*, 237, 108397. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108397>
- Madinda, N. F., Ehlers, B., Wertheim, J. O., Akoua-Koffi, C., Bergl, R. A., Boesch, C., Akonkwa, D. B. M., Eckardt, W., Fruth, B., Gillespie, T. R., Gray, M., Hohmann, G., Karhemere, S., Kujirakwinja, D., Langergraber, K., Muyembe, J.-J., Nishuli, R., Pauly, M., Petrzalkova, K. J., ... Calvignac-Spencer, S. (2016). Assessing Host-Virus Codivergence for Close Relatives of Merkel Cell Polyomavirus Infecting African Great Apes. *Journal of Virology*, 90(19), 8531–8541. <https://doi.org/10.1128/JVI.00247-16>
- Mayberry, C. L., & Maginnis, M. S. (2020). Taking the Scenic Route: Polyomaviruses Utilize Multiple Pathways to Reach the Same Destination. *Viruses*, 12(10), 1168. <https://doi.org/10.3390/v12101168>
- Makvandi, M., Kaydani, G. A., Shahbazian, H., Teimoori, A., Rahim, F., & Aslani, S. (2018). The complete genome sequence BK polyomavirus study in kidney transplanted patients. *Journal of Nephropathology*, 8(2), 15–15. <https://doi.org/10.15171/jnp.2019.15>
- Manzetti, J., Weissbach, F. H., Graf, F. E., Unterstab, G., Wernli, M., Hopfer, H., Drachenberg, C. B., Rinaldo, C. H., & Hirsch, H. H. (2020). BK Polyomavirus Evades Innate Immune Sensing by Disrupting the Mitochondrial Network and Promotes Mitophagy. *iScience*, 23(7), 101257. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101257>
- Meijden, E., Kazem, S., Dargel, C. A., Van Vuren, N., Hensbergen, P. J., & Feltkamp, M. C. W. (2015). Characterization of T Antigens, Including Middle T and Alternative T, Expressed by the Human Polyomavirus Associated with Trichodysplasia Spinulosa. *Journal of Virology*, 89(18), 9427–9439. <https://doi.org/10.1128/JVI.00911-15>
- Meijden, E., & Feltkamp, M. (2018). The Human Polyomavirus Middle and Alternative T-Antigens; Thoughts on Roles and Relevance to Cancer. *Frontiers in Microbiology*, 9, 398. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00398>

- Moens, U., Van Ghelue, M., Song, X., & Ehlers, B. (2013). Serological cross-reactivity between human polyomaviruses. *Reviews in Medical Virology*, 23(4), 250–264. <https://doi.org/10.1002/rmv.1747>
- Moens, U., Krumbholz, A., Ehlers, B., Zell, R., John, R., Calvignac-Spencer, S., & Lauber, C. (2017). Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 18–38. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.011>
- Moens, U., & Macdonald, A. (2019). Effect of the Large and Small T-Antigens of Human Polyomaviruses on Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 3914. <https://doi.org/10.3390/ijms20163914>
- Moens, U., Prezioso, C., & Pietropaolo, V. (2020). Genetic Diversity of the Noncoding Control Region of the Novel Human Polyomaviruses. *Viruses*, 12(12), 1406. <https://doi.org/10.3390/v12121406>
- Moens, U., Prezioso, C., & Pietropaolo, V. (2022). Functional Domains of the Early Proteins and Experimental and Epidemiological Studies Suggest a Role for the Novel Human Polyomaviruses in Cancer. *Frontiers in Microbiology*, 13, 834368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.834368>
- Moore, M. J., & Rampton, R. (2025). Trichodysplasia spinulosa. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574537/>
- Muhire, B. M., Varsani, A., & Martin, D. P. (2014). SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PLoS ONE*, 9(9), e108277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>
- Mukherjee, S., Abd-El-Latif, M., Bronstein, M., Ben-nun-Shaul, O., Kler, S., & Oppenheim, A. (2007). High Cooperativity of the SV40 Major Capsid Protein VP1 in Virus Assembly. *PLoS ONE*, 2(8), e765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000765>
- Murakami, Y., & Hurwitz, J. (1993). Functional interactions between SV40 T antigen and other replication proteins at the replication fork. *Journal of Biological Chemistry*, 268(15), 11008–11017. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)82086-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)82086-5)
- Nakanishi, A., Itoh, N., Li, P. P., Handa, H., Liddington, R. C., & Kasamatsu, H. (2007). Minor Capsid Proteins of Simian Virus 40 Are Dispensable for Nucleocapsid Assembly and Cell Entry but Are Required for Nuclear Entry of the Viral Genome. *Journal of Virology*, 81(8), 3778–3785. <https://doi.org/10.1128/JVI.02664-06>
- Neu, U., Woellner, K., Gauglitz, G., & Stehle, T. (2008). Structural basis of GM1 ganglioside recognition by simian virus 40. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(13), 5219–5224. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710301105>
- Neu, U., Hengel, H., Blaum, B. S., Schowalter, R. M., Macejak, D., Gilbert, M., Wakarchuk, W. W., Imamura, A., Ando, H., Kiso, M., Arnberg, N., Garcea, R. L., Peters, T., Buck, C. B., & Stehle, T. (2012). Structures of Merkel Cell Polyomavirus VP1 Complexes Define a Sialic Acid Binding Site Required for Infection. *PLoS Pathogens*, 8(7), e1002738. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002738>
- Nicol, J. T. J., Robinot, R., Carpentier, A., Carandina, G., Mazzoni, E., Tognon, M., Touzé, A., & Coursaget, P. (2013). Age-Specific Seroprevalences of Merkel Cell Polyomavirus, Human Polyomaviruses 6, 7, and 9, and Trichodysplasia Spinulosa-Associated Polyomavirus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(3), 363–368. <https://doi.org/10.1128/CI.00438-12>
- Nilsson, J., Miyazaki, N., Xing, L., Wu, B., Hammar, L., Li, T. C., Takeda, N., Miyamura, T., & Cheng, R. H. (2005). Structure and Assembly of a T=1 Virus-Like Particle in BK Polyomavirus. *Journal of Virology*, 79(9), 5337–5345. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5337-5345.2005>

- Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z. S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A. J., & Ahmadian, G. (2021). Virus-like particles: Preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7>
- Norkiene, M., Stonyte, J., Ziogiene, D., Mazeike, E., Sasnauskas, K., & Gedvilaite, A. (2015). Production of recombinant VP1-derived virus-like particles from novel human polyomaviruses in yeast. *BMC Biotechnology*, 15(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0187-z>
- Norkienė, M. (2018). Poliomos virusų vp1 baltymų biosintezės ypatybių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse tyrimas bei panaudojimas serologiniams tyrimams. Vilniaus Universitetas.
- Ou, W. C., Wang, M., Fung, C. Y., Tsai, R. T., Chao, P. C., Hseu, T. H., & Chang, D. (1999). 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. *Journal of General Virology*, 80(1), 39–46. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-1-39>
- Ozawa, K., & Young, N. (1987). Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *Journal of Virology*, 61(8), 2627–2630. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.8.2627-2630.1987>
- Padgett, BillieL., Zurhein, GabrieleM., Walker, DuardL., Eckroade, RobertJ., & Dessel, BertH. (1971). CULTIVATION OF PAPOVA-LIKE VIRUS FROM HUMAN BRAIN WITH PROGRESSIVE MULTIFOCAL LEUCOENCEPHALOPATHY. *The Lancet*, 297(7712), 1257–1260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91777-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91777-6)
- Pagano, J. S. (1984). DNA tumor viruses. *Transplantation Proceedings*, 16(2), 419–427.
- Panou, M.-M., Prescott, E., Hurdiss, D., Swinscoe, G., Hollinshead, M., Caller, L., Morgan, E., Carlisle, L., Müller, M., Antoni, M., Kealy, D., Ranson, N., Crump, C., & Macdonald, A. (2018). Agnoprotein Is an Essential Egress Factor during BK Polyomavirus Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 902. <https://doi.org/10.3390/ijms19030902>
- Parajuli, S., Aziz, F., Zhong, W., & Djamali, A. (2024). BK polyomavirus infection: More than 50 years and still a threat to kidney transplant recipients. *Frontiers in Transplantation*, 3, 1309927. <https://doi.org/10.3389/frtra.2024.1309927>
- Park, D. E., Cheng, J., Berrios, C., Montero, J., Cortés-Cros, M., Ferretti, S., Arora, R., Tillgren, M. L., Gokhale, P. C., & DeCaprio, J. A. (2019). Dual inhibition of MDM2 and MDM4 in virus-positive Merkel cell carcinoma enhances the p53 response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(3), 1027–1032. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818798116>
- Pinto, M., & Dobson, S. (2014). BK and JC virus: A review. *Journal of Infection*, 68, S2–S8. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.09.009>
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K. J., & Tsai, B. (2009). A Lipid Receptor Sorts Polyomavirus from the Endolysosome to the Endoplasmic Reticulum to Cause Infection. *PLoS Pathogens*, 5(6), e1000465. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000465>
- Qu, Q., Sawa, H., Suzuki, T., Semba, S., Henmi, C., Okada, Y., Tsuda, M., Tanaka, S., Atwood, W. J., & Nagashima, K. (2004). Nuclear Entry Mechanism of the Human Polyomavirus JC Virus-like Particle. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27735–27742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310827200>
- Querbes, W., O'Hara, B. A., Williams, G., & Atwood, W. J. (2006). Invasion of Host Cells by JC Virus Identifies a Novel Role for Caveolae in Endosomal Sorting of Noncaveolar Ligands. *Journal of Virology*, 80(19), 9402–9413. <https://doi.org/10.1128/JVI.01086-06>

- Rayment, I., Baker, T. S., Caspar, D. L. D., & Murakami, W. T. (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature*, 295(5845), 110–115. <https://doi.org/10.1038/295110a0>
- Ranjan, R., Rani, A., Brennan, D. C., Finn, P. W., & Perkins, D. L. (2017). Complete Genome Sequence of BK Polyomavirus Subtype Ib-1 Detected in a Kidney Transplant Patient with BK Viremia Using Shotgun Sequencing. *Genome Announcements*, 5(6), e01474-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01474-16>
- Ravindran, M. S., Bagchi, P., Inoue, T., & Tsai, B. (2015). A Non-enveloped Virus Hijacks Host Disaggregation Machinery to Translocate across the Endoplasmic Reticulum Membrane. *PLOS Pathogens*, 11(8), e1005086. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005086>
- Ravindran, M. S., Spriggs, C. C., Verhey, K. J., & Tsai, B. (2018). Dynein Engages and Disassembles Cytosol-Localized Simian Virus 40 To Promote Infection. *Journal of Virology*, 92(12), e00353-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00353-18>
- Riley, M. I., Yoo, W., Mda, N. Y., & Folk, W. R. (1997). Tiny T antigen: An autonomous polyomavirus T antigen amino-terminal domain. *Journal of Virology*, 71(8), 6068–6074. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.8.6068-6074.1997>
- Rio, D. C., & Tjian, R. (1983). SV40 T antigen binding site mutations that affect autoregulation. *Cell*, 32(4), 1227–1240. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90305-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90305-7)
- Rockett, R., Barraclough, K. A., Isbel, N. M., Dudley, K. J., Nissen, M. D., Sloots, T. P., & Bialasiewicz, S. (2015). Specific rolling circle amplification of low-copy human polyomaviruses BKV, HPyV6, HPyV7, TSPyV, and STLPyV. *Journal of Virological Methods*, 215–216, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.02.004>
- Rodgers, R. E., Chang, D., Cai, X., & Consigli, R. A. (1994). Purification of recombinant budgerigar fledgling disease virus VP1 capsid protein and its ability for in vitro capsid assembly. *Journal of Virology*, 68(5), 3386–3390. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.5.3386-3390.1994>
- Rozenblatt-Rosen, O., Deo, R. C., Padi, M., Adelman, G., Calderwood, M. A., Rolland, T., Grace, M., Dricot, A., Askenazi, M., Tavares, M., Pevzner, S. J., Abderazzaq, F., Byrdson, D., Carvunis, A.-R., Chen, A. A., Cheng, J., Correll, M., Duarte, M., Fan, C., ... Vidal, M. (2012). Interpreting cancer genomes using systematic host network perturbations by tumour virus proteins. *Nature*, 487(7408), 491–495. <https://doi.org/10.1038/nature11288>
- Safak, M., Sadowska, B., Barrucco, R., & Khalili, K. (2002). Functional Interaction between JC Virus Late Regulatory Agnoprotein and Cellular Y-Box Binding Transcription Factor, YB-1. *Journal of Virology*, 76(8), 3828–3838. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.3828-3838.2002>
- Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson, R., & Benjamin, T. (1993). Defect in Entry and Altered Pathogenicity of a Polyoma Virus Mutant Blocked in VP2 Myristylation. *Virology*, 192(1), 142–153. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1016>
- Salunke, D. M., Caspar, D. L., & Garcea, R. L. (1989). Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophysical Journal*, 56(5), 887–900. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(89\)82735-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82735-3)
- Sander, P., Grünwald, S., Bach, M., Haase, W., Reiländer, H., & Michel, H. (1994). Heterologous Expression of the Human D_{2S} Dopamine Receptor in Protease-Deficient *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *European Journal of Biochemistry*, 226(2), 697–705. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb20098.x>
- Saribas, A. S., Abou-Gharbia, M., Childers, W., Sariyer, I. K., White, M. K., & Safak, M. (2013). Essential roles of Leu/Ile/Phe-rich domain of JC virus agnoprotein in dimer/oligomer formation, protein

- stability and splicing of viral transcripts. *Virology*, 443(1), 161–176. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.003>
- Saribas, A. S., Coric, P., Hamazaspyan, A., Davis, W., Axman, R., White, M. K., Abou-Gharbia, M., Childers, W., Condra, J. H., Bouaziz, S., & Safak, M. (2016). Emerging From the Unknown: Structural and Functional Features of Agnoprotein of Polyomaviruses. *Journal of Cellular Physiology*, 231(10), 2115–2127. <https://doi.org/10.1002/jcp.25329>
- Saribas, A. S., Coric, P., Bouaziz, S., & Safak, M. (2019). Expression of novel proteins by polyomaviruses and recent advances in the structural and functional features of agnoprotein of JC virus, BK virus, and simian virus 40. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8295–8315. <https://doi.org/10.1002/jcp.27715>
- Sariyer, I. K., Saribas, A. S., White, M. K., & Safak, M. (2011). Infection by agnoprotein-negative mutants of polyomavirus JC and SV40 results in the release of virions that are mostly deficient in DNA content. *Virology Journal*, 8(1), 255. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-255>
- Sasnauskas, K., Bulavaite, A., Hale, A., Jin, L., Knowles, W. A., Gedvilaite, A., Dargevičiūtė, A., Bartkevičiūtė, D., Žvirblienė, A., Staniulis, J., Brown, D. W. G., & Ulrich, R. (2002). Generation of Recombinant Virus-Like Particles of Human and Non-Human Polyomaviruses in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Intervirology*, 45(4–6), 308–317. <https://doi.org/10.1159/000067922>
- Scherneck, S., Ulrich, R., & Feunteun, J. (2001). The Hamster Polyomavirus—A Brief Review of Recent Knowledge*. *Virus Genes*, 22(1), 93–101. <https://doi.org/10.1023/A:1008190504521>
- Schmidlin, K., Kraberger, S., Cook, C., DeNardo, D. F., Fontenele, R. S., Van Doorslaer, K., Martin, D. P., Buck, C. B., & Varsani, A. (2021). A novel lineage of polyomaviruses identified in bark scorpions. *Virology*, 563, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.08.008>
- Schowalter, R. M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K. A., Moyer, A. L., & Buck, C. B. (2010). Merkel Cell Polyomavirus and Two Previously Unknown Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin. *Cell Host & Microbe*, 7(6), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.006>
- Schowalter, R. M., & Buck, C. B. (2013). The Merkel Cell Polyomavirus Minor Capsid Protein. *PLoS Pathogens*, 9(8), e1003558. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003558>
- Schrödinger. (2010). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC.
- Seneca, N. T. M., Sáenz Robles, M. T., & Pipas, J. M. (2014). Removal of a small C-terminal region of JCV and SV40 large T antigens has differential effects on transformation. *Virology*, 468–470, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.038>
- Shahid, T., Danazumi, A. U., Tehseen, M., Alhudhali, L., Clark, A. R., Savva, C. G., Hamdan, S. M., & De Biasio, A. (2025). Structural dynamics of DNA unwinding by a replicative helicase. *Nature*, 641(8061), 240–249. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-08766-w>
- Shen, P. S., Enderlein, D., Nelson, C. D. S., Carter, W. S., Kawano, M., Xing, L., Swenson, R. D., Olson, N. H., Baker, T. S., Cheng, R. H., Atwood, W. J., Johne, R., & Belnap, D. M. (2011). 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*, 411(1), 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.005>
- Shin, Y. C., & Folk, W. R. (2003). Formation of Polyomavirus-Like Particles with Different VP1 Molecules That Bind the Urokinase Plasminogen Activator Receptor. *Journal of Virology*, 77(21), 11491–11498. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.21.11491-11498.2003>

- Siebrasse, E. A., Reyes, A., Lim, E. S., Zhao, G., Mkakosya, R. S., Manary, M. J., Gordon, J. I., & Wang, D. (2012). Identification of MW Polyomavirus, a Novel Polyomavirus in Human Stool. *Journal of Virology*, 86(19), 10321–10326. <https://doi.org/10.1128/JVI.01210-12>
- Sigrist, C. J. A., De Castro, E., Cerutti, L., CuChe, B. A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., & Xenarios, I. (2012). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D344–D347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>
- Simon, C., Klose, T., Herbst, S., Han, B. G., Sinz, A., Glaeser, R. M., Stubbs, M. T., & Lilie, H. (2014). Disulfide Linkage and Structure of Highly Stable Yeast-derived Virus-like Particles of Murine Polyomavirus. *Journal of Biological Chemistry*, 289(15), 10411–10418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484162>
- Skoczylas, C., Fahrbach, K. M., & Rundell, K. (2004). Cellular Targets of the SV40 Small-t Antigen in Human Cell Transformation. *Cell Cycle*, 3(5), 604–608. <https://doi.org/10.4161/cc.3.5.836>
- Soldatova, I., Prilepskaja, T., Abrahamyan, L., Forstová, J., & Huérfano, S. (2018). Interaction of the Mouse Polyomavirus Capsid Proteins with Importins Is Required for Efficient Import of Viral DNA into the Cell Nucleus. *Viruses*, 10(4), 165. <https://doi.org/10.3390/v10040165>
- Soussi, T. (1986). DNA-binding properties of the major structural protein of simian virus 40. *Journal of Virology*, 59(3), 740–742. <https://doi.org/10.1128/jvi.59.3.740-742.1986>
- Spencer, S., Feltkamp, M. C. W., Daugherty, M. D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., & Ehlers, B. (2016). A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Archives of Virology*, 161(6), 1739–1750. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2794-y>
- Srinivasan, A., McClellan, A. J., Vartikar, J., Marks, I., Cantalupo, P., Li, Y., Whyte, P., Rundell, K., Brodsky, J. L., & Pipas, J. M. (1997). The Amino-Terminal Transforming Region of Simian Virus 40 Large T and Small t Antigens Functions as a J Domain. *Molecular and Cellular Biology*, 17(8), 4761–4773. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.8.4761>
- Stehle, T., Yan, Y., Benjamin, T. L., & Harrison, S. C. (1994). Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature*, 369(6476), 160–163. <https://doi.org/10.1038/369160a0>
- Stehle, T., & Harrison, S. C. (1996). Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure*, 4(2), 183–194. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00021-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00021-4)
- Stehle, T., Gamblin, S. J., Yan, Y., & Harrison, S. C. (1996). The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure*, 4(2), 165–182. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00020-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00020-2)
- Stewart, S. E., Eddy, B. E., & Borgese, N. (1958). Neoplasms in Mice Inoculated with a Tumor Agent Carried in Tissue Culture2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 20(6), 1223–1243. <https://doi.org/10.1093/jnci/20.6.1223>
- Ströh, L. J., Maginnis, M. S., Blaum, B. S., Nelson, C. D. S., Neu, U., Gee, G. V., O'Hara, B. A., Motamedi, N., DiMaio, D., Atwood, W. J., & Stehle, T. (2015). The Greater Affinity of JC Polyomavirus Capsid for α 2,6-Linked Lactoseries Tetrasaccharide c than for Other Sialylated Glycans Is a Major Determinant of Infectivity. *Journal of Virology*, 89(12), 6364–6375. <https://doi.org/10.1128/JVI.00489-15>
- Sullivan, C. S., Gilbert, S. P., & Pipas, J. M. (2001). ATP-Dependent Simian Virus 40 T-Antigen–Hsc70 Complex Formation. *Journal of Virology*, 75(4), 1601–1610. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1601-1610.2001>

- Sullivan, C. S., & Pipas, J. M. (2002). T Antigens of Simian Virus 40: Molecular Chaperones for Viral Replication and Tumorigenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), 179–202. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.179-202.2002>
- Sullivan, C. S., Grundhoff, A. T., Tevethia, S., Pipas, J. M., & Ganem, D. (2005). SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*, 435(7042), 682–686. <https://doi.org/10.1038/nature03576>
- Suzuki, T., Orba, Y., Okada, Y., Sunden, Y., Kimura, T., Tanaka, S., Nagashima, K., Hall, W. W., & Sawa, H. (2010). The Human Polyoma JC Virus Agnoprotein Acts as a Viroporin. *PLoS Pathogens*, 6(3), e1000801. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000801>
- Suzuki, T., Semba, S., Sunden, Y., Orba, Y., Kobayashi, S., Nagashima, K., Kimura, T., Hasegawa, H., & Sawa, H. (2012). Role of JC virus agnoprotein in virion formation. *Microbiology and Immunology*, 56(9), 639–646. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00484.x>
- Sweet, B. H., & Hilleman, M. R. (1960). The Vacuolating Virus, S.V.40. *Experimental Biology and Medicine*, 105(2), 420–427. <https://doi.org/10.3181/00379727-105-26128>
- Šedytė, L. (2025). Paprastojo pelėno poliomos viruso koduojamų baltymų sintezės ir poveikio tyrimas *Saccharomyces cerevisiae*. Vilniaus Universitetas.
- Tan, Z., Gonzalez, G., Sheng, J., Wu, J., Zhang, F., Xu, L., Zhang, P., Zhu, A., Qu, Y., Tu, C., Carr, M. J., & He, B. (2020). Extensive Genetic Diversity of Polyomaviruses in Sympatric Bat Communities: Host Switching versus Coevolution. *Journal of Virology*, 94(9), e02101-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02101-19>
- Tao, Y., Shi, M., Conrardy, C., Kuzmin, I. V., Recuenco, S., Agwanda, B., Alvarez, D. A., Ellison, J. A., Gilbert, A. T., Moran, D., Niezgod, M., Lindblade, K. A., Holmes, E. C., Breiman, R. F., Rupprecht, C. E., & Tong, S. (2013). Discovery of diverse polyomaviruses in bats and the evolutionary history of the Polyomaviridae. *Journal of General Virology*, 94(4), 738–748. <https://doi.org/10.1099/vir.0.047928-0>
- Teunissen, E. A., De Raad, M., & Mastrobattista, E. (2013). Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses. *Journal of Controlled Release*, 172(1), 305–321. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.026>
- Tomimoto, K., Fujita, Y., Iwaki, T., Chiba, Y., Jigami, Y., Nakayama, K., Nakajima, Y., & Abe, H. (2013). Protease-Deficient *Saccharomyces cerevisiae* Strains for the Synthesis of Human-Compatible Glycoproteins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(12), 2461–2466. <https://doi.org/10.1271/bbb.130588>
- Torres, C. (2020). Evolution and molecular epidemiology of polyomaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 79, 104150. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104150>
- Treisman, R., Novak, U., Favaloro, J., & Kamen, R. (1981). Transformation of rat cells by an altered polyoma virus genome expressing only the middle-T protein. *Nature*, 292(5824), 595–600. <https://doi.org/10.1038/292595a0>
- Valle, L., & Piña-Oviedo, S. (2019). Human Polyomavirus JCPyV and Its Role in Progressive Multifocal Leukoencephalopathy and Oncogenesis. *Frontiers in Oncology*, 9, 711. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00711>
- Vasiliūnaitė, E., Repšytė, M., Kramer, E. M., Lang, J., Jelinek, C., Ulrich, R. G., Buck, C. B., & Gedvilaitė, A. (2024). Novel polyomavirus in the endangered garden dormouse *Eliomys quercinus*. *Virology Journal*, 21(1), 309. <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02581-x>

- Verhaegen, M. E., Mangelberger, D., Harms, P. W., Vozheiko, T. D., Weick, J. W., Wilbert, D. M., Saunders, T. L., Ermilov, A. N., Bichakjian, C. K., Johnson, T. M., Imperiale, M. J., & Dlugosz, A. A. (2015). Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Is Oncogenic in Transgenic Mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(5), 1415–1424. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.446>
- Viciano, P., Collins, C., & Fried, M. (2006). Polyoma and SV40 proteins differentially regulate PP2A to activate distinct cellular signaling pathways involved in growth control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(51), 19290–19295. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609343103>
- Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & Zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- Voronkova, T., Kazaks, A., Ose, V., Özel, M., Scherneck, S., Pumpens, P., & Ulrich, R. (2007). Hamster polyomavirus-derived virus-ficles are able to transfer in vitro encapsidated plasmid DNA to mammalian cells. *Virus Genes*, 34(3), 303–314. <https://doi.org/10.1007/s11262-006-0028-1>
- Walczak, C. P., & Tsai, B. (2011). A PDI Family Network Acts Distinctly and Coordinately with ERp29 To Facilitate Polyomavirus Infection. *Journal of Virology*, 85(5), 2386–2396. <https://doi.org/10.1128/JVI.01855-10>
- Walder, T. A., Odegard, E. A., Meeds, H. L., Kleiboeker, S. B., Ziady, A., Sabulski, A., Jodele, S., Seif, A. E., Davies, S. M., Laskin, B. L., & Blackard, J. T. (2025). Single-nucleotide polymorphisms within the BK polyomavirus non-coding control region are genotype-associated. *Microbiology Spectrum*, 13(8), e00494-25. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00494-25>
- Wang, M., & Marín, A. (2006). Characterization and prediction of alternative splice sites. *Gene*, 366(2), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.07.015>
- Welch, N. L., Tisza, M. J., Starrett, G. J., Belford, A. K., Pastrana, D. V., Pang, Y.-Y. S., Schiller, J. T., An, P., Cantalupo, P. G., Pipas, J. M., Koda, S., Subramaniam, K., Waltzek, T. B., Bian, C., Shi, Q., Ruan, Z., Ng, T. F. F., & Buck, C. B. (2018). *Identification of Adomavirus Virion Proteins*. <https://doi.org/10.1101/341131>
- Wen, C. M., Chen, M. M., Wang, C. S., Liu, P. C., & Nan, F. H. (2016). Isolation of a novel polyomavirus, related to Japanese eel endothelial cell-infecting virus, from marbled eels, *Anguilla marmorata* (Quoy & Gaimard). *Journal of Fish Diseases*, 39(7), 889–897. <https://doi.org/10.1111/jfd.12423>
- Wessel, R., Schweizer, J., & Stahl, H. (1992). Simian virus 40 T-antigen DNA helicase is a hexamer which forms a binary complex during bidirectional unwinding from the viral origin of DNA replication. *Journal of Virology*, 66(2), 804–815. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.2.804-815.1992>
- Whalen, K. A., De Jesus, R., Kean, J. A., & Schaffhausen, B. S. (2005). Genetic Analysis of the Polyomavirus DnaJ Domain. *Journal of Virology*, 79(15), 9982–9990. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9982-9990.2005>
- White, M. K., Safak, M., & Khalili, K. (2009). Regulation of Gene Expression in Primate Polyomaviruses. *Journal of Virology*, 83(21), 10846–10856. <https://doi.org/10.1128/JVI.00542-09>
- White, M. K., Gordon, J., & Khalili, K. (2013). The Rapidly Expanding Family of Human Polyomaviruses: Recent Developments in Understanding Their Life Cycle and Role in Human Pathology. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003206. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003206>
- Wiedinger, K., Bitsaktsis, C., & Chang, S. (2014). Reactivation of human polyomaviruses in immunocompromised states. *Journal of NeuroVirology*, 20(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13365-014-0234-x>

- Woolford, C. A., Daniels, L. B., Park, F. J., Jones, E. W., Van Arsdell, J. N., & Innis, M. A. (1986). The *PEP4* Gene Encodes an Aspartyl Protease Implicated in the Posttranslational Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Vacuolar Hydrolases. *Molecular and Cellular Biology*, 6(7), 2500–2510. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.7.2500-2510.1986>
- Woolford, L., Rector, A., Van Ranst, M., Ducki, A., Bennett, M. D., Nicholls, P. K., Warren, K. S., Swan, R. A., Wilcox, G. E., & O'Hara, A. J. (2007). A Novel Virus Detected in Papillomas and Carcinomas of the Endangered Western Barred Bandicoot (*Perameles bougainville*) Exhibits Genomic Features of both the *Papillomaviridae* and *Polyomaviridae*. *Journal of Virology*, 81(24), 13280–13290. <https://doi.org/10.1128/JVI.01662-07>
- Wu, X., Avni, D., Chiba, T., Yan, F., Zhao, Q., Lin, Y., Heng, H., & Livingston, D. (2004). SV40 T antigen interacts with Nbs1 to disrupt DNA replication control. *Genes & Development*, 18(11), 1305–1316. <https://doi.org/10.1101/gad.1182804>
- Xiao, B., Freedman, B. S., Miller, K. E., Heald, R., & Marko, J. F. (2012). Histone H1 compacts DNA under force and during chromatin assembly. *Molecular Biology of the Cell*, 23(24), 4864–4871. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-07-0518>
- Zhao, L., Marciano, A. T., Rivet, C. R., & Imperiale, M. J. (2016). Caveolin- and clathrin-independent entry of BKPyV into primary human proximal tubule epithelial cells. *Virology*, 492, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.02.007>
- Zhao, L., & Imperiale, M. J. (2017). Identification of Rab18 as an Essential Host Factor for BK Polyomavirus Infection Using a Whole-Genome RNA Interference Screen. *mSphere*, 2(4), e00291-17. <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00291-17>
- Zheng, W., Wei, T., Ma, F., Yuan, W., Zhang, Q., Zhang, Y., Cui, H., & Zheng, L. (2015). Human polyomavirus type six in respiratory samples from hospitalized children with respiratory tract infections in Beijing, China. *Virology Journal*, 12(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0390-5>
- Zhou, A. Y., Ichaso, N., Adamarek, A., Zila, V., Forstova, J., Dibb, N. J., & Dilworth, S. M. (2011). Polyomavirus Middle T-Antigen Is a Transmembrane Protein That Binds Signaling Proteins in Discrete Subcellular Membrane Sites. *Journal of Virology*, 85(7), 3046–3054. <https://doi.org/10.1128/JVI.02209-10>
- Zhou, X., Bai, H., Kataoka, M., Ito, M., Muramatsu, M., Suzuki, T., & Li, T.-C. (2019). Characterization of the self-assembly of New Jersey polyomavirus VP1 into virus-like particles and the virus seroprevalence in Japan. *Scientific Reports*, 9(1), 13085. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49541-y>
- Zhou, X., Zhu, C., & Li, H. (2023). BK polyomavirus: Latency, reactivation, diseases and tumorigenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1263983. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1263983>
- Zielonka, A., Gedvilaite, A., Ulrich, R., Lüscho, D., Sasnauskas, K., Müller, H., & Johne, R. (2006). Generation of virus-like particles consisting of the major capsid protein VP1 of goose hemorrhagic polyomavirus and their application in serological tests. *Virus Research*, 120(1–2), 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.02.010>
- Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S.-Z., Rau, D., Kübler, J., Lozajic, M., Gabler, F., Söding, J., Lupas, A. N., & Alva, V. (2018). A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *Journal of Molecular Biology*, 430(15), 2237–2243. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.007>

- Zou, W., & Imperiale, M. J. (2021). Biology of Polyomavirus miRNA. *Frontiers in Microbiology*, 12, 662892. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.662892>
- Zou, W., & Imperiale, M. J. (2023). Regulation of Virus Replication by BK Polyomavirus Small T Antigen. *Journal of Virology*, 97(3), e00077-23. <https://doi.org/10.1128/jvi.00077-23>

Priedai

1 Priedas. AagraPyV genomo variantų sekų ilgiai, numanomi ORF ir jų koduojamų baltymų ilgiai

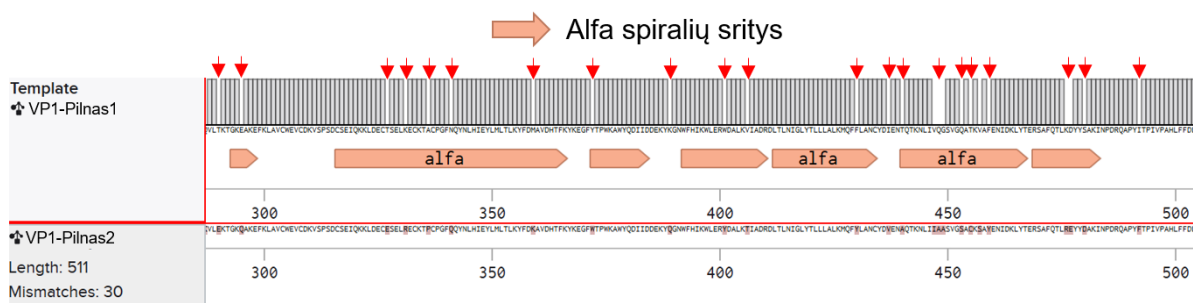
„Mėginio nr.“ stulpelis atspindi *A. agrarius* inkstų DNR mėginių numeraciją pateiktą 3.1 lentelėje, iš kurių buvo padaugintos ir nustatytos AagraPyV sekos.

Mėginio nr.	AagraPyV sekos pavadinimas	Genomo ilgis, bp	AagraPyV ORF koduojamų baltymų ilgis				
			LTA _g	VP1	VP2	Dagno-1	Dagno-2
16	AagraPyV-16-1	5385	581	511	243	118	55
16	AagraPyV-16-2	5385	581	511	243	118	55
17	AagraPyV-17-1	5406	520	512	243	118	55
17	AagraPyV-17-2	5407	359	512	243	118	55
17	AagraPyV-17-3	5389	581	511	243	118	-
18	AagraPyV-ref	5405	581	512	243	118	55
18	AagraPyV-18-2	5406	520	512	243	118	55
18	AagraPyV-18-3	5406	581	512	243	118	55
19	AagraPyV-19-1	5408	581	512	243	118	55
19	AagraPyV-19-2	5407	581	512	243	118	55
20	AagraPyV-20-1	5389	359	511	243	118	55
20	AagraPyV-20-2	5385	581	511	243	118	81

2 Priedas. Naujai nustatytų AagraPyV genomo variantų sekų ir jų numanomų ORF koduojamų baltymų porinių palyginių su AagraPyV-ref rezultatai

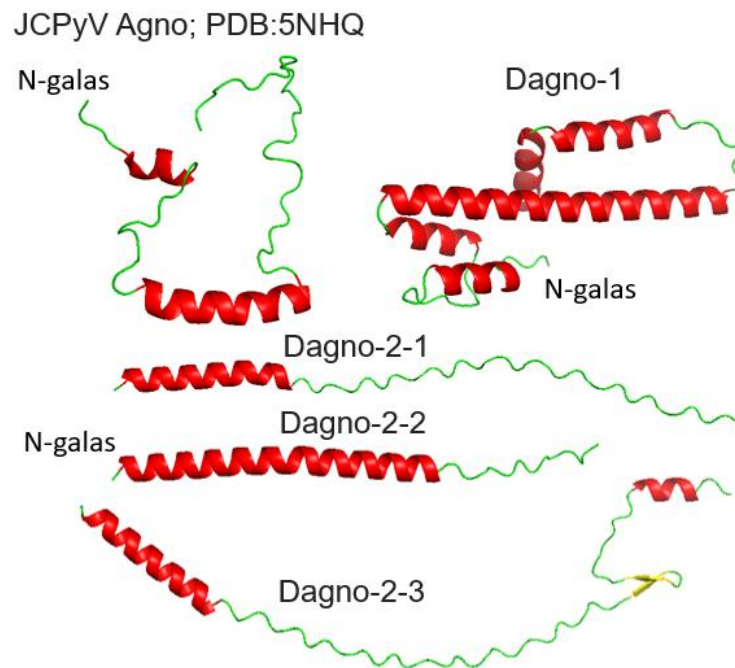
Poriniai palyginiai atlikti naudojant SDT programą, MAFFT algoritimą. Genomo sekų sutapimas (%) pateikiamas nukleotidų, o ORF koduojamų baltymų – aminorūgščių lygmeniu. Raudonai pažymėti sutrumpėjusių LTA_g ORF ir pailgėjusio Dagno-2 ORF koduojamų baltymų variantai.

AagraPyV sekos pavadinimas	Genomo, %	LTA _g , %	VP1, %	VP2, %	Dagno-1, %	Dagno-2, %
AagraPyV-16-1	93,13	97,59	94,32	96,71	100	92,70
AagraPyV-16-2	93,13	97,76	94,32	96,71	100	92,70
AagraPyV-17-1	99,85	94,62	100	100	100	100
AagraPyV-17-2	99,94	100	100	100	100	100
AagraPyV-17-3	93,00	97,41	94,32	96,71	100	-
AagraPyV-18-2	99,93	94,62	100	100	100	100
AagraPyV-18-3	99,85	100	100	100	100	100
AagraPyV-19-1	99,85	99,83	100	100	100	100
AagraPyV-19-2	99,89	100	100	100	100	100
AagraPyV-20-1	93,06	98,89	94,32	96,71	100	92,70
AagraPyV-20-2	93,09	97,76	94,32	96,71	100	87,27



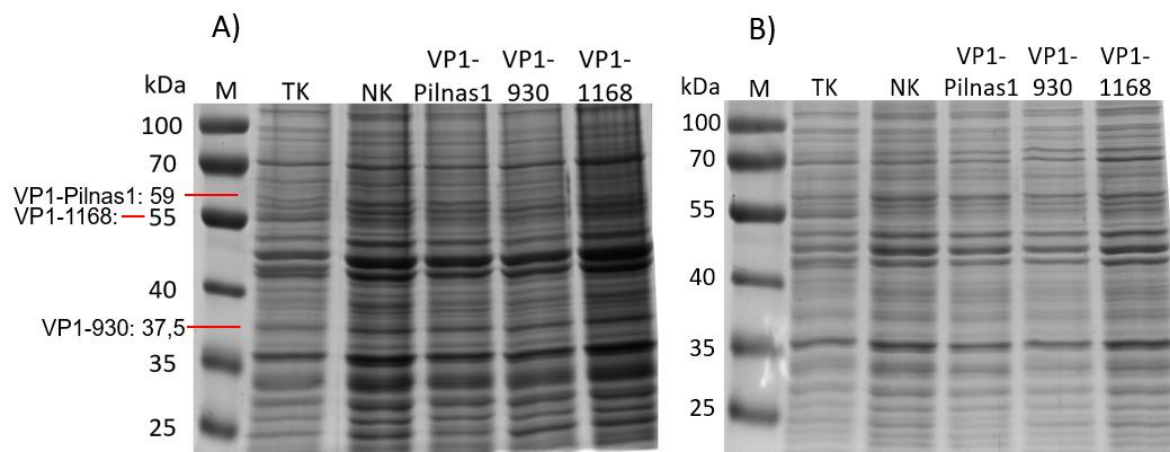
3 Priedas. VP1-Pilnas1 ir VP1-Pilnas2 baltymų C-galo sekų palyginio schema

Prognuozuotos alfa spiralių sritys pažymėtos rožine spalva. Raudonos rodyklėlės (arba žemiau balti tarpai) žymi aminorūgščių neatitikimus. Palyginys sukurtas su Benchling.com programa.



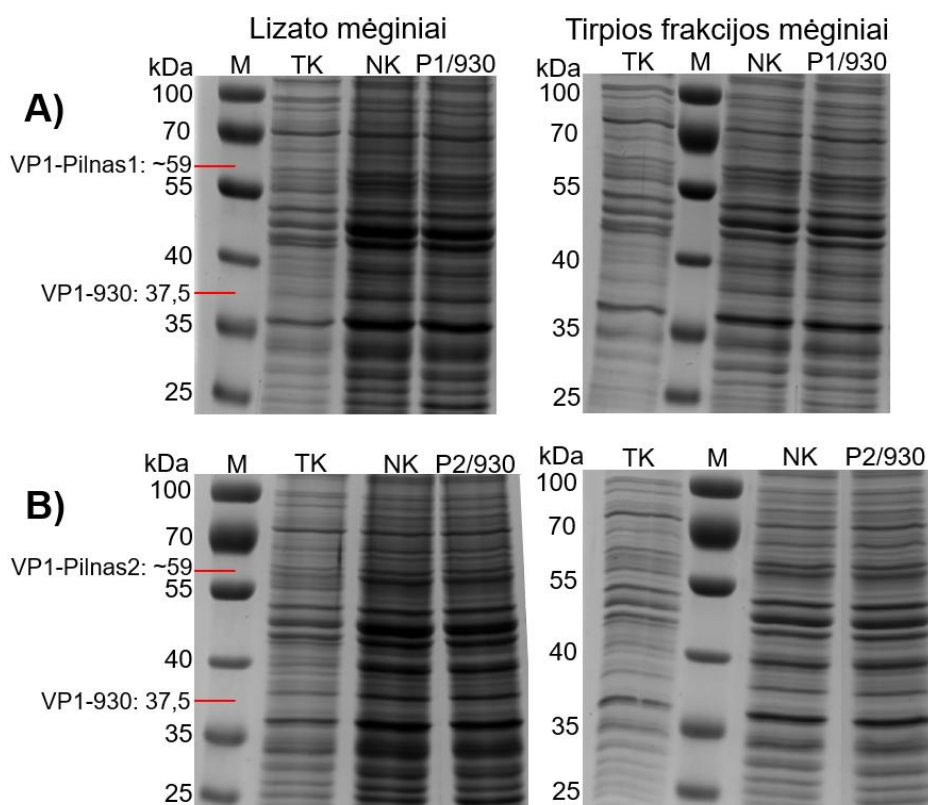
4 Priedas. Eksperimentiškai nustatytos JCPyV Agno struktūros (PDB: 5NHQ) palyginimas su AagraPyV Dagno ORF koduojamų baltymų struktūrų modeliais

β -klostės pažymėtos geltonai, α -spiralės – raudonai. Struktūros prognozuotos su AlphaFold programa. Iliustracija sukurta su PyMOL programa.



5 Priedas. AagraPyV VP1-Pilnas1 geno variantų koduojamų baltymų raiškos analizė NDS-PAGE išfrakcionavus lizato (A) ir tirpios frakcijos (B) baltymų mėginius

Kairėje pažymėtos VP1-Pilnas1, VP1-1168 ir VP1-930 baltymų pozicijos pagal jų prognozuojamą molekulinę masę. M– Baltymų molekulinės masės standartas. TK (teigiama kontrolė), NK (neigiama kontrolė), VP1-Pilnas1, VP1-930 ir VP1-1168 – mėginiai, paruošti iš mielių ląstelių, transformuotų atitinkamai : pFX7-CglPyV-VP1 (VP1 ~45 kDa), pFX7, pFX7-VP1-Pilnas1, pFX7-VP1-930 ir pFX7-VP1-1168 plazmidiniais vektoriais.



6 Priedas. AagraPyV VP1-Pilnas1 ir VP1-930 (A) bei VP1-Pilnas2 ir VP1-930 (B) ORF koduojamų baltymų ko-raiškos analizė NDS-PAGE išfrakcionavus lizato ir tirpios frakcijos baltymų mėginius

Kairėje gelių pusėje pažymėtos VP1-Pilnas1, VP1-930 ir VP1-Pilnas2 baltymų pozicijos pagal jų prognozuojamą molekulinę masę. M – Baltymų molekulinės masės standartas. TK (teigiama kontrolė), NK (neigiama kontrolė), P1/930 ir P2/930 - baltymų mėginiai, paruošti iš mielių ląstelių, transformuotų atitinkamai: pFX7-CglPyV-VP1 (CglPyV VP1 ~45 kDa), pFGG3, pFGG3-VP1-Pilnas1/930 ir pFGG3-VP1-Pilnas2/930 plazmidiniais vektoriais.