



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Elžbieta Žukaitė

Totivirusų lokalizacijos šeimininko ląstelėje veiksmų paieška

Magistro baigiamasis darbas

Mikrobiologijos studijų programa

Darbo vadovas

Dokt. Gerda Jasinevičienė

Darbas atliktas

VU GMC Biochemijos ir molekulinės biologijos
katedra, Nukleorūgščių biochemijos
laboratorija

Turinys

Santrumpos	4
Įvadas	6
1. Literatūros apžvalga	7
1.1. Mielių virusai.....	7
1.1.1. dgRNR virusai	7
1.1.2. Mikovirusai.....	7
1.1.3. <i>Orthototiviridae</i> šeimos virusai.....	8
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> virusinės sistemos	9
1.2.1. Mielių biocidinis fenotipas	9
1.2.2. ScV-L-A virusas ir ScV-M palydovai	9
1.2.3. ScV-L-BC virusas.....	14
1.2.4. L-A ir M palydovų sisteminis poveikis <i>S. cerevisiae</i>	15
1.2.5. <i>S. cerevisiae</i> ląstelės ciklo įtaka totivirusų plitimui	17
1.3. Virusinių baltymų lokalizacijos veiksniai <i>S. cerevisiae</i>	19
1.3.1. <i>S. cerevisiae</i> virusologijoje.....	19
1.3.2. dgRNR virusų lokalizacija.....	20
1.3.3. Totivirusų lokalizacija <i>S. cerevisiae</i>	21
1.4. <i>S. cerevisiae</i> baltymų lokalizacijos veiksniai.....	22
1.4.1. Branduolio lokalizacijos veiksniai <i>S. cerevisiae</i>	22
1.4.2. Endoplazminio tinklo lokalizacijos veiksniai <i>S. cerevisiae</i>	23
1.4.3. Mitochondrijų lokalizacijos veiksniai <i>S. cerevisiae</i>	23
1.4.4. Viduląstelinio transporto veiksniai <i>S. cerevisiae</i>	23
1.4.5. Baltymų degradacijos veiksniai <i>S. cerevisiae</i>	24
2. Medžiagos ir metodai	25
2.1. Medžiagos.....	25
2.1.1. Reagentai	25
2.1.2. Tirpalai	25
2.1.3. Augimo terpės.....	26
2.1.4. Fermentai ir molekulinės biologijos rinkiniai	27
2.1.5. Bakterijų ir mielių kamienai.....	27
2.1.6. Plazmidinės DNR	29
2.1.7. Oligonukleotidai.....	31
2.2. Metodai	31
2.2.1. Plazmidinės DNR skyrimas iš <i>E. coli</i>	31
2.2.2. DNR gryninimas iš agarozinio gelio	31
2.2.3. Plazmidinio vektoriaus išskyrimas iš <i>E. coli</i> ląstelių su chloroformu.....	31
2.2.4. Nukleorūgščių restrikcija endonukleazėmis	31
2.2.5. Nukleorūgščių elektroforezė agaroziniame gelyje	32
2.2.6. Plazmidinės DNR vektorių konstravimas.....	32
2.2.7. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)	33
2.2.8. Kompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių paruošimas ir transformacija plazmidine DNR.....	33
2.2.9. Kompetentinių <i>S. cerevisiae</i> ląstelių paruošimas ir transformacija plazmidine DNR.....	34
2.2.10. Homologinė rekombinacija pagrįsta mielių transformacija.....	34
2.2.11. <i>S. cerevisiae</i> genomo modifikacija paremta CRISPR-Cas9 sistema	34
2.2.12. Mielių kryžminimas	35
2.2.13. Sporuliacijos indukcija.....	35

2.2.14. Gyvų ląstelių mėginių paruošimas mikroskopavimui	35
2.2.15. Fiksuotų ląstelių mėginių paruošimas mikroskopavimui	35
2.2.16. Mėginių analizė fluorescensiniu mikroskopu.....	36
3. Rezultatai	37
3.1. Totivirusų kapsidžių baltymų žymėjimas GFP ir skirtingų konstrukčių analizė.....	37
3.2. Fiksuotų ląstelių paruošimo metodo optimizavimas	38
3.3. ScV-LA ir ScV-LBC kapsidžių baltymų lokalizacijos palyginimas.....	40
3.4. ScV-LA ir ScV-LBC kapsidžių baltymų lokalizacijos palyginimas haploidiniuose, diploidiniuose kamienuose ir sporose	42
3.5. Natyvių totivirusų įtaka rekombinantinių ScV-LA ir ScV-LBC baltymų lokalizacijai.....	44
3.6. ScV-LA rekombinantinių baltymų kolokalizacija su ląstelės kompartmentais.....	48
4. Rezultatų aptarimas	52
Išvados	55
Santrauka	56
Abstract	57
Autoriaus asmeninis indėlis	58
Padėka	59
Literatūros sąrašas	60

Santrumpos

- (-) vgRNR – angl. *negative-sense single-stranded RNA* – neigiamos krypties viengrandinė RNR
- (+) vgRNR – angl. *positive-sense single-stranded RNA* – teigiamos krypties viengrandinė RNR
- +TIP – angl. *plus-end tracking proteins* – mikrovamzdelių (+) galo baltymai
- CA – angl. *capsid* – kapsidės baltymas
- ConA – angl. *concanavalin A* – konkanavalinas A
- cryo-EM – angl. *cryogenic electron microscopy* – kriogeninė elektroninė mikroskopija
- dgRNR – angl. *double-stranded RNA* – dvigrandinė RNR
- DMSO – angl. *dimethyl sulfoxide* - dimetilsulfoksidas
- DNR – angl. *deoxyribonucleic acid* – deoksiribonukleorūgštis
- EDTA – angl. *ethylenediaminetetraacetic acid* – etilendiamintetraacto rūgštis
- ET – angl. *endoplasmic reticulum* – endoplazminis tinklas
- FG – angl. *phenylalanine-glycine repeats* – fenilalanino-glicino pasikartojimai
- FS – angl. *frameshift* – skaitymo rėmelio poslinkis
- GET – angl. *guided entry of tail-anchored proteins* – C-galo inkarinį motyvą turinčių baltymų nukreipimo kelias į ET
- GFP – angl. *green fluorescent protein* – žaliai fluorescuojantis baltymas
- HDR – angl. *homology-directed repair* – homologija paremtas DNR taisymas
- HR – angl. *homologous recombination* – homologinė rekombinacija
- iRNR – angl. *messenger RNA* – informacinė RNR
- MA – angl. *matrix* – citoplazminis baltymas
- MAK – angl. *maintenance of killer* – biocidinio fenotipo palaikymo genai
- MIA – angl. *mitochondrial intermembrane space import and assembly pathway* – mitochondrijų tarpembraninės srities baltymų importo ir susirinkimo kelias
- NC – angl. *nucleocapsid* – nukleokapsidės baltymas
- ncRNR – angl. *non-coding RNA* – nekoduojanti RNR
- NES – angl. *nuclear export signal* – branduolio eksporto signalas
- NHEJ – angl. *non-homologous end joining* – nehomologinių galų sujungimas
- NPC – angl. *nuclear pore complex* – branduolio porų kompleksas
- ORF – angl. *open reading frame* – atviras skaitymo rėmelis
- PBS – angl. *phosphate-buffered saline* – fosfatinis buferinis druskų tirpalas
- PGR – angl. *polymerase chain reaction* – polimerazinė grandininė reakcija
- Pol – angl. *RNA-dependent RNA polymerase* – nuo RNR priklausoma RNR polimerazė
- RdRp – angl. *RNA-dependent RNA polymerase* – nuo RNR priklausoma RNR polimerazė

- RFP – angl. *red fluorescent protein* – raudonai fluorescuojantis baltymas
- RNAi – angl. *RNR interference* – RNR interferencija
- RNR – angl. *ribonucleic acid* – ribonukleorūgštis
- rRNR – angl. *ribosomal RNA* – ribosominė RNR
- SND – angl. *guided entry of tail-anchored proteins* – nuo SRP nepriklausomas baltymų nukreipimo kelias į ET
- SPB – angl. *spindle pole body* – mielių centromera
- SRP – angl. *signal recognition particle* – signalo atpažinimo baltymas
- TEM – angl. *transmission elektron microscopy* – transmisinė elektroninė mikroskopija
- tRNR – angl. *transfer RNA* – transportinė RNR
- V – angl. *volume* – tūris
- VLP – angl. *virus-like particle* – į virusą panaši dalelė

Įvadas

Saccharomyces cerevisiae yra plačiai naudojamas organizmas įvairiose pramonės ir mokslo srityse. 2023 m. buvo parodyta, kad net pusė *S. cerevisiae* kamienų iš įvairių kolekcijų gali būti aptinkami *Totiviridae* šeimos virusai, įskaitant ScV-LA, ScV-LBC ir nuo ScV-LA priklausomus ScV-M palydovus. Šie virusai gali būti susiję su ląstelės šeimininkės fenotipu ir daryti įtaką mielių populiacijų evoliucinei dinamikai. Pavyzdžiui, ScV-M palydovo ir ScV-LA koegzistavimas yra pagrindinis veiksnys, lemiantis mielių biocidinį aktyvumą (Crabtree et al., 2023).

Anksčiau buvo teigiama, kad vien tik ScV-LA ir ScV-LBC virusai neturi aiškaus poveikio *S. cerevisiae*, tačiau pastarojo dešimtmečio tyrimai parodė, kad totivirusų sąveika su ląstele šeimininke yra sudėtingesnė. Su ScV-LA gali būti siejamas *S. cerevisiae* genų raiškos, medžiagų apykaitos ir antivirusinių sistemų aktyvumas (Chau et al., 2023; Lukša et al., 2017; McBride et al., 2013). Tai reiškia, kad įvairūs ląstelės kompartmentai galimai tiesiogiai arba netiesiogiai sąveikauja su totivirusais, tačiau apie ScV-LA ir ScV-LBC translokaciją ląstelėje iki šiol nėra nežinoma.

Šio darbo metu siekiama nustatyti galimus ScV-LA ir ScV-LBC virusų kapsidės baltymų lokalizacijos veiksnius *S. cerevisiae* ląstelėse. Tyrimams buvo pasirinkta analizuoti rekombinantinių Gag baltymų lokalizaciją fluorescencinės mikroskopijos būdu, atsižvelgiant į galimą natyvių totivirusų arba ląstelės ploidiškumo įtaką. Gauti rezultatai gali suteikti naujų įžvalgų apie ScV-LA ir ScV-LBC virusų evoliuciją, plitimą bei galimą sąveiką su ląstelės viduląstelinėmis struktūromis.

Darbo tikslas: ištirti ScV-LBC ir ScV-LA virusinių kapsidžių lokalizacijos veiksnius *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti ribosominio rėmelio poslinkio reikšmę ScV-LA ir ScV-LBC virusų kapsidės baltymo Gag aminorūgščių sudėčiai.
2. Nustatyti ScV-LA ir ScV-LBC kapsidžių lokalizaciją *S. cerevisiae* mielėse fluorescencinės mikroskopijos būdu.
3. Palyginti rekombinantinių ScV-LA ir ScV-LBC kapsidžių lokalizaciją *S. cerevisiae* haploidiniuose, diploidiniuose kamienuose bei sporose.
4. Įvertinti natyvių totivirusų reikšmę ScV-LA ir ScV-LBC kilmės kapsidžių lokalizacijai *S. cerevisiae* mielėse.
5. Nustatyti, kokiuose ląstelės kompartmentuose lokalizuojamos ScV-LA kapsidės.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Mielių virusai

1.1.1. dgRNR virusai

Dvigrandinės RNR (dgRNR) virusai infekuoja platų spektrą organizmų, įskaitant bakterijas, vienaląsčius eukariotus (pvz.: grybus arba protistus), taip pat augalus ir gyvūnus (Luque et al., 2018). Išskirtinai archėjose iki šiol dgRNR virusai nėra aptikti (Le Lay et al., 2023). Nors dgRNR virusai pasižymi didele įvairove, jiems būdinga panaši architektūra (Luque et al., 2018). Kapsidės sandara gali būti įvairi – vienasluoksnė, daugiasluoksnė arba koncentrinė. Išorinis apsauginis kapsidės sluoksnis siejamas su patekimu į ląstelę, vidinis sluoksnis, kurį turi visi dgRNR virusai, susijęs su genomo ir virusinės polimerazės organizacija. Visų dgRNR virusų vidinis sluoksnis sudarytas iš 120 baltymų subvienetų, kurie suformuoja $T = 1$ ikosoedrinę struktūrą. Struktūriniai baltymai sudaro 60 asimetrinių dimerų, todėl dar vadinama pseudo $T = 2$ struktūra (CASPAR et al., 1962; Luque et al., 2018). $T = 1$ kapsidė dgRNR virusams yra kritiškai svarbi replikacijai (neigiamos (-) grandinės sintezei) ir transkripcijai (teigiamos (+) grandinės sintezei), nuo virusinės RNR priklausoma RNR polimerazė (RdRp) dažniausiai integruojama į kapsidę kartu su genomu. $T = 1$ kapsidės poros leidžia viengrandinių RNR (vgRNR) transkriptų patekimą į citoplazmą, kad galėtų vykti transliacija. Kapsidės poros taip pat užtikrina nukleotidų patekimą į vidų, kuris reikalingas RNR sintezei. Ši kapsidės struktūra išlaiko viruso genomą izoliuotą, kas padeda išvengti ląstelės šeimininkės antivirusinių gynybos mechanizmų (Grybchuk et al., 2022a; Ilca et al., 2026; Luque et al., 2018; Pan et al., 2021; Schmidt et al., 2024; Stevens et al., 2023).

1.1.2. Mikovirusai

Mikovirusai – tai grybus infekuojantys virusai, kurie paplitę įvairiuose šeimininkuose: nuo siūlinių askomicetų, bazidiomicetų iki mielių. Nors šiandien žinoma, kad mikovirusų genomai gali būti įvairūs (dgRNR, (+) vgRNR), (-) vgRNR) ir žiedinės vgRNR), daugelis mikovirusų turi dgRNR genomą. Mikovirusai skiriasi ir genomo organizacija: būna monopartitiniai arba segmentuoti genomai. Grybus infekuojančiuose dgRNR virusuose aptinkami tiek vieno, tiek dviejų, tiek keturių ar net daugiau segmentų genomai (Hough et al., 2023; Kondo et al., 2022). Daugumai mikovirusų nebūdinga ekstraląstelinė fazė, todėl jie perduodami vertikaliu būdu ląstelei dalijantis arba sporuliuojant, taip pat gali plisti horizontaliai per hifų anastomozes. Dėl tokio perdavimo būdo virusų plitimas yra priklausomas nuo jų viduląstelinės sąveikos su šeimininko ląstele (Myers et al., 2022). Mikovirusų poveikis ląstelei šeimininkei yra įvairus: dalis virusų infekuoja nepastebimai, nesukeldami ląstelei aiškaus fenotipo, o kiti daryti įtaką ląstelės medžiagų apykaitai, augimui, sporuliacijai, konkurencijai ir daugeliui kitų viduląstelinių mechanizmų (Galli et al., 2025; Myers et al., 2022).

1.1.3. *Orthototiviridae* šeimos virusai

Orthototiviridae šeimai būdingi ikosaedrinį apvalkalą turintys dgRNR virionai, kurių skersmuo 40-49 nm ir 3,9-5,6 kb dgRNR linijinis genomai (*Family: Orthototiviridae (Interim Report) | ICTV*, n.d.), ankstesnėje literatūroje nurodomas 4,6-6,7 kb intervalas (*Totivirus ~ ViralZone*, n.d.). Struktūriniu požiūriu *Orthototiviridae* kapsidės ne tik apsaugo genomą, bet susijusios ir su genomo organizacija bei replikacijos kompleksu (Schmidt et al., 2024).

Pagal dabartinę ICTV klasifikaciją buvusi *Totiviridae* šeima reorganizuota ir klasikiniai mielių virusai dabar priskiriami *Orthototiviridae* šeimai. Šios šeimos virusai priklauso *Orthornavirae* karalystei, *Duplornaviricota* tipui, *Chrymotiviricetes* klasei, *Ghabrivirales* eilei, *Alphatotivirineae* poeiliui, šiuo metu šeimoje pripažįstama 1 gentis ir 32 rūšys (*Family: Orthototiviridae (Interim Report) | ICTV*, n.d.). Dalis literatūros remiasi istoriniu terminu *Totiviridae* arba “totivirusai” (*Totivirus ~ ViralZone*, n.d.). *Totiviridae* atstovai tradiciškai siejami su grybais ir protistais, tačiau pastaraisiais metais filogenetiškai giminingi totivirusams arba panašūs į totivirusus (toti-like) priskiriami dgRNR virusai aptikti augalų ir bestuburių šeimininkuose pvz.: kukurūzuose, europiniuose beržuose, uoduose, krevetėse, skruzdėlėse, mėlynuosiuose krabuose ir kt. Toti-like virusai priskiriami *Orthototiviridae* dėl panašios kapsidės struktūros, nesegmentuoto dgRNR genomo ir dviejų skaitymo rėmelių su persidengiančiais *gag* ir *pol* genais. Taip pat filogenetinės analizės parodė, kad RdRp (angl. *RNA dependent RNA polymerase*) koduojančios sekos grupuojasi su totivirusais (Akinyemi et al., 2018; Okada et al., 2025; Reyes-Proañó et al., 2024; Tang et al., 2008; Zhai et al., 2010; M. Zhao et al., 2022). Biologiškai totivirusai virusai išsiskiria, nes mielėse neturi ekstraląstelinės fazės, todėl plinta vertikaliai ląstelei dalijantis, sporuliuojant ar poravimosi metu per citoplazmos susiliejimą. Dėl tokio gyvenimo ciklo totivirusai mielėse tapo klasikiniu modeliu ilgalaikiai viruso ir šeimininko sąveikai tirti. Didelė dalis žinių apie totivirusus paremta klasikiniiais *S. cerevisiae* L-A viruso tyrimais (Dinman et al., 1991a). *S. cerevisiae* aptinkami L-BC, L-A bei nuo L-A priklausomi M palydovai, su kuriais tiesiogiai siejamas biocidinio aktyvumo fenotipas (angl. *killer*). Plataus masto *S. cerevisiae* izoliatų tyrime biocidinis fenotipas nustatytas 10,3 % kamienų (Magdalena D. Pieczynska et al., 2013). Ši sistema yra vienas iš klasikinių pavyzdžių, kaip mažas virusinis genomai gali išplėsti savo biologinį poveikį pasitelkdamas palydovinį elementą ir išnaudodamas šeimininko sekrecinę sistemą. Plataus masto *S. cerevisiae* genomų kolekcijos analizė parodė, kad M palydovai pasitaiko žymiai rečiau nei koegzistuojantys L-A virionai. L-A nustatytas 30 iš 100 izoleatų, kai M palydovai aptinkami: M1 – 5, M2 – 3, Mlus – 7, M28 – 0. Dažniausiai aptinkamais laikomi L-BC, nustatyti net 100 iš 100 kamienų (Ball et al., 1984; J C Ribas et al., 1996; Vijayraghavan et al., 2023).

1.2. *Saccharomyces cerevisiae* virusinės sistemos

1.2.1. Mielių biocidinis fenotipas

Daugiau nei prieš 60 metų aprašytas biocidinis fenomenas, siejamas su totiviruso ir ląstelės šeimininkės abipusiu ryšiu. Jis pasireiškia tuo, kad mielės sekretuoja toksinį baltymą, kuris selektyviai žudo jautrias tos pačios arba giminingų rūšių ląsteles ir taip suteikia konkurencinį pranašumą esant ribotiems ištekliams aplinkoje (Bevan et al., 1973; Schmitt et al., 2002a). Biocidinį aktyvumą turinčios mielės yra plačiai paplitusios gamtoje ir aptinkamos visuose žemynuose (Boynton, 2019). 1987 metais buvo nustatyta, kad net 11 % mielių surinktų iš įvairių pasaulio vietovių skirtingų nišų pasižymi biocidiniu fenotipu (Starmer et al., 1987). Šis fenotipas aptinkamas tokiose mielių gentyse, kaip *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* ir *Zygosaccharomyces*. Tarp mielių rūšių biocidinių sitemų genetinis pagrindas skiriasi pvz. *Kluyveromyces lactis*, *Pichia acaciae*, *Pichia inositovora* biocidinį fenotipą lemia koduojančios linijinės dgRNR plazmidės, priešingai *Pichia farinosa*, *Williopsis mrakii* (senesnėje literatūroje – *Hansenula mrakii*) toksininių baltymų genai koduojami chromosomose (Muccilli et al., 2015; Schmitt et al., 2002a). *S. cerevisiae* ir *Saccharomyces paradoxus* kilerinės sistemos susijusios su citoplazminiu būdu paveldimu *Totiviridae* šeimos L-A virusu ir jo M palydovu. *Totiviridae* šeimos virusai ir nuo jų priklausomi M palydovai aptinkami ir kitose mielių rūšyse: *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces Bailii*, *Torulaspora delbruecki*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces kudriavzevii*. Totiviruso ir *S. cerevisiae* sistemos evoliucinę svarbą pabrėžia ir tai, kad su dgRNR virusais susiję genai aptinkamos įvairių eukariotų genomuose pvz. augalų, antropodų, grybų, nematodų ir pirmuonių. Tai laikoma horizontalaus genų perdavimo ir vėlesnės integracijos pėdsakais (Liu et al., 2010; Wickner, 1996). Vėlesni populiacijų tyrimai parodė, kad biocidinį fenotipą turintys kamienai kai kuriose kolekcijose yra filogenetiškai artimesni vieni kitiems negu neturintys šio fenotipo. Tai parodo, kad šeimininko ir viruso koevoliuciją (M. D. Pieczynska et al., 2017).

1.2.2. ScV-L-A virusas ir ScV-M palydovai

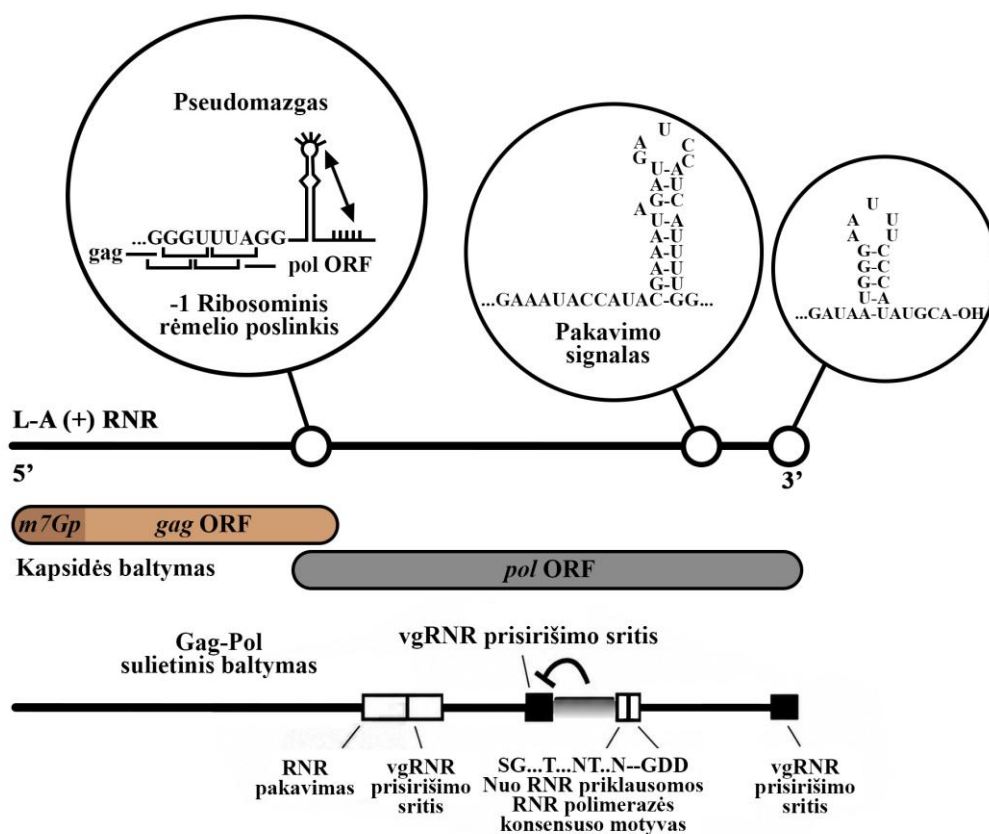
ScV-LA yra geriausiai ištirtas totivirusas mielėse. Klasikinis *S. cerevisiae* ScV-LA genomas yra 4,6 kb ilgio dgRNR ir turi du persidengiančius atvirus skaitymo rėmelius, koduojančius Gag ir Pol baltymus (**Pav.1. 1**). Atviro skaitymo rėmelio persidengimas yra 130 nt ilgio (Wickner, 1996a). *gag* koduoja pagrindinį kapsidės baltymą, šis baltymas yra ~680 a.r. ilgio ir jo molekulinė masė 76-81 kDa, *pol* koduoja 868 a.r. nuo RNR priklausomą RNR polimerazę (RdRp), kuri yra ~94 kDa (Luque et al., 2018). Ląstelėje RdRp nėra transliuojamas kaip atskiras produktas, jis transliuojamas kartu su Gag ir sudaro ~170-171 kDa Gag-Pol sulietinį baltymą (Dinman et al., 1991b). ScV-LA genų raiška

remiasi programuotu -1 ribosominiu rėmelio poslinkiu (angl. Frameshift). ScV-L-A *gag-pol* pasislinkimo vietoje yra slidus (angl. *slippery*) heptameras GGGUUUA, po kurio seka rėmelio poslinkį stimuliuojantis RNR pseudomazgas. Rėmelio poslinkio efektyvumas yra 1,8-1,9 %, tokiu atveju transliuojamas sulietinis Gag-Pol baltymas, kitais atvejais transliacijos produktu tampa Gag baltymas (Dinman et al., 1991b; Schmidt et al., 2024; Tzeng et al., 1992). Palyginti nedideli skaitymo rėmelio poslinkio dažnio pokyčiai gali pakeisti Gag ir Gag-Pol santykį. Pagalbinio ScV-LA viruso gyvavimo cikle labai svarbi ne vien Pol, bet ir tikslus jos stochiometrinis santykis su Gag 1:60, nes jei susintetinama per daug arba per mažai Gag-Pol, sutrinka ScV-LA replikacijos ciklas (Dinman et al., 1992; Schmidt et al., 2024). Pol srityje egzistuoja keli +RNR surišimo taikiniai, reikalingi sėkmingam virusinės RNR supakavimui į kapsidę. Šiam procesui būtinas Pol N-galinis įpakavimo domenas apima 67-213 a.r., RNR surišimo domenas 172-190 a.r. Šis įpakavimo domenas yra nutolęs nuo RdRp katalitinių motyvų, todėl įpakavimo ir katalitinės polimerazės funkcijos struktūriškai atskirtos (Tsutomu Fujimura et al., 2019; Juan Carlos Ribas et al., 1994).

ScV-LA viruso T=1 ikosaedrinė kapsidė iš 60 asimetrinių dimerų yra 37-40 nm skersmens sudaryta iš 120 Gag baltymų ir 1-2 Gag-Pol molekulių (Tsutomu Fujimura et al., 2011a; Rodríguez-Cousiño et al., 2013a; Schmidt et al., 2024). Klasikiniai biocheminiai tyrimai parodė, kad ScV-LA dalelė talpina vieną dgRNR genomo kopiją (T. Fujimura et al., 1986; Schmidt et al., 2024). Kapsidės viduje nuo dgRNR genomo sintetinama teigiamos krypties virusinė RNR, kuri išstumama į citoplazmą ir tampa matrica *gag* arba *gag-pol* transliacijai (**Pav. 1.1**) (Ramírez et al., 2022a; Schmidt et al., 2024). Po transliacijos Gag baltymui svarbus pirmų keturių amino rūgščių motyvas (MLRF), kuris susijęs su N-galo acetiliniu. Acetilinią atlieka acetiltransferazės kompleksas NatC, kurį koduoja *MAK3*, *MAK10*, *MAK31* (angl. *maintenance of killer*) genai (Lukša et al., 2022). Susiformavę baltymai atpažįsta virusinės kilmės RNR ir dalyvauja naujų dalelių surinkime. L-A kapsidės stabilumą lemia katijonų- π sąveikos, taip pat nekovalentinių sąveikų visuma, veikianti dešimtyje skirtingų Gag baltymų sąlyčio vietų (Schmidt et al., 2024). Virusų replikacijos ciklas baigiasi tada, kai atstatoma inkapsuliuotos RNR komplementari neigiama grandinė, taip suformuojanti naują dgRNR genomą (Ramírez et al., 2022a; Schmidt et al., 2024).

ScV-L-A virusinė RNR neturi iRNR būdingos kepurės struktūros (angl. *m⁷G cap*), todėl gali būti degraduota egzoribonukleazės Xrn1 (Ski1). Xrn1 5'→3' egzonukleazinį aktyvumą turintis Fis fermentas geriausiai skaido 5'-monofosforilintą vgRNR, tačiau 5'-difosforilinta RNR tampa blogu substratu. Pastebėta, kad evoliucijos eigoje, pradedant nuo bakterijų ir pereinant prie žmogaus organizmo, antivirusiniai mechanizmai turi daug panašumų, todėl įvairių tipų virusų strategijos siekiančios išvengti antivirusinės sistemos irgi turi sąsajų (Chau et al., 2023). Viena iš šių strategijų yra 5' galo maskavimas (angl. cap-snatching), tokiu būdu virusinės kilmės RNR 5' galas tampa panašus į ląstelės šeimininkės iRNR. ScV-LA yra taip pat būdingas RNR kepurės pašalinimo mechanizmas

(angl. *mRNA decapping*) (Chau et al., 2023; Tsutomu Fujimura et al., 2011b; Rotsch et al., 2026). ScV-LA būdingas alternatyvus metodas, kai m7Gp kepurės fragmentas pasiskolinamas iš ląstelės šeimininkės iRNR. Šio proceso katalizei reikalingas konservatyvus kapsidės Gag baltymo histidinas (His154). Susidaro fosforimidazolinis ryšys tarp kepurės α -fosfato ir gag baltymo His154 imidazolo žiedo azoto. ScV-LA viruso RdRp sintetina transkriptus su 5'-difosforilintu galu, kuris tampa m7Gp akceptoriumi. Kepurės perdavimo metu m7Gp nuo Gag per His154 perkeliama ant 5'-difosforilinto viruso transkripto galo, suformuojant iRNR būdingą 5'-5' trifosfatinę jungtį (**Pav. 1.1**). Šio proceso metu susidaro funkcionali cap0 tipo struktūra (Blanc et al., 1994). Tokia suformuota cap0 struktūra yra labai stabili ir net 8-15 kartų efektyviau padeda pritraukti transliacijos mechanizmą. Tokiu būdu m7Gp galą turintys viruso transkriptai išvengia citoplazminės Xrn1 (Tsutomu Fujimura et al., 2011; Rowley et al., 2016). Net jei pavyksta išvengti Xrn1, egzistuoja alternatyvus degradacijos kelias - citoplazminis egzozomos kompleksas (SKI).

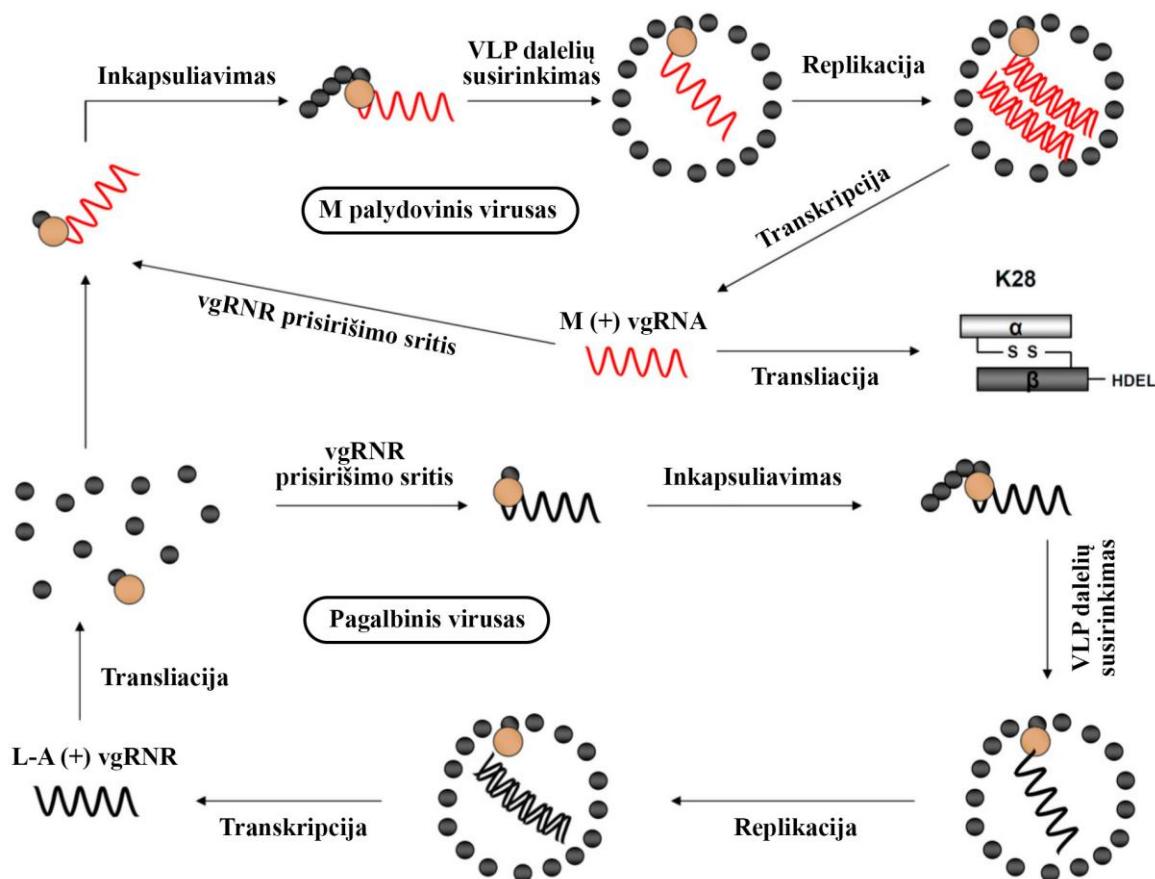


Pav. 1.1. ScV-LA viruso genomas su ribosominio rėmelio poslinio sritimis, vgRNR pakavimo sritimis ir persidengiančiu replikacijos sustiprinimo taikiniu 3' gale. His154 kepurės prisijungimo sritis m7Gp (pagal Wickner et al., 2013).

Kadangi ScV-L-A vgRNR neturi polyA uodegos, 3' galas yra neapsaugotas nuo citoplazminės 3' → 5' RNR degradacijos. Tokiu atveju su ribosomomis asocijuotas SKI kompleksas iš Ski2, Ski3, Ski8 subvienetų veikia kartu su Ski7 ir citoplazmine egzozoma. Ski2, kaip DexH tipo RNR helikazė gali išvynioti RNR substratą. Ski3 ir Ski8 sudaro struktūrinį karkasą, kuris sąveikauja su ribosoma.

Ski7 funkciškai sujungia SKI kompleksą su egzosoma. RNR perduodama egzomos katalitiniams centrums ir degraduojama 3' → 5' kryptimi (Chau et al., 2023; Parker et al., 2007; Zinoviev et al., 2020). Naujausiuose tyrimuose nustatytas mielių antivirusinis mechanizmas susijęs su mitochondrinės DNR/RNR endonukleaze Nuc1. Nuc1 yra endonukleazės G (EndoG) homologas, randamas visuose eukariotuose bei daugelyje prokariotų. Nuc1 daugiausiai siejamas su genomo fragmentacijos skatinimu programuotos ląstelių mirties metu. Programuota ląstelių mirtis yra mielių sporuliacijos dalis ir literatūroje dažnai aprašomas Nuc1 vaidmuo dalyvaujant DNR fragmentacijoje (Chau et al., 2023). Todėl ScV-LA viruso kontrolė gali būti laikoma „daugiasluoksniu“ procesu.

S. cerevisiae kilerinis fenotipas dažniausiai siejamas su M palydovais ir pagalbinio L-A virusu (Schmitt et al., 2006; Vijayraghavan et al., 2023). Nors M palydovų genome nekoduojami kapsidės baltymai ar RdRp, todėl jų palaikymas, replikacija ir enkapsidacija priklauso nuo ScV-LA kilmės Gag ir Gag-Pol baltymų (Pav. 1.2). M palydovai šiuos baltymus „skolinasi“ iš pagalbinio viruso (Aitmanaitė et al., 2021; Wickner et al., 2013). Taip pat pastebėta, kad pakitus -1 ribosominio rėmelio poslinkio dažniui, kuris lemia Gag-Pol susidarymą, M palydovai ląstelėje prarandami (Dinman et al., 1992).



Pav. 1.2 M28 palydovo ir pagalbinio L-A viruso replikacijos mechanizmai *S. cerevisiae* ląstelėje. L-A (+) vgRNR transliacijos metu susidaro Gag ir Gag-Pol baltymai, kurie suriša ir inkapsuliuoja virusinę RNR, kartu susiformuodami virusinės dalelės. M palydovų (+) nekoduoja kapsidės ir polimerazės baltymų, todėl jų virusinių dalelių susiformavimas, replikacija ir transkripcija priklauso nuo L-A viruso koduojamų Gag ir Gag-Pol baltymų. M28 (+) vgRNR

koduoja toksinio baltymo K28 prekursorių, su kuriuo siejamas mielių biocidinis fenotipas. M28 replikacijos mechanizmas analogiškas ir M1, M2, Mlus palydoviniams virusams (pagal Becker et al., 2017).

Dažniausiai *S. cerevisiae* aprašomi M1, M2, M28, Mlus palydovai, kurie atitinkamai siejami su K1, K2, K28 ir Klus toksinais. Šie virusai turi trumpas 1,5-2,4 kb ilgio dgRNR molekules, kurios koduoja preprotoksina (Rodríguez-Cousiño et al., 2011; Schmitt et al., 2006). Jų genomo architektūra panaši: 5' netransliuojama sritis, vienas atviras skaitymo rėmelis, adeniniais turtingas regionas ir 3' terminalinės plaukų segtuko struktūros, svarbios replikacijai ir inkapsuliacijai (**Pav. 1.3**) (Aitmanaitė et al., 2021; Wickner et al., 2013b). Po translacijos preprotoksinas pernešamas į endoplazminį tinklą, proteolitinio apdorojimo ir sekrecijos mechanizmai suformuoja aktyvų toksinį baltymą.



Pav. 1.3 M28 ir M1 palydovo dgRNR genomo architektūra. 5'-UTR trumpas netransliuojamas regionas, atviras skaitymo rėmelis koduojantis preprotoksina, adeniniais turtinga seka (keli šimtai nukleotidų) ir 3'- netransliuojamas regionas koduojantis VBS, IRE ir TRE palindromines sekas, kurios suformuoja plaukų segtuko struktūras, svarbias viruso replikacijai ir inkapsuliacijai (pagal Schmitt et al., 2021).

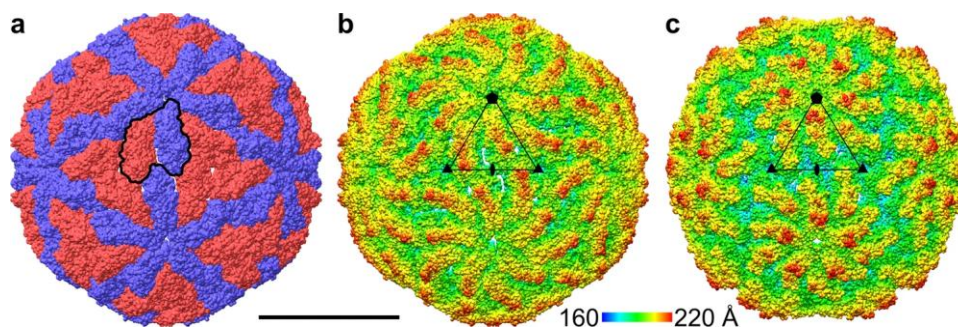
K1 ir K2 toksinai siejami su membranos pažeidimu ir jonų homeostazės sutrikdymu jautriose ląstelėse, o K28 toksinas pasižymi išskirtiniu viduląsteliniu veikimo mechanizmu apimančiu endocitozę, retrogradinį transportą ir poveikį branduolio funkcijoms (Schmitt et al., 2006). Mlus laikomas labiau divergentišku genomo lygmenyje. Klus taip pat būdingas platesnis biocidinio aktyvumo spektras, kai K1, K2 ir K28 turi biocidinį poveikį tik *S. cerevisiae* kamienams neturintiems atitinkamai M1, M2 ir M28 palydovo. Klus toksinis baltymas gali turėti fungicidinį poveikį ne tik skirtingiems *S. cerevisiae* kamienams, bet ir kitos rūšies mielėms, tokioms kaip *Kluyveromyces lactis* ir *Candida albicans*. 2011 m. tyrime buvo parodyta, kad Klus preprotoksino amino rūgščių seka panaši į *S. cerevisiae* užkoduotą chromosominį atviro skaitymo rėmelį YFR020W. Tai leidžia manyti, kad tarp palydovinės virusinės RNR ir šeimininko genomo galėjo vykti genetinės medžiagos pernaša ir įsisitavimas į branduolį arba bendra evoliucinė kilmė. Taip pat Mlus siejamas ne su kanoniniu L-A, bet su L-A-lus, kuris laikomas nauju L-A viruso tipo variantu (Rodríguez-Cousiño et al., 2011, 2013). Yra žinomi dar keli L-A variantai, tokie kaip LA-1, LA-2, LA-28, kurie pasižymi skirtingu suderinamumu su M palydovais, kas apibrėžia pagalbinių virusų ir palydovų koevoliuciją ląstelėje (Aitmanaitė et al., 2021; Rodríguez-Cousiño et al., 2017).

1.2.3. ScV-L-BC virusas

ScV-L-BC virusas yra *S. cerevisiae* dgRNR nesegmentuoto genomo totivirusas (J C Ribas et al., 1996b). L-BC turi daugiausiai sekos ir genomo organizacijos panašumų su L-A virusu, tačiau reprezentuoja savarankiškai persistuojančio mielių dgRNR viruso modelį. Biologinėmis funkcijomis L-BC skiriasi nuo L-A, kadangi nėra pagalbinis virusas M palydovams ir nėra asocijuojamas su biocidiniu fenotipu (Grybchuk et al., 2022a; Ramírez et al., 2022; Wickner et al., 2013). Nors išimtinai *Torulaspora delbrueckii* LBC virusų analizė parodė, kad kai kurie L-BC tipo viursai gali atlikti pagalbinę funkciją M palydovams, dėl cis-reguliacinių motyvų (Ramírez et al., 2022).

ScV-LBC genomas ~4,6 kb, kitų tipų L-BC virusų genomų dydžiai labiau varijuoja (4,5-5,1 kb). L-BC virusams būdingas persidengiantys *gag* ir *pol* atviro skaitymo rėmeliais. Gag-Pol sulietinio baltymo translaciją lemia -1 rėmelio poslinkis. Pirmasis atviro skaitymo rėmelis koduoja Gag kapsidės baltymą, antrasis – RdRp. Rėmelio poslinkio sritis lokalizuojama persidengimo regione su specifiniu GGAUUUU motyvu (Grybchuk et al., 2022; Ramírez et al., 2022).

ScV-L-BC kapsidė ikosaedrinė ir jos skersmuo siekia 38,5 nm. Kapsidę sudaro 120 Gag baltymų subvienetų. 2022 m. atlikta Kryo-EM analizė pavaizdavo, kad viruso kapsidė sudaryta iš dviejų to paties tipo konformacijų, organizuotų į dimerus iš A/B dimerų (**Pav. 1. 4**) 5 dimerai formuoja dekamerus. Kapsidė sudaryta iš 12 dekamerų. 2022 m. tyrimo metu mėginiuose buvo aptikta ir atvirų dalelių, kurioms trūko vieno dekamero. Toks vaizdas gali būti interpretuojamas kaip galima tarpinė viruso dalelės susirinkimo būseną. Šie duomenys leidžia manyti, kad L-BC kapsidės gali susirinkti iš dekamerinių kapsidės baltymų vienetų, tačiau neatmetamas trumpalaikių tarpinių kompleksų arba papildomų susirinkimo veiksmų dalyvavimas viruso dalelės susiformavime (Grybchuk et al., 2022a). Pastaraisiais metais buvo parodyta, kad L-BC Gag baltymas gali būti ekspresuojamas tiek *E. coli*, tiek *S. cerevisiae* mikroorganizmuose ir savarankiškai formuoti į virusus panašias daleles (angl. *Virus like particles, VLP*). Gag baltymai savaime sėkmingai susirenka į stabilią ~40 nm struktūrą (VLP), nepriklausomai nuo viruso genomo. Šis fenomenas turi potencialo ateityje būti taikomas ir alternatyvių molekulių pernašos mechanizmų kūrimui ląstelėse (Celitan et al., 2024).



Pav. 1. 4 Totivirusų molekuliniai paviršiaus atvaizdai. Mastelio žyma – 200 Å. **a** – L-BC viruso dalelės paviršius nuspalvintas pagal subvieneto tipą: A subvienetas pažymėtas mėlynai, B subvienetas pažymėtas raudonai. **b** – L-BC viruso dalelės ir **c** – palyginimui L-A viruso

dalelės, nuspalvintos vaivorykštinėje skalėje, pagal atstumą nuo dalelės centro angstremais (Å) (Grybchuk et al., 2022).

Naujausi populiaciniai tyrimai parodė, kad L-BC yra itin dažnas *S. cerevisiae* populiacijose. Ištyrus 100 genomų kolekcijų L-BC buvo aptiktas visuose kamienuose, tačiau dalelių kiekis tarp skirtingų kamienų nevienodas. Tai gali reikšti, kad L-BC virusų plitimas yra priklausomas ir nuo šeimininko genetinio fono. Genetiniai tyrimai parodė kad dalis genų, būtinų L-A išlaikymui ląstelėse, nėra būtinai L-BC, o kita dalis susijusi tik su L-BC stabilumu, pvz.: ScV-LA išlaikymui ląstelėje šeimininkėje būtinai *MAK3*, *MAK10* ir *MAK31*, reikalingi N-galo acetilinimui, tačiau L-BC nuo jų nepriklauso. Tuo tarpu *clo1* mutacija lemia ScV-L-BC praradimą, bet nedaro įtakos L-A (Grybchuk et al., 2022a; Vijayraghavan et al., 2023c). Tuo tarpu SKI antivirusinė sistema bendrai kontroliuoja ScV-L-A ir ScV-L-BC kopijų skaičių ląstelėje (Wickner et al., 2013a; Widner et al., 1993). Apie L-BC ryšį su ląstelės šeimininkės viduląsteliniais mechanizmais iki šiol nėra žinoma.

1.2.4. L-A ir M palydovų sisteminis poveikis *S. cerevisiae*

Sąveika tarp viruso iš ląstelės šeimininkės yra dinamiškas ir ilgalaikis procesas, kuriame viruso replikaciją lemia ne tik jo paties genomai, bet ir šeimininko molekulinė aplinka. Kadangi virusų genomai yra žymiai mažesni už šeimininko genomą, jų replikacijai, transliacijai ir išlaikymui reikalingi šeimininko viduląsteliniai mechanizmai. Virusai prisitaiko pasinaudoti įvairiomis viduląstelinėmis sistemomis, o ląstelė šeimininkė tuo pat metu vysto strategijas reguliuojančias virusų replikaciją (Grybchuk et al., 2022; Vijayraghavan et al., 2023).

Klasikinėje literatūroje ScV-LA ir M palydovo sistema dažniausiai minima biocidinio fenotipo kontekste, tačiau naujesni darbai rodo, kad jos reikšmė yra žymiai platesnė ir apima ilgalaikį viruso ir šeimininko koevoliucinį prisitaikymą. Svarbu paminėti, kad evoliucijos eigoje *S. cerevisiae* (įskaitant *S. paradoxus*, *S. mikatae* ir *S. kudriavzevii* ir kt.) išnyko funkcionali RNR interferencijos sistema. Su RNAi sistema siejamas Dicer (*DCR1*) ir Argonaute (*AGO1*) genų praradimas ir genominis stabilumas apsaugant nuo virusų bei transpozonų. Šiuo atveju L-A ir M palydovų išlikimas tampa ypač tinkamu modeliu tirti, kokiais alternatyviais keliais ląstelė riboja, toleruoja ir funkciškai pasinaudoja dgRNR virusais (Chau et al., 2023; Drinnenberg et al., 2011; Hsiao et al., 2025).

Istoriškai didžioji dalis žinių apie L-A ir M palydovų sistemos sąveiką su *S. cerevisiae* buvo gauta atliekant tyrimus susijusius su biocidiniu fenotipu. Būtent tokiu būdu identifikuoti MAK genai, kurių produktai būtinai biocidinės sistemos palaikymui (Wickner, 1996a; Wickner et al., 2013). Naujausias 2025 m. tyrimas apimantis viso genomo analizę parodė, kad ląstelės šeimininkės sąveika su ScV-LA yra dar sudėtingesnė, negu manyta anksčiau (Hsiao et al., 2025). Tiriant ~93% anotuotų mielių genų, nustatyti 96 genai, veikiantys L-A virusinių dalelių skaičiaus padidėjimą arba

sumažėjimą. Net 69 genus virusas išnaudoja egzistavimui ląstelėje ir tik 27 siejami su neigiamu poveikiu. Genų visuma susijusi su L-A virusu apima ~1,5 % visų žinomų *S. cerevisiae* baltymus koduojančių genų (6275 genų anotacijos su nustatytomis funkcijomis). Toks mastas rodo, kad iki šiol plačiai neištirti L-A palaikymo ląstelėje mechanizmai yra įtraukti į platų šeiminkės reguliacinių ir metabolinių tinklų kontekstą. Net 69 genus virusas išnaudoja persistavimui ląstelėje ir tik 27 siejami su neigiama reguliacija. Kartu šiame tyrime pakartotinai patvirtinta, kad mutacijos *SKI* regione gali 4-10 kartų padidinti L-A kopijų skaičių ląstelėje. Taip pat buvo parodyta, kad dalis nustatytų genų jau buvo siejami ir su kitų RNR virusų modeliais: *OCA4* ir *MET22* anksčiau sieti su BMV RNR replikacijos skatinimu arba slopinimu, *DCII* – su TBSV RNR rekombinacija, o *RAD26* – su HCV infekcijos metu aktyvinamu žmogaus *ERCC6* homologu. Vis dėl to šiuos ryšius tikslinga vertinti tik kaip užuominą į galimus bendrus šeiminkės ir viruso sąveikos kelius (Hsiao et al., 2025; Wickner et al., 2013a).

Manoma, kad L-A buvimą ląstelėje palaikantys genai nėra atsitiktinis rinkinys. Remiantis naujausiais genų ontologijos analizės duomenimis paaiškėjo, kad L-A viruso persistavimui naudingi genai siejami su mažų molekulių metabolizmo ir katabolizmo procesais. L-A kiekį ląstelėje ribojantys genai siejami su ląstelės ciklu, dalijimusi, nukleorūgščių bei RNR metabolizmu (Hsiao et al., 2025). Tačiau ląstelės ciklo, organelių pasidalijimo ir su mikrovamzdeliais siejamų procesų įtraukimas nereiškia, kad virusas tiesiogiai jungiasi prie dalijimosi verpstės ar mikrovamzdelių. Labiau tikėtina, kad šie procesai turi įtakos viruso kopijų pasiskirstymui dukterinėse ląstelėse, veikdami persitvarkymo mechanizmus arba netiesiogiai keičiant sąlygas virusinių dalelių išlaikymui ląstelėje (Hsiao et al., 2025; Lukša et al., 2022; Schmidt et al., 2024).

2025 m. transkriptomines analizės rezultatai parodė, kad *S. cerevisiae* kamienai su L-A virusu keičia šeiminkės transkriptų profilį, pokyčiai nėra labai dideli, tačiau atspindi viruso ilgalaikio prisitaikymą (Hsiao et al., 2025). Didelė dalis genų yra susijusi su atsaku į aplinkos stresą, o su tuo siejamas genų raiškos pokytis siekia apie keturis kartus. Stebint augimą streso sąlygomis kamienai, turintys L-A virusą, pasižymi 1,4-3,5 karto geresniu konkurenciniu pranašumu, lyginant su kamienais be L-A. Tačiau esant per mažam gliukozės trūkumui šis fenomenas prarandamas. Taigi L-A *S. cerevisiae* ląstelėms sukelia nedidelius, bet sistemiškai naudingus genų raiškos pokyčius (Hsiao et al., 2025; McBride et al., 2013; Ravoitytė et al., 2022).

Nagrinėjant *S. cerevisiae* L-A-lus pagalbinio viruso ir M-lus palydovo poveikį atskirai, pastebėta, kad pašalinus M-2 palydovą diferencijuotai įvyksta 486 genų raiška, o eliminavus abiejų tipų virusus (L-A-lus ir M2) genų raiškos profilis prasiplečia iki 715 genų. Abiem atvejais dauguma pokyčių yra vidutinio dydžio (ne daugiau nei keturi kartai). Eliminavus M2 padidėja genų raiška susijusi su RNR procesais: ribosomų biogenezė ir susirinkimu, rRNR, ncRNR (angl. *non-coding RNR*), tRNR metabolizmu, RNR 5' galo brendimu, GMP biosinteze, nukleozidų pernaudojimu (angl. *nucleoside*

salvage), taip pat RNR helikazių, nuo RNR priklausomų ATPazių, metiltransferazių ir RNR polimerazių I ir III komponentų raiška. Tai parodo, kad M palydovas šeiminkės ląstelėje reikalauja didelių RNR metabolizmo ir ribosomų biogenezės resursų, o jo pašalinimas leidžia persiorientuoti į branduolėlio ir preribosominių procesų aktyvinimą (Lukša et al., 2017; Ravoitytė et al., 2022).

Sumažėjusios raiškos genai po M2 pašalinimo daugiausiai susiję su energijos gamyba, mitochondrijų funkcijomis, lipidų biosinteze ir amino rūgščių sintezės keliais. Taip pat neigiamai paveikiama genų raiška susijusi su elektronų pernašos grandinės, ląstelinio kvėpavimo, sterolių metabolizmo, sulfatų asimiliacijos, sieros aminorūgščių biosintezės, acetyl-CoA ir acil-CoA metabolizmo keliais. Pastebimas ryškus mitochondrijų kvėpavimo grandinės, citochromo komplekso, mitochondrijų apvalkalo ir III-IV kvėpavimo kompleksų komponentų genų raiškos sumažėjimas. Tai leidžia interpretuoti, kad M2 palydovo išlaikymas yra metaboliškai brangus, ypač mitochondrijų kvėpavimo, sieros apykaitos ir lipidų biosintezės kelių požiūriu. M palydovo daroma įtaka neapsiriboja tik biocidinėje sistemoje, M palydovas galimai yra reikšmingas energetinių ir anabolinių resursų „vartotojas“ (Lukša et al., 2017).

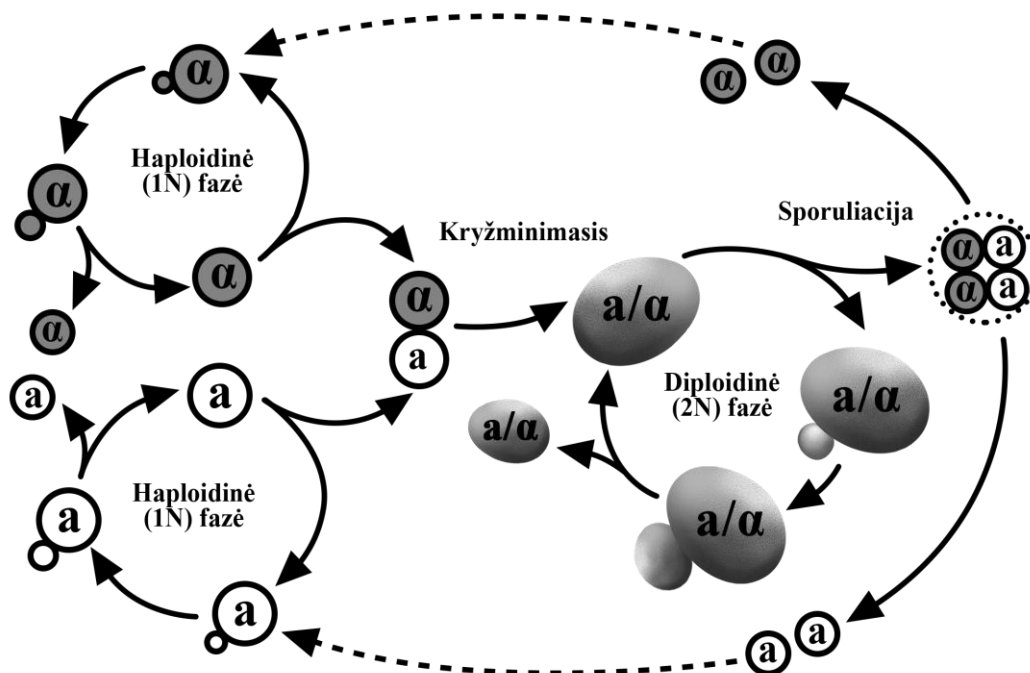
Eliminavus ir L-A-lus ir M2 bendras paveiktų procesų spektras išlieka panašus, tačiau atsakas tampa platesnis ir labiau orientuotas į oksidacinį stresą, ląstelės sienelės persitvarkymą ir aminorūgščių biosintezės slopinimą. Net 50 iš 291 susijusių genų iki šiol nėra charakterizuoti, o iš žinomų kategorijų siejama su: atsaku į oksidacinį stresą, oksidacijos-redukcijos procesais, angliavandenių metabolismu ir UDP-N-acetilgliukozamino metabolismu, kurie asocijuojamai su ląstelės sienelės biogeneze (chitino, GPI inkarų ir manoproteinų sinteze) (Lukša et al., 2017).

Daugiau nei 50 % visų L-A-lus ir M2 palydovo neigiamai reguliuojamų procesų persidengia su tais, kurie buvo stebimi pašalinus tik M-2, tačiau išskirtinai aminorūgščių biosintezės slopinimas tampa dar ryškesnis, ypač arginino, histidino, leucino ir lizino keliuose. Iš to galima daryti išvadą, kad L-A-lus papildomai palaiko ir anabolinę aminorūgščių biosintezę reikalingą būseną (Lukša et al., 2017).

1.2.5. *S. cerevisiae* ląstelės ciklo įtaka totivirusų plitimui

S. cerevisiae gali egzistuoti tiek haploidinėje tiek diploidinėje būsenoje (**Pav. 1.5**). Nelytiniame cikle haploidinės MATa ir MAT α ląstelės vegetatyviai dauginasi pumpuravimosi būdu. *S. cerevisiae* lytinis ciklas prasideda tada, kai priešingų poravimosi tipų haploidinės MATa ir MAT α ląstelės atpažįsta feromonus: MATa per receptorių Ste2 atpažįsta α -veiksni, o MAT α per Ste3 atpažįsta a-veiksni. Feromonų signalas aktyvina MAP kinazių kelią, kuriame svarbūs Ste5, Ste11, Ste7, Fus3/Kss1 baltymai. Vienas svarbiausių šio atsako taikinių yra Far1, kuris sustabdo ląstelės ciklą G1 fazėje ir nukreipia ląstelę nuo vegetatyvinio augimo į poravimosi kelią. Toliau aktyvuojamas Cdc42/Cdc24/Far1 poliarizacijos kompleksas, įvyksta chemotropinis poliarizuotas augimas partnerio

link, susilieja ląstelių plazminės membranos ir citoplazmos, o vėliau įvyksta branduolių susiliejimas (kariogamija), taip susidaro MATa/MAT α diploidas (**Pav. 1.5**) (Sieber et al., 2023).



Pav. 1.5 *S. cerevisiae* gyvenimo ciklas. Haploidinės mielių ląstelės būna dviejų tipų: a ir α . Haploidinės ląstelės dalijasi nelytiniu būdu (1N haploidinė fazė). Kai susitinka priešingų poravimosi tipų (a ir α) ląstelės, įvyksta kryžminimasis ir susidaro diploidinė a/α ląstelė. Diploidinė ląstelė taip pat dalijasi pumpuruodama (2N diploidinė fazė). Esant maisto medžiagų trūkumui, diploidinėse ląstelėse įvyksta mejozė ir pereinama į sporuliacijos fazę. Sporuliacijos metu susidaro 4 haploidinės sporos, kurios grįžta į nelytinį ciklą (Wang et al., 2017).

Mejozė indukuojama esant azoto ir anglies šaltinio trūkumui. Reaguodami į šiuos metabolinius signalus MATa/MAT α diploidinėse ląstelėse susidaro keturi haploidiniai chromosomų rinkiniai, kurie vėliau integruojami į sporas. Sporos formuojasi, kai nuo SPB susidaro išorinė plokštelė, prie kurios inicijuojama prosperinė membrana. Šiai membranai augti nukreipiamos vėlyvojo goldžio sekrecinės pūslelės, todėl sporuliacijos metu sekretinis kelias perorganizuojamas iš vegetatyvinės sekrecijos į naujų sporų formavimą. Membranai plečiantis, apgaubiamą po vieną haploidinį branduolį kartu su dalimi citoplazmos. Į besiformuojančias sporas patenka dalis motininės ląstelės citoplazmos ir organelių. Uždarius prosperinę membraną, aplinkui formuojama sporos sienelė, sudaryta iš specializuotų sluoksnių: manano, β -gliukano, chitino ir ditirozino. Susidaro askas su keturiomis askosporomis, dažniausiai dvi a ir dvi α tipo (Durant et al., 2024; Neiman, 2011). Sporuliacijos metu dalis motininės ląstelės struktūrų yra suardoma – įvyksta programuota ląstelės mirtis (Gao et al., 2019).

Diploidinėje būsenoje virusai gali būti perduodami poravimosi metu, nes susiliejus ląstelėms susimaišo citoplazma. Taip pat po mejozės virusinės dalelės gali patekti į sporas kartu su citoplazma (T. Fujimura et al., 1986; Park et al., 2012; Schmitt et al., 2002b) Tyrimai parodė, kad mielės turinčios

dgRNR L-A ir M palydovinius virusus, gali pasižymėti didesniu sporuliacijos efektyvumu (Travers Cook et al., 2022). Sporuliacijos metu aktyvuojamas mitochondrinės EndoG homologas Nuc1, kuris kartu su SKI kompleksu prisideda prie meiotinio virusų slopinimo. Tyrimas parodė kad išjungus *NUC1* ir *SKI3* genus, pradeda kauptis M palydovų kilmės toksinai, kurių perteklius slopina gyvybingumą (Gao et al., 2019). Šie duomenys leidžia teigti, kad totivirusai gali būti priklausomi ir nuo ląstelės ciklo.

1.3. Virusinių baltymų lokalizacijos veiksniai *S. cerevisiae*

1.3.1. *S. cerevisiae* virusologijoje

Saccharomyces cerevisiae yra vienas plačiausiai naudojamų mikroorganizmų tiek pramonėje, tiek fundamentiniuose tyrimuose. Dėl gerai ištirto genomo ir palyginti paprastos eukariotinės ląstelės sandaros *S. cerevisiae* tampa vertinga sistema įvairiems viduląsteliniams procesams nagrinėti. Šio organizmo pritaikomumą dar labiau išplečia kompaktiškas genomas, didelio našumo genetinės bibliotekos ir pažangūs genetinių modifikacijų metodai (Sahaya Glingston et al., 2021).

S. cerevisiae genome koduojama apie 6000 genų, kurie buvo pilnai nusekvenuoti iki 1996 m. Daugiau nei 60 % genų funkcijos yra žinomos. 40 % ištirtų genų yra konservatyvūs tarp aukštesniųjų eukariotų. Dėl didelės dalies konservatyvių biocheminių kelių, *S. cerevisiae* yra plačiai taikoma virusologiniuose tyrimuose (Galao et al., 2007; Goffeau et al., 1996; Parsons et al., 2003). Mielėse galima nustatyti virusų lokalizaciją ir sąveiką su ląstelėmis šeimininkėmis (**Lentelė 1.1**) (Alves-Rodrigues et al., 2006; Sahaya Glingston et al., 2021). Pasitelkiant *S. cerevisiae* ir heterologines virusų sistemas galima identifikuoti genomo sritis, virusinės kilmės baltymus, svarbius viruso replikacijai, sąveikai su viduląsteliniais komponentais taip pat nustatyti šiuos procesus reguliuojančius veiksnius. (Sahaya Glingston et al., 2021; R. Y. Zhao, 2017).

Lentelė 1.1 Virusų ląstelės šeimininkės sąveikos ir lokalizacijos determinančių tyrimai atlikti *S. cerevisiae* (Sahaya Glingston et al., 2021; R. Y. Zhao, 2017)

Pavadinimas	Šeima	Genomas	Šeimininkai
BMV (Brome mosaic virus)	<i>Bromoviridae</i>	(+)vgRNA	Augalai
CIRV (Carnation Italian ringspot virus)	<i>Tombusviridae</i>	(+)vgRNA	Augalai
CNV (Cucumber necrosis virus)	<i>Tombusviridae</i>	(+)vgRNA	Augalai
CymRSV (Cymbidium ringspot virus)	<i>Tombusviridae</i>	(+)vgRNA	Augalai
FHV (Flock house virus)	<i>Nodaviridae</i>	(+)vgRNA	Vabzdžiai
HCV (Hepatitis C virus)	<i>Flaviviridae</i>	(+)vgRNA	Žmonės
HIV-1 (Human immunodeficiency virus)	<i>Retroviridae</i>	Dimerinė (+)vgRNA	Žmonės
Influenza A (Influenza A virus)	<i>Orthomyxoviridae</i>	(-)vgRNA	Paukščiai, žinduoliai
SYNV (Sonchus yellow net nucleorhabdovirus)	<i>Rhabdoviridae</i>	(-)vgRNA	Augalai
TBSV (Tomato bushy stunt virus)	<i>Tombusviridae</i>	(+)vgRNA	Augalai
Adenovirus	<i>Adenoviridae</i>	Linijinė DNR	Stuburiniai
ASFV (African swine fever virus)	<i>Asfarviridae</i>	Linijinė DNR	Kiaulės, šernai, erkės
BPV (Bovine papilloma virus)	<i>Papillomaviridae</i>	Žiedinė DNR	Galvijai
HBV (Hepatitis B virus)	<i>Hepadnaviridae</i>	Žiedinė DNR	Žmonės
HPV (Human papilloma virus)	<i>Papillomaviridae</i>	Žiedinė DNR	Žmonės
APMV (Acanthamoeba polyphaga mimivirus)	<i>Mimiviridae</i>	Linijinė DNR	Amebos
MpyV (Mouse Polyomavirus)	<i>Polyomaviridae</i>	Žiedinė DNR	Žinduoliai, paukščiai, žuvys

1.3.2. dgRNR virusų lokalizacija

Virusų translokacija ląstelėje yra vienas iš veiksnių lemiančių sėkmingą viruso išlaikymą ląstelėje. Virusiniai baltymai arba RNR-baltymų kompleksai nukreipiami į specifines ląstelės struktūras, kuriose gali vykti genomo replikacija, transkripcija, RNR pakavimas, kapsidžių formavimasis, sąveika su šeimininko gynybinėmis sistemomis. Lokalizaciją gali lemti tokie veiksniai kaip: trumpi

aminorūgščių sekos motyvai, potransliacinės modifikacijos, įvairūs baltymų struktūriniai domenai, baltymų oligomerizacija, RNR jungimosi sritys ir sąveika su ląstelės šeimininkės viduląsteliniiais komponentais.

HIV-1 atveju bazinių aminorūgščių turintys regionai tarp dviejų cinko pirštų motyvų yra svarbūs efektyviai lokalizacijai branduolyje arba branduolėlyje. HIV-1 Gag -MA domenas reguliuoja Gag prisijungimą prie plazminės membranos, CA ir NC domenai prisideda prie Gag multimerizacijos, o NC domenas tiesiogiai jungiasi su virusinės RNR pakavimo seka ir dalyvauja genomo pakavime į virusinę dalelę (Yu et al., 2016).

RSV Gag baltymas yra vienas geriausiai aprašytų branduolio importo ir eksporto pernašos pavyzdžių. Šis baltymas turi branduolio importo signalus (Lys/Arg turtingą NLS sritį) ir nuo CRM1 priklausomą branduolio eksporto signalą. RSV Gag baltymas gali trumpam patekti į branduolį, sąveikauti su virusine RNR ir vėl grįžti į citoplazmą, kur vyksta virusinių dalelių susirinkimas. Tai parodo, kad Gag tipo baltymai gali turėti daugiafunkcinius regionus, kurie vienu metu lemia RNR prisijungimą, multimerizaciją, kapsidės susiformavimą, genomo įpakavimą ir viduląstelinę organizaciją (Scheifele et al., 2002).

1.3.3. Totivirusų lokalizacija *S. cerevisiae*

Endogeninių virusų kopijų skaičius yra nedidelis, todėl juos tirti yra sudėtinga (Schmidt et al., 2024). Iki šiol buvo manoma, kad L-A ir L-BC persistuoja citoplazmoje. Tiksliai padėtis ląstelėje, ryšys su organelėmis ar makromolekuliniiais kompleksais iki šiol nėra žinomas (Grybchuk et al., 2022a).

Naujausi tyrimai susiję su L-A viduląsteline organizacija patvirtino, kad L-A virusai nėra atsitiktinai pasklidę citoplazmoje. Remiantis cryo-EM duomenimis pastebėta, kad L-A sistemingai aptinkami mažose grupėse po 12 ± 4 virionus, TEM analizė nustatė didesnes grupes po 16 ± 10 virusinių dalelių. Taip pat pastebėta, kad šie virusai kolokalizuoja su transliacijos mechanizmo komponentais – iRNR, ribosomų sankaupomis ir neidentifikuotais baltymais. Tokios sankaupos yra būdingos daugeliui kitų tipų virusų (įskaitant egzogeninius) ir dažnai siejamos su membraniniais kompartmentais arba citoskeleto komponentais pvz.: goldžio aparatu arba aktino filamentais. Kol kas aiškus ryšys tarp L-A viruso, membraninių sistemų arba citoskeleto nėra žinomas. Manoma, kad L-A virusai sudarydami tokias grupes tarp ribosomų izoliuojasi nuo viduląstelinės aplinkos, tokia lokalizacija galimai padeda išvengti degradacijos (Schmidt et al., 2024).

Kadangi L-A ir M palydovų buvimas sistemingai keičia su branduolėliu, ribosomomis, mitochondrijų kvėpavimo aparatu, ląstelės sienelės biogeneze, RNR metabolizmu, ląstelės ciklu ir streso atsaku susijusių genų raišką, tai gali tapti užuomina ieškant veiksnių lemiančių totivirusų lokalizaciją. (Hsiao et al., 2025; McBride et al., 2013; Ravoitytė et al., 2022).

1.4. *S. cerevisiae* baltymų lokalizacijos veiksniai

1.4.1. Branduolio lokalizacijos veiksniai *S. cerevisiae*

Didesniems baltymams arba baltymų kompleksams paprastai reikalingi aktyvios pernašos mechanizmai. *S. cerevisiae* branduolio porų kompleksai sudaryti iš nukleoporinų, o fenilalanino ir glicino pasikartojimus turintys nukleoporinai yra selektyvūs barjerai, per kuriuos pernešamos su karioferinais surištos molekulės (Dekker et al., 2025; Kozai et al., 2025). Į branduolį baltymai dažniausiai nukreipiami lokalizacijos signalais – NLS (angl. Nuclear Localisation Signal, NLS) kuriems būdingos trumpos bazinės sritys iš lizino ir arginino pvz.: K-K/R-K/R, K-R-R, R-K-R. Klasikiniai NLS gali būti sudaryti iš vieno arba dviejų amino rūgščių klasterių. Esant dviems klasteriams su 10–12 a.r. tarpu bazinės sritis atpažįsta importinas α Kap60/Srp1 (Breckel et al., 2024; Budenholzer et al., 2020). α Kap60/Srp1 atpažįsta NLS, β Kap95 sąveikauja su FG nukleoporinais ir perneša baltymą per porą į branduolio vidų (Breckel et al., 2024; Dekker et al., 2025). Branduolyje Ran-GTP (Gsp1-GTP mielėse) prisijungia prie importino ir paskatina baltymo atsirišimą. Ne visi *S. cerevisiae* baltymai naudoja Kap60/Kap95 kelią, dalis importuojami tiesiogiai β -karioferinų, be α jungties (Breckel et al., 2024; Stochaj, 2023; Wendler et al., 2019). Vienas iš alternatyvių kelių – Pse1/Kap121 kelias. Pavyzdžiui *S. cerevisiae* transkripcijos faktorius Pho4 patenka į branduolį per Pse1/Kap121. Fosforilinimas reguliuoja jo sąveiką su šiuo importinu pvz.: esant fosfato trūkumui citoplazmoje Pho4 kaupiasi branduolyje, o fosfato perteklius lemia Pho4 lokalizaciją citoplazmoje. Tai parodo, kad baltymo pernašai svarbūs neigiamai reguliuojantys fosforilinimo taikiniai, nes jie gali užmaskuoti arba susilpninti importino prisijungimą (Fung et al., 2025; Kaffman et al., 1998). Kitas alternatyvus kelias yra nuo Mtr10 priklausomas importas. Mtr10 importuoja iRNR surišantį baltymą Npl3, kuris neturi NLS signalo, bet turi arginino/glicino sritį ir trumpą C-galinę seką. RGG, RG, GAR amino rūgščių motyvai būdingi iRNR surišantiems baltymams (Chowdhury et al., 2023; Querl et al., 2024). Dar vienas retesnis importo būdas – PY-NLS, kuris atpažįsta Kap104 (mielių transportino tipo karioferiną). Šiam signalui būdingas C-galinis R/H/K-X2-5-PY motyvas, o prieš jį dažnai būna bazinių, hidrofobinių aminorūgščių (Lange et al., 2008).

Pernašą į branduolį gali lemti ir „piggyback“ mechanizmas, šiuo atveju baltymas prisijungia prie kito baltymo, kuris turi stiprų NLS ir importuojamas kartu į branduolį. Tokiai sąveikai svarbūs baltymų sąveikos domenai: superspiralė, leucino užtrauktukai, RING/PHD pirštai, cinko pirštai, spiralės-kilpos-spiralės domenai arba nukleorūgščių surišimo domenai (Breckel et al., 2024).

Branduolio lokalizaciją gali reguliuoti ir SUMOilinimas ir ubikvitilininimas, tačiau šios modifikacijos nėra laikomos universaliais branduolio importo signalais. SUMOilinimas veikia dažniau kaip

branduolio kompleksų stabilumo, reparacijos, chromatino sąveikų reguliatorius. SUMO taikiniai dažnai turi ψ KxE tipo motyvą, kur ψ – hidrofobinė a.r., K – modifikuotas lizinas, x – bet kuri a.r., E – glutamatas (Cheng et al., 2006; Franić et al., 2021; Kumar et al., 2024).

1.4.2. Endoplazminio tinklo lokalizacijos veiksniai *S. cerevisiae*

Į endoplazminį tinklą (ET) baltymai nukreipiami hidrofobinėmis signalinėmis sekomis, transmembraniniais segmentais ir C-galiniais membraniniais inkarais (Aviram et al., 2016; Merkaš et al., 2025; Ng et al., 1996; Young et al., 2001). N-galinės sekos paprastai turi teigiamai įkrautą N-sritį, hidrofobinę sritį ir signalinės peptidazės atpažįstamą C-sritį. Patekus į ET sekos hidrolizuojamos. Hidrofobinę sritį atpažįsta SRP (angl. *Signal Recognition Particle*) baltymas, kuris kotransliacijos metu nukreipia ribosomos-peptido kompleksą prie Sec61 translokono. Kita dalis baltymų į ET patenka po transliacijos per Sec62/Sec63 kompleksą. Šiuo atveju šaperonai nukreipia baltymą translokacijai, ET translokaciją paskatina Kar2/BiP (Merkaš et al., 2025; Ng et al., 1996; Young et al., 2001). Lygegriaciai SRP, mielėse taip pat veikia alternatyvus SND (angl. *SRP-independent targeting pathway*) kelias, kuriame dalyvauja Snd1, Snd2, Snd3 (Aviram et al., 2016). Taip pat egzistuoja GET (angl. *Guided Entry of Tail-anchored proteins*) keliai, kurie į ET membraną įterpia C-galinį transmembraninį segmentą turinčius inkarinius baltymus per Sgt2-Get3-Get1/Get2 sistemą. Tirpiems baltymams būdingas HDEL motyvas, kurį atpažįsta Erd2, o ET membranos baltymų citoplazminėse uodegose dažni KKXX arba KKKXX tipo motyvai, lemiantys iš Goldžio aparato grįžimą į ET (Gaynor et al., 1994; Townsley et al., 1994; Zhang et al., 2016).

1.4.3. Mitochondrijų lokalizacijos veiksniai *S. cerevisiae*

Į mitochondrijas *S. cerevisiae* baltymai dažniausiai nukreipiami N-galinės pre-sekos. Paprastai ši seka yra 10-120 a.r. ilgio, teigiamai įkrauta ir linkusi sudaryti amfipatinę α -spirale (Boob et al., 2025). Dauguma pre-sekų turinčių baltymų pirmiausia atpažįstami išorinės membranos TOM komplekso ir vėliau per TIM23 kompleksą nukreipiami į mitochondrijų matriksą. Šiam importui svarbus vidinės membranos elektrocheminis potencialas ir motoriniai importo baltymai. Taip pat su importu siejami vidiniai amino rūgščių sekos hidrofobiniai signalai. Tokiu atveju citoplazminiai baltymai yra importuojami per TOM-mažųjų ir TIM22 baltymų kompleksus (Gomkale et al., 2020, 2021). Tarp-membraninėse erdvėse esantiems baltymams dažnai būdingi konservatyvūs cisteinų motyvai, tokie baltymai importuojami per MIA (angl. *mitochondrial intermembrane space import and assembly pathway*) kelią, kur importas siejamas su oksidaciniu baltymo susilankstymu (Mordas et al., 2015).

1.4.4. Viduląstelinio transporto veiksniai *S. cerevisiae*

S. cerevisiae ląstelės baltymų transportą gali lemti sąveika su citoskeleto komponentais, SPB ir motoriniais baltymais. SPB (angl. *spindle pole body*) yra dalijimosi verpstės kūnelis ir pagrindinis

mikrovamzdelių organizavimo centras, kuris yra įterptas į branduolio apvalkalą. SPB sudarytas iš struktūrinių baltymų pvz.: Spc42, Spc29, Spc110, Spc72 ir γ -tubulino komplekso komponentų (Viswanath et al., 2017). Su mikrovamzdeliais susijusių baltymų pasiskirstymą gali lemti su mikrovamzdeliais sąveikaujantčios susisukusių α -spiralių struktūros (angl. *coiled-coil*), +TIP (angl. plus-end tracking proteins), motoriniai baltymai arba oligomerizacija. Mielėse svarbi Bim1-Kar9-Myo2 sistema, Bim1 jungiasi su mikrovamzdelių (+) galais, Kar9 veikia kaip jungtis, Myo2 padeda orientuoti vamzdelius į mitotinę verpstę (Horák, 1991; Hwang et al., 2003; Manatschal et al., 2016).

1.4.5. Baltymų degradacijos veiksniai *S. cerevisiae*

S. cerevisiae baltymų stabilumą reguliuoja dvi pagrindinės degradacijos sistemos: ubikvitino ir proteosomos arba autofagijos. Pažeisti, neteisingai susilankstę baltymai dažnai pažymimi ubikvitinu per E1-E2-E3 fermentų kaskadą ir nukreipiami į 26S proteosomą. ET arba branduolio membranose esančios kokybės kontrolės E3 ligazės (Doa10 ir Hrd1) atpažįsta hidrofobines arba neteisingai sulankstytas sekas ir skatina substratų ubikvitilinimą bei degradaciją proteosomomis (Finley et al., 2012). Didesni baltymų kompleksai, agregatai, organelės gali būti šalinami makroautofagijos kelyje.

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

Reagentai ir gamintojai

Carl Roth: acto rūgštis, D-gliukozė, etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA), etidžio bromidas (EtBr), izopropanolis (IPA), kalio acetatas (KAc), ličio acetatas (LiAc), magnio chloridas (MgCl_2), dinatrio vandenilio fosfatas (Na_2HPO_4), PEG-4000, Tris-HCl, cinko acetatas (ZnAc), mielių azoto bazė (YNB), paraformaldehidas (PFA), natrio acetatas (NaAc), kalio hidroksidas (KCl)

Liofilchem: agaras, bakteriologinis peptonas, mielių ekstraktas

Merck: druskos rūgštis (HCl), kalcio chloridas (CaCl_2), etanolis, kalio divandenilio fosfatas (KH_2PO_4), chloroformas (CHCl_3), natrio hidroksidas (NaOH), natrio chloridas (NaCl)

Sigma-Aldrich: agarozė, dimetilsulfoksidas (DMSO), ampicilinas, geneticinas (G418), konkanavalinas A (ConA)

Thermo Fisher Scientific: DAPI, Hoechst 33342, ProLong Diamond Antifade Mountant

2.1.2. Tirpalai

Naudoti tirpalai aprašyti **Lentelė 2. 1.**

Lentelė 2. 1 Tirpalai ir jų paskirtis

Pavadinimas	Cheminė sudėtis	pH	Paskirtis
„Natrio tirpalas“	5 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2	pH = 8,0	<i>E. coli</i> kompetentinių ląstelių paruošimas
„Kalcio tirpalas“	5 mM Tris-HCl, 100 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2	pH = 8,0	
1 × TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA	pH = 7,5	<i>S. cerevisiae</i> kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija
1 × LiAc/0,5x TE	100 mM LiAc, 5 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA	pH = 7,5	
1 × LiAc/1x TE/PEG	100 mM LiAc, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 40 % PEG-4000	pH = 7,5	
1 × TAE	40 mM Tris, 40 mM acto rūgštis, 1 mM EDTA	pH = 8,5	DNR elektroforezė agaroziniame gelyje

Etidžio bromidas	0,5 µg/ml EtBr	-	
2 × TE	20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA	pH = 7,5	Plazmidinio vektoriaus išskyrimas iš <i>E. coli</i> ląstelių su chloroformu
„Lizės buferinis tirpalas“	100 mM NaOH, 1 % SDS	-	
NaAc	3 M NaAc	pH = 7,0	
Izopropanolis	100 % izopropanolis	-	
Chloroformas	100 % chloroformas	-	
Etanolis	75 % etanolis	-	
1x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄	pH = 7,4	<i>S. cerevisiae</i> fiksuotų mėginių paruošimas
PFA	3,7 % Paraformaldehidas, 1x PBS	pH = 7,4	
Konkanavalinas A	2,5 % ConA	-	
Hoechst 33342	0,5 µg/ml Hoechst 33342, 1 × PBS	-	
DAPI	0,5 µg/ml DAPI, 1x PBS	-	

2.1.3. Augimo terpės

Naudotos *Escherichia coli* ir *S. cerevisiae* auginimo terpės parodytos **Lentelė 2.2-2.3.**

Lentelė 2.2 *E. coli* augimo terpės

Pavadinimas	Cheminė sudėtis	Komentarai
LB	1 % bakteriologinis peptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 1 % NaCl	Ruošiant agarizuotą terpę naudojamas 2 % agaras

Lentelė 2.3 *S. cerevisiae* augimo terpės

Pavadinimas	Cheminė sudėtis	
YPD	1% mielių ekstraktas, 2% bakteriologinis peptonas, 2% gliukozė (sterilinama atskirai)	Ruošiant agarizuotą terpę naudojamas 2 % agaras, sterilinamas atskirai.

SD	60 µg/ml metionino, 120 µg/ml leucino, 20 µg/ml histidino, 240 µg/ml lizino, 20 µg/ml uracilo, 4 mg/ml adenino, 6,7 % YNB (sterilinama atskirai), 2 % gliukozė (sterilinama atskirai)	Ruošiant agarizuotą terpę naudojamas 2 % agaras, sterilinamas atskirai. Ruošiant agarozės „pagalvėlę“ mikroskopavimui naudojama 1 % agarozės
GNA	1% mielių ekstraktas, 3% bakteriologinis peptonas, 5% gliukozė (sterilinama atskirai)	Ruošiant agarizuotą terpę naudojamas 2 % agaras, sterilinamas atskirai.
„Sporuliacijos terpė“	0,005 % ZnAc, 1% KAc	Ruošiant agarozės „pagalvėlę“ mikroskopavimui naudojama 1 % agarozės

2.1.4. Fermentai ir molekulinės biologijos rinkiniai

FastDigest restrikcijos endonukleazės (NotI, AatII, SdaI, XbaI, XhoI, Ecl136II), Phusion Plus, šarminė fosfatazė FastAP, T4 DNR ligazė, 10 mM ATP, 50 % PEG, 10 × B Buffer, 10 × Fast Digest Buffer, 10 mM dNTP, DNR dydžio standartas GeneRuler Ladder Mix, Gel Loading Dye (6×). Įsigyta iš „Thermo Fisher Scientific“ ir naudota laikantis gamintojo rekomendacijų.

GeneJet Miniprep Kit, GeneJet Gel Extraction Kit įsigyta iš „Thermo Fisher Scientific“ ir naudota laikantis gamintojo rekomendacijų.

2.1.5. Bakterijų ir mielių kamienai

Naudoti *Escherichia coli* ir *S. cerevisiae* kamienai aprašyti **Lentelėse 2.4-2.5**.

Lentelė 2.5 *E. coli* kamienas su nuorodomis

Kamieno pavadinimas	Genotipas	Nuoroda
DH10B	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS- mcrBC)</i> <i>Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR</i> <i>Δ(ara,leu)7697 araD139 gal U galK nupG</i> <i>rpsL λ-</i>	(Durfee et al., 2008)

Lentelė 2.6 *S. cerevisiae* kamienai su nuorodomis

Kamieno pavadinimas	Genotipas	Nuoroda
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> , <i>ScV-LA-1</i> , <i>ScV-L-BC-1</i>	(Brachmann et al., 1998)
BY4742	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> , <i>ScV-LA-1</i> , <i>ScV-L-BC-1</i>	(Brachmann et al., 1998)
BY4741 ΔLA ΔLBC	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>ScV-LA-0</i> , <i>ScV-L-BC-0</i>	Iš bendros laboratorijos kolekcijos
BY4742 ΔLA ΔLBC	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>ScV-LA-0</i> , <i>ScV-L-BC-0</i>	Iš bendros laboratorijos kolekcijos
DBY4975 ΔM ΔLA ΔLBC	MATα <i>ade 2 his3-200 leu2-3-112 lys2-801 ura3-52 gal</i> <i>ScV-M-0</i> , <i>ScV-LA-0</i> , <i>ScV-L-BC-0</i>	Iš bendros laboratorijos kolekcijos
DBY4975	MATα <i>ade 2 his3-200 leu2-3-112 lys2-801 ura3-52 gal</i> <i>ScV-M-1</i> , <i>ScV-LA-1</i> , <i>ScV-L-BC-1</i>	(Elena Servienė, nepublikuota)
BY4741 (HTA2+mCherry)	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> , <i>HTA2+GFP::his3</i> , <i>ScV-LA-1</i> , <i>ScV-L-BC-1</i>	Iš bendros laboratorijos kolekcijos
BY4741 ΔLA ΔLBC (HTA2+mCherry)	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> , <i>HTA2+mCherry::his3</i> , <i>ScV-LA-0</i> , <i>ScV-L-BC-0</i>	Šis darbas
BY4742 (HTA2+mCherry)	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> , <i>HTA2+mCherry::his3</i> , <i>ScV-LA-1</i> , <i>ScV-L-BC-1</i>	Šis darbas
BY4742 ΔLA ΔLBC (HTA2+mCherry)	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> , <i>HTA2+mCherry::his3</i> , <i>ScV-LA-0</i> , <i>ScV-L-BC-0</i>	Šis darbas
BY4743 (HTA2+mCherry)	MATa/α <i>his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0</i> , <i>HTA2+mCherry::his3</i> , <i>ScV-LA-1</i> , <i>ScV-L-BC</i>	Šis darbas
BY4743 ΔLA ΔLBC (HTA2+mCherry)	MATa/α <i>his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0</i> , <i>HTA2+mCherry::his3</i> <i>ScV-LA-0</i> , <i>ScV-L-BC-0</i>	Šis darbas
BY4741 (Rpc19+RFP)	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> , <i>Rpc19+RFP</i> , <i>ScV-LA-1</i> , <i>ScV-L-BC-1</i>	Šis darbas
BY4741 (Spc42+RFP)	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> , <i>Spc42+RFP</i> , <i>ScV-LA-1</i> , <i>ScV-L-BC-1</i>	Šis darbas
BY4741 (Tub1+RFP)	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> , <i>Tub1+RFP</i> , <i>ScV-LA-1</i> , <i>ScV-L-BC-1</i>	Šis darbas
BY4741 (Scs2tmh+RFP)	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> , <i>Scs2tmh+RFP</i> , <i>ScV-LA-1</i> , <i>ScV-L-BC-1</i>	Šis darbas
BY4741 (Snf7+RFP)	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> , <i>Snf7+RFP</i> <i>ScV-LA-1</i> , <i>ScV-L-BC-1</i>	Šis darbas

2.1.6. Plazmidinės DNR

Naudotos plazmidinės DNR **Lentelė 2. 7.**

Lentelė 2. 7 Plazmidinės DNR su nuorodomis

Plazmidinė DNR	Aprašymas	Nuoroda
pYM44-mCherry	Plazmidinis vektorius koduojantis mCherry baltymą. <i>pAgTEF1</i> promotorius, mCherry, <i>ADHI</i> terminacijos sritis. Atrankos žymenys: <i>AmpR</i> žymo <i>E. coli</i> , <i>SpHIS5</i> žymuo mielėms. <i>E. coli ori</i> replikacijos pradžios seka.	Iš bendros laboratorijos kolekcijos
pYAK3-K7-gag+msGFP2	Plazmidinis vektorius, koduojantis ScV-LA viruso Gag baltymą, kurio C-gale prilietas fluorescensinis GFP baltymas. <i>PTEF1</i> promotorius, <i>gag+GFP</i> , <i>TCYCI</i> terminacijos sritis. Atrankos žymenys: <i>AmpR</i> , <i>URA3</i> . <i>pUC ori</i> ir <i>2μ ori</i> replikacijos pradžios sekos.	Iš bendros laboratorijos kolekcijos
pYAK3-LA-gag-CFS+GFP	Plazmidinis vektorius, koduojantis ScV-LA viruso Gag baltymą su C-gale esančia ribosominio rėmelio poslinkio sritimi (CFS), GFP fluorescensinis baltymas prijungtas už <i>STOP</i> kodono. <i>PTEF1</i> promotorius, <i>gag-CFS+GFP</i> , <i>TCYCI</i> terminacijos sritis. Atrankos žymenys: <i>AmpR</i> , <i>URA3</i> . <i>pUC ori</i> ir <i>2μ ori</i> replikacijos pradžios sekos.	Iš bendros laboratorijos kolekcijos
pYAK3-LBC-gag+mCherry	Plazmidinis vektorius, koduojantis ScV-LBC viruso Gag baltymą, kurio C-gale prilietas fluorescensinis mCherry baltymas. <i>PTEF1</i> promotorius, <i>gag+mCherry</i> , <i>TCYCI</i> terminacijos sritis. Atrankos žymenys: <i>AmpR</i> , <i>URA3</i> . <i>pUC ori</i> ir <i>2μ ori</i> replikacijos pradžios sekos.	Iš bendros laboratorijos kolekcijos
pYAK3-LBC-gag-CFS+mCherry	Plazmidinis vektorius, koduojantis ScV-LBC viruso Gag baltymą su C-gale esančia ribosominio rėmelio poslinkio sritimi (CFS), mCherry fluorescensinis baltymas prijungtas už <i>STOP</i> kodono. <i>PTEF1</i> promotorius, <i>gag-CFS+mCherry</i> , <i>TCYCI</i> terminacijos sritis. Atrankos žymenys: <i>AmpR</i> , <i>URA3</i> . <i>pUC ori</i> ir <i>2μ ori</i> replikacijos pradžios sekos.	Iš bendros laboratorijos kolekcijos
pYAK3-LBC+GFP	Plazmidinis vektorius, koduojantis ScV-LBC viruso Gag baltymą, kurio C-gale prilietas fluorescensinis GFP baltymas. <i>PTEF1</i> promotorius, <i>gag+GFP</i> , <i>TCYCI</i> terminacijos sritis. Atrankos žymenys: <i>AmpR</i> , <i>URA3</i> . <i>pUC ori</i> ir <i>2μ ori</i> replikacijos pradžios sekos.	Šis darbas
pYAK3-LBC-CFS+GFP	Plazmidinis vektorius, koduojantis ScV-LBC viruso Gag baltymą su C-gale esančia ribosominio rėmelio poslinkio sritimi (CFS), GFP fluorescensinis baltymas prijungtas už <i>STOP</i> kodono. <i>PTEF1</i> promotorius, <i>gag-CFS+GFP</i> , <i>TCYCI</i> terminacijos sritis. Atrankos žymenys: <i>AmpR</i> ,	Šis darbas

	<i>URA3. pUC ori</i> ir <i>2μ ori</i> replikacijos pradžios sekos.	
pBBK67	Donorinis plazmidinis vektorius skirtas CRISPR/Cas9 sistemai. Tarp HomL/HomR homologinių sričių koduojama integracinė kasetė: <i>RLP18B</i> promotorius, <i>RPC19-Link-Scarlet(RFP)</i> ir <i>SSA1</i> terminatorius. Kasetė skirta branduolėlio žymai <i>Rpc19+RFP</i> integruoti į <i>FF18</i> taikinį homologinės rekombinacijos būdu. Plazmidėje yra <i>AmpR</i> ir <i>E. coli ori</i> sekos.	(Bean et al., 2022)
pBBK69	Donorinis plazmidinis vektorius skirtas CRISPR/Cas9 sistemai. Tarp HomL/HomR homologinių sričių koduojama integracinė kasetė: <i>RLP18B</i> promotorius, <i>SPC42-Link-Scarlet(RFP)</i> ir <i>SSA1</i> terminatorius. Kasetė skirta SPB žymai <i>Spc42+RFP</i> integruoti į <i>FF18</i> taikinį homologinės rekombinacijos būdu. Plazmidėje yra <i>AmpR</i> ir <i>E. coli ori</i> sekos.	(Bean et al., 2022)
pBBK70	Donorinis plazmidinis vektorius skirtas CRISPR/Cas9 sistemai. Tarp HomL/HomR homologinių sričių koduojama integracinė kasetė: <i>RLP18B</i> promotorius, <i>TUB1-Link-Scarlet(RFP)</i> ir <i>SSA1</i> terminatorius. Kasetė skirta mikrovamzdelių žymai <i>Tub1+RFP</i> integruoti į <i>FF18</i> taikinį homologinės rekombinacijos būdu. Plazmidėje yra <i>AmpR</i> ir <i>E. coli ori</i> sekos.	(Bean et al., 2022)
pBBK78	Donorinis plazmidinis vektorius skirtas CRISPR/Cas9 sistemai. Tarp HomL/HomR homologinių sričių koduojama integracinė kasetė: <i>RLP18B</i> promotorius, <i>SCS2tmh-Link-Scarlet(RFP)</i> ir <i>SSA1</i> terminatorius. Kasetė skirta endoplazminio tinklo žymai <i>SCS2tmh+RFP</i> integruoti į <i>FF18</i> taikinį homologinės rekombinacijos būdu. Plazmidėje yra <i>AmpR</i> ir <i>E. coli ori</i> sekos.	(Bean et al., 2022)
pBBK82	Donorinis plazmidinis vektorius skirtas CRISPR/Cas9 sistemai. Tarp HomL/HomR homologinių sričių koduojama integracinė kasetė: <i>RLP18B</i> promotorius, <i>SNF7-Link-Scarlet(RFP)</i> ir <i>SSA1</i> terminatorius. Kasetė skirta goldžio komplekso/ESCRT-III žymai <i>Snf7+RFP</i> integruoti į <i>FF18</i> taikinį homologinės rekombinacijos būdu. Plazmidėje yra <i>AmpR</i> ir <i>E. coli ori</i> sekos.	(Bean et al., 2022)
pBBK11	pCAS plazmidinis vektorius. Koduoja SpCas9 ir gRNR. gRNR nukreipia Cas9 į FF18 taikinį chrXV chromosomoje, kur Cas9 įveda dvigrandį DNR trūkį, šis trūkis skatina donorinės HomL/HomL kasetės integraciją homologinės rekombinacijos būdu. Plazmidame vektoriuje yra koduojamas laikinas atrankos žymuo <i>SplitKanR</i> , naudojamas G418 atrankai mielėse ir <i>AmpR</i> atrankai <i>E. coli</i> .	(Bean et al., 2022)

2.1.7. Oligonukleotidai

Naudoti oligonukleotidai **Lentelė 2. 8.**

Lentelė 2. 8 Pradmenų 5'→3' sekos branduolio kompartmento žymėjimui *S. cerevisiae*.

Pavadinimas	Nukleotidų seka 5'→3'	Nuoroda
HF011	CTTGTTGCCAAAGAAGTCTGCCAA-GACTGCCAAAGCTTCTCAAGAACTGCG-TACGCTGCAGGTCGAC	Šis darbas
HF012	CCCCAAATGACAAGAATGTTT-GATTTGCTTTGTTTCTTTTCAACT-CAGTTCTTAATCGATGAATTCGAGCTCG	Šis darbas

2.2. Metodai

2.2.1. Plazmidinės DNR skyrimas iš *E. coli*

Užsėjama naktinė kultūra į skystą LB terpę su 100 µg /ml ampicilino. Ryte centrifuguojama kambario temperatūroje 5 min, 2000 x g. Plazmidinės DNR gryninimas atliekamas naudojant GeneJet Plasmid Miniprep Kit „Thermo Fisher Scientific“ rinkinį remiantis gamintojo rekomendacijomis. Plazmidinės DNR koncentracija nustatoma spektrofotometru NanoDrop™ 2000 „Thermo Fisher Scientific“.

2.2.2. DNR gryninimas iš agarozinio gelio

DNR fragmentai iš gelio gryninami naudojant GeneJET Gel Extraction Kit „Thermo Fisher Scientific“ rinkinį remiantis gamintojo rekomendacijomis.

2.2.3. Plazmidinio vektoriaus išskyrimas iš *E. coli* ląstelių su chloroformu

Nuo lėkštelių kilpele paimtas nedidelis kiekis biomasės resuspenduojama 100 µl 2x TE ir supurtoma purtyklėje (MicroShaker Type MS1 „MLW Labortechnik“). Įpilama 200 µl „Lizės buferiniame tirpale“. Lėtai vartant 5-6 kartus pamaišoma, įpilama 150 µl NaAc. Lėtai vartant 5-6 kartus pamaišoma ir įpilama 450 µl chloroformo. Centrifuguojama 10 min 20 000 x g. Nusiurbiamas viršutinė frakcija, pripilamas toks pats tūris izopropanolio, supurtoma purtyklėje. Centrifuguojama 5 min max g. Nupilama. Užpilama 150 µl 75 % etanolio, centrifuguojama 5 min max g, nusiurbiamas. Džiovinama 20-30 min. traukos spintoje. Užpilama 20 µl vandens be nukleazijų. Paruošti mėginiai užšaldomi -20 °C.

2.2.4. Nukleorūgščių restrikcija endonukleazėmis

Naudojamos „Thermofisher Scientific“ restrikcijos endonukleazės pagal gamintojo nurodytas rekomendacijas. Reakcijos produktai tikrinami atliekant DNR elektroforezę agaroziniame gelyje.

2.2.5. Nukleorūgščių elektroforezė agaroziniame gelyje

100 ml 1 % TAE buferinio tirpalo ištirpinamas 1 g agarozės. Mišinys išlydomas mikrobangų krosnelėje „Samsung“, atvėsinus supilama į elektroforezės formelę. Sustingus gelis perkeliamas į vonelę su 1 % TAE buferiniu tirpalu. Į šulinėlius leidžiamas DNR dydžio standartas (GeneRuler Ladder Mix „Thermo Fisher Scientific“) ir paruošti mėginiai su DNA Gel Loading Dye (6×) „Thermo Fisher Scientific“. Paleidžiama DNR elektroforezės sistema „BioRad“ nustačius 140 V, 25 min. Gelis dažomas 2 min etidžio bromido vonelėje (1 µg/ml) ir plaunamas 20 min dejonizuotame vandenyje. Gelis fotografuojamas prietaisu Molecular Imager Gel Doc XR+ „BioRad“.

2.2.6. Plazmidinės DNR vektorių konstravimas

pYAK3-LBC-gag+msGFP2 ir pYAK3-LBC-CFS-gag+GFP plazmidinės DNR buvo sukonstruotos derinant restrikciją ir ligavimą lipniais galais. Visų pirma atliekama restrikcija endonukleazėmis: pYAK3-K7gag+msGFP2 bei pYAK3-LBCgag+mCherry plazmidiniai vektoriai paveikiami NotI ir XhoI, pYAK3-K7-gag-CFS+msGFP2 bei pYAK3-LBC-gag+mCherry plazmidiniai vektoriai paveikiami NotI ir Ecl136II. Su gautais DNR produktais atliekama nukleorūgščių elektroforezė (2.2.5. skyrius), pašvietus UV lempa „UVP“ iš gelio išpjaunami vektorių bei inserto fragmentai, atliekamas DNR gryninimas iš agarozinio gelio (2.2.2. skyrius). Pamatuojama DNR koncentracija NanoDrop™ 2000. Vektorius defosforilinamas 20 min 37 °C ir FastAP inaktyvuojama 5 min 37 °C (Lentelė 2. 9). Atliekamas defosforilinto vektorių ir inserto ligavimas 3 val. 22 °C temperatūroje (Lentelė 2. 10).

Lentelė 2. 9 Defosforilinimo reakcijos mišinys

Pavadinimas	Kiekis
DNR	200 ng
10 × B Buffer	2 µl
FastAP	0,5 µl
H ₂ O	Iki V=20 µl

Lentelė 2. 10 Ligavimo reakcijos mišinys

Pavadinimas	Kiekis
DNR (vektorius)	50 ng
DNR (insertas)	3:1 molinis santykis su vektoriumi
10 × B Buffer	2 µl
10 Mm ATP	2 µl
50 % PEG	2 µl
T4 DNR ligazė	1 µl
H ₂ O	Iki V=20 µl

2.2.7. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)

Mikrocentrifuginiuose mėgintuvėliuose paruošiamas PGR mišinys su pradmenimis (**Lentelė 2. 8**) pagal Phusion Plus „Thermo Fisher Scientific“ nurodymus. Mėginiai perkeliama į termociklerį „Biometa“ (Tpersonal Thermocycler). Paleidžiami PGR ciklai (**Lentelė 2. 11**). Mėginiai laikomi -20 °C.

Lentelė 2. 11 PGR ciklai

Reakcija	Temperatūra (°C)	Trukmė (s)	Ciklai
Pradinė denatūracija	98	30	1
Denatūracija	98	5	30
Pradmenų prilydymas	60	15	
Grandinės ilginimas	72	40	
Galutinis grandinės ilginimas	72	300	1

2.2.8. Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas ir transformacija plazmidine DNR

Į skystą LB terpę užsėjama biomasė. Auginama naktinė kultūra 16 val. purtant vandens purtyklėje Thermo Shaker TS-100 „Biosan“ 200 aps/min greičiu, +37 °C temperatūroje. Naktinė kultūra skiedžiama LB terpe santykiu 1:50 ir auginama kol pamatavus kultūros optinį tankį spektrofotometru BioPhotometer „Eppendorf“ gaunami atitinkamai 0,5-0,6 optiniai vienetai 600 nm bangos ilgio šviesoje. Eksperimentas tęsiamas laikant mėgintuvėlius ledų vonelėje. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 5804 R „Eppendorf“ centrifuga 10 min, 1000 x g greičiu, 4 °C temperatūroje. Pašalinus supernatantą resuspenduojama pusėje pradinio tūrio atšaldyto „Natrio tirpalo“. Resuspenduotos ląstelės centrifuguojamos 10 min, 1000 x g, 4 °C. Pašalinus supernatantą resuspenduojama pusėje pradinio tūrio atšaldyto „Kalcio tirpalo“. Ląstelės inkubuojama ledų vonelėje 30 min. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min, 1000 x g, 4 °C. Pašalinus supernatantą pridedama 1/20 pradinio tūrio „Kalcio tirpalo“. 50 µl kompetentinių ląstelių švelniai sumaišomos su 1-50 ng plazmidinės DNR. Mišinys inkubuojamas 15 min leduose. Po to mišinys inkubuojamas 2 min, 42 °C termostate Thermo Shaker TS-100 „Biosan“. Mėginys inkubuojamas ledų vonelėje 2-3 min. Ląstelės sumaišomos su 450 µl šviežia LB terpe ir inkubuojamos 60 min, 37 °C. 50 µl transformacijos mišinio užsėjama ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu ir auginama 16-20 val 37 °C termostate Biological Thermostat BT 120M „Labororni přístroje Praha“.

2.2.9. Kompetentinių *S. cerevisiae* ląstelių paruošimas ir transformacija plazmidine DNR

Į skystą YPD terpę užsėjama mielių biomasė. Auginama naktinė kultūra 16-20 val. purtant šil-domoje vandens purtyklėje 200 aps/min, 30 °C temperatūroje. Kultūra skiedžiama 1:25 santykiu su skysta YPD terpe. Auginama dieninė kultūra kol optinis tankis atitinka 1 optinį vienetą 600 nm ban-gos ilgio šviesoje. Centrifuguojama kambario temperatūroje 10 min, 1000 x g. Pašalinus supernatantą ląstelės resuspenduojamos pusėje pradinio tūrio 1×TE buferinio tirpalo. Centrifuguojama kambario temperatūroje 10 min, 1000 x g. Pašalinus supernatantą resuspenduojama 1/30 pradinio tūrio 1×LiAc/0.5xTE buferiniame tirpale. Mišinys inkubuojamas kambario temperatūroje 10 min. Mielių transformacijai – 100 µl kompetentinių ląstelių sumaišoma su 1 µg plazmidinės DNR. Į mišinį pridedama 700 µl 1×LiAc/40%PEG/1xTE. Mišinys inkubuojamas 30 min, 30 °C termostate. Pridedama 88 µl DMSO ir inkubuojama 7 min, 42 °C termostate. Centrifuguojama centrifuga Centrifuge 5424 „Eppendorf“ kambario temperatūroje 10 s, 6000 x g. Pašalinus supernatantą biomasė resuspenduo-jama 14 ml 1x TE buferiniame tirpale. Centrifuguojama kambario temperatūroje 10 s, 6000 x g. Su-pernatantas pašalinamas ir biomasė resuspenduojama 50 µl 1×TE buferiniame tirpale. Transformaci-jos mišinys išsėjamas ant selektyvios agarizuotos SD terpės. Ląstelės auginamos apie 3-4 paras 30 °C temperatūroje.

2.2.10. Homologinė rekombinacija pagrįsta mielių transformacija

Homologinei rekombinacijai 1,5 mL mėgintuvėlyje sumaišoma 1 µg PGR produkto ir 1 µl la-šišos spermos DNR, siekiant padidinti transformacijos efektyvumą. Mišinys resuspenduojamas 100 µl kompetentinių *S. cerevisiae* ląstelių ir atliekami DNR transformacijos žingsniai, kaip aprašyta 2.2.9 skyriuje.

2.2.11. *S. cerevisiae* genomo modifikacija paremta CRISPR-Cas9 sistema

Fluorescensinių lokalizacijos žymenų integracijai į *S. cerevisiae* FF18 lokusą naudotas MyLO CRISPR-Cas9 plazmidžių rinkinys (Bean et al., 2022). Donorinė plazmidė (100 ng/µl), koduojanti lokalizacijos žymą, paveikiama NotI restrikcijos endonukleaze. Vektorinė plazmidė (100 ng/µl), ko-duojanti Cas9 ir gRNR sistemą, paveikiama AatII bei SdaI restrikcijos endonukleazėmis. Restrikcijos endonukleazės inaktyvuojamos 5 min 80 °C temperatūroje. Po restrikcijos 1,5 mL mėgintuvėlyje do-norinės ir vektorinės plazmidės sumaišomos 4:3 santykiu kartu su 2 µl lašišos spermos DNR.

Kompetentinių *S. cerevisiae* ląstelių paruošimas vyksta tuo pačiu būdu. Transformacija skiriasi dėl ląstelių auginimo ant atrankios terpės su Geneticinu (G418). Šio pobūdžio transformacijai reika-lingas papildomas žingsnis - po temperatūrinio šoko centrifuguojama 10 s, 6000 x g, ląstelės resus-penduojamos 1 mL YPD terpėje ir gaivinamos 2 val. 30 °C temperatūroje. Ląstelės surenkamos cent-rifuguojant 10 s, 6000 x g ir išsėjamos ant agarizuotos YPD terpės su 300 µg/ml G418. Lėkštelės inkubuojamos 72 val. 30 °C temperatūroje. Užaugusios kolonijos mikrobiologine kilpele persėjamos

ir inkubuojamos 72 val. 30 °C temperatūroje ant neselektyvios agarizuotos YPD terpės, kad būtų paskatintas vektorinių plazmidžių praradimas. Atskiros kolonijos persėjamos ant YPD ir selektyvios YPD su 300 µg /ml G418 ir inkubuojamos 72 val. 30 °C temperatūroje. Atrenkamos kolonijos, kurios neauga ant selektyvios terpės.

2.2.12. Mielių kryžminimas

Vieno kryžminimosi tipo mielių kolonija pernešama ant kietos YPD ir išsėjamos horizontalia linija. Kito kryžminimosi tipo mielės išsėjamos vertikalia linija taip, kad kirstų pirmąjį brūkšnį. Lėkštelė inkubuojama apie 24 val. 30 °C termostate. Po inkubacijos nuo brūkšnių susikirtimo vietos užaugusios kolonijos pernešamos ant selektyvios SD-LU terpės ir inkubuojamos 48 val. 30 °C termostate.

2.2.13. Sporuliacijos indukcija

Šviežiai ant agarizuotos YPD terpės užaugintos mielių ląstelės persėjamos ant kietos GNA pre-sporuliacijos terpės. Inkubuojame 24 val. 30 °C termostate. Po inkubacijos nedidelis kiekis resuspenduojamas 2 ml „Sporuliacijos terpėje“. Suspensija inkubuojama maišant 2-3 paras 25 °C temperatūroje.

2.2.14. Gyvų ląstelių mėginių paruošimas mikroskopavimui

Šviežiai užauginamos mielių kolonijos ant selektyvios agarizuotos SD terpės. Mikrobiologine kilpele nedidelis kiekis biomasės resuspenduojamas 10 µl selektyvios SD terpės. Ant objektinio stikliuko užlašinama išlydytos SD terpėje su 1 % agarozės (65 °C). Uždengiama kitu stikliuku ir šaldoma ant ledo 30 s. Stikliukai atsargiai atskiriami. Suformuotą agarozės „pagalvėlę“ paliekame džiūti 2 min ir užlašiname 2 µl mėginio. Uždengiame dengiamuoju stikliuku.

2.2.15. Fiksuotų ląstelių mėginių paruošimas mikroskopavimui

Naktinė *S. cerevisiae* kultūra inokuliuojama selektyvioje SD terpėje ir auginama 30 °C purtyklėje 250 aps/min. Dieninė kultūra praskiedžiama SD terpėje iki 0,1 optinio tankio vienetų ir auginama 30 °C purtant purtyklėje 250 aps/min. Auginama iki 0,5-0,8 optinio tankio vienetų. Surenkama 1 mL kultūros į 1,5 ml mėgintuvėlį ir centrifuguojama 1 min, 3000 x g. Supernatantas pašalinamas ir mėginys resuspenduojamas 500 µl 1x PBS. Centrifuguojama 1 min, 3000 x g. Supernatantas pašalinamas ir kartojamas ląstelių plovimas 1x PBS 2 kartus. Resuspenduojama 1 mL šviežio 3,7 % PFA. Inkubuojama 50-60 min 30 °C purtyklėje 200 rpm. Centrifuguojama 5 min, 1000 x g. Supernatantas pašalinamas, resuspenduojama 500 µl 1x PBS. Centrifuguojama 1 min, 3000 x g. Kartojame ląstelių plovimą 1x PBS 2 kartus.

Branduolių dažymui fiksuotos ląstelės resuspenduojamos 5 µg/ml Hoechst 33342 arba 5 µg/ml DAPI. Inkubuojama 15 min kambario temperatūroje tamsoje. Centrifuguojame 1 min, 3000 x g. Pašalinamas supernatantas ir resuspenduojama 500 µl 1x PBS. Ląstelių plovimas 1x PBS kartojamas 2 kartus. Resuspenduojama 30 µl 1x PBS.

Ant dengiamojo stiklelio užlašinama 20 µl ConA. Inkubuojama 30 min drėgmę palaikančioje kameroje. Stiklelis 2 kartus plaunamas steriliu H₂O. Stiklelis džiovinamas >10 min. 30 µl fiksuotų ląstelių suspensijos lašinama ant dengiamojo stiklelio. Inkubuojama 15 min tamsioje drėgmės kameroje. Stiklelis 3-4 kartus plaunamas steriliu H₂O. Paliekama džiūti >10 min tamsoje. Ant objektinio stikliuko užlašinama 7,5 µl ProLong Diamond, tokiu būdu mėginiai apsaugomi nuo išblukimo. Apverstas dengiamasis stiklelis iškart uždedamas ir švelniai prispaudžiamas ant objektinio stikliuko. Paruošti mėginiai laikomi bent 12 val. 4 °C temperatūroje prieš mikroskopuojant.

2.2.16. Mėginių analizė fluorescensiniu mikroskopu

Mėginiai analizuojami naudojant AX70 „Olympus“ fluorescensinį mikroskopą su UplanApo 100×/1,35 „Olympus“ Oil Iris objektyvu ir imersiniu aliejumi. Vaizdai fotografuojami Hamamatsu CCD Orca 4742-95 „Artisan“ kamera. Ląstelių morfologijos ir padėties vertinimui registruojami šviesaus lauko vaizdai. Fluorescensiniams signalams detektuoti naudojami skirtingi filtrai. GFP signalas registruojamas naudojant U-MWIBA filtrus: sužadinimo filtras yra BP460-490, o emisijos filtras BA515-550. Atitinkamai GFP fluoroforų sužadinimo maksimumas 587 nm ir emisijos maksimumas 610 nm. mCherry ir RFP signalams registruoti naudoti U-MWG filtrai: sužadinimo filtras BP510-550, o emisijos BA590. Atitinkamai mCherry sužadinimo maksimumas 587 nm, emisijos maksimumas 610 nm. Hoechst 33342 signalams registruoti naudojami U-MWU filtrai: sužadinimo filtras BP330-385 ir emisijos BA420. Hoechst 33342, DAPI sužadinimo maksimumas 350-361 nm, emisijos maksimumas 461 nm. Mikroskopijos nuotraukos analizuojamos „Fiji“ programa (Schindelin et al., 2012).

3. Rezultatai

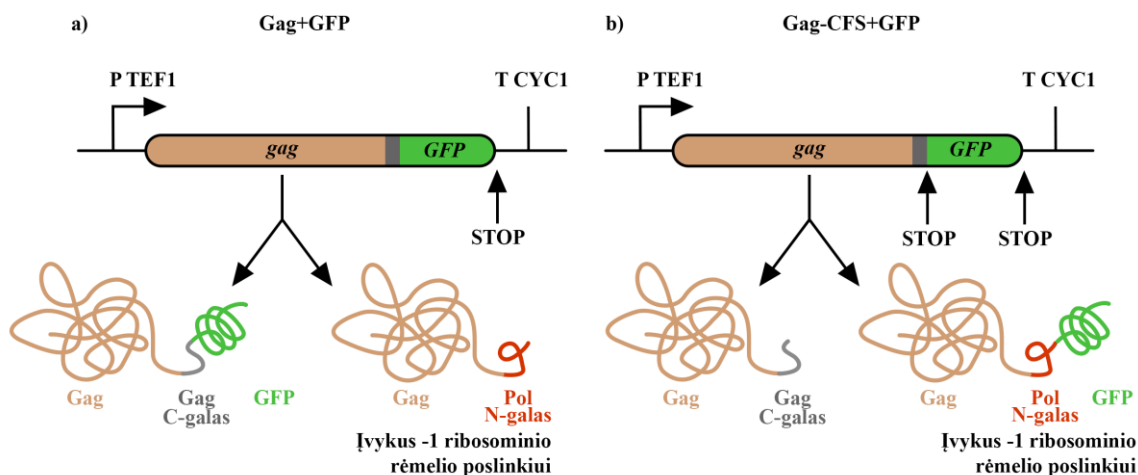
Šio tyrimo tikslas – nustatyti ScV-LA ir ScV-LBC virusinių kapsidžių lokalizaciją ir galimus veiksnius *S. cerevisiae* ląstelėse. Totivirusų lokalizacijos determinančių paieškos tyrimai buvo pradėti nuo plazmidinių DNR vektorių konstravimo, siekiant pažymėti totivirusų kapsidžių baltymus GFP. ScV-LA ir ScV-LBC virusinių kapsidžių lokalizacijos nustatymui *S. cerevisiae* mielėse buvo optimizuotas fiksuotų mėginių paruošimo metodas. Haploidinių ir diploidinių ląstelių bei natyvių totivirusų įtakai ScV-LA ir ScV-LBC kilmės dalelių lokalizacijos tyrimams buvo sukonstruoti *S. cerevisiae* kamienai su skirtingų kompartmentų lokalizacijos žymomis (branduolio, ET, SPB ir kt.). Diploidinių ląstelių tyrimams buvo sukryžminti haploidiniai kamienai. Taip pat buvo atlikta sporuliacijos indukcija siekiant nustatyti ScV-LA ir ScV-LBC baltymų lokalizaciją sporose.

3.1. Totivirusų kapsidžių baltymų žymėjimas GFP ir skirtingų konstrukto analizė

Totivirusų lokalizacijos *S. cerevisiae* veiksnį paieškai prie Gag buvo prilietas žaliai fluorescuojantis GFP baltymas. Pirmuoju atveju GFP prijungiamas prie Gag baltymo C-galo. Šiam tyrimui naudoti du plazmidiniai vektoriai su ScV-LA ir ScV-LBC kilmės Gag baltymais: pYAK3-LA-gag+GFP (paimta iš bendros laboratorijos kolekcijos) ir pYAK3-LBC-gag+GFP (sukonstruota šiame darbe) (**Pav. 3.1a**). Transliacijos metu buvo sintetinami pilno ilgio Gag baltymai su C-gale prilietais GFP fluoroforais.

Ribosominio rėmelio poslinkio įtakos Gag baltymo lokalizacijai tirti buvo naudoti pYAK3-LA-gag+CFS-GFP (paimta iš bendros laboratorijos kolekcijos) ir pYAK3-LBC-gag+CFS-GFP (sukonstruota šiame darbe) (**Pav. 3.1b**) plazmidiniai vektoriai, prie *gag* prijungiamas *GFP* už STOP kodono. Daugeliu transliacijos atvejų (98 %) sintetinamas laukinio tipo Gag baltymas. Įvykus rėmelio poslinkiui, sintetinamas Gag baltymas su Pol domeno N-galo motyvu, prie kurio prilietas GFP. Rėmelio poslinkis įvyksta tik ~2 % transliacijų (Dinman et al., 1991), todėl atitinkamai sulietinio baltymo (gag-CFS+GFP) transliacijos pasitaiko rečiau.

Siekiant nustatyti skirtumus tarp Gag domenų C-galo motyvų buvo analizuojamos pYAK3-LA-gag+CFS-GFP ir pYAK3-LBC-gag+CFS-GFP vektoriuose koduojami Gag C-galiniai fragmentai (**Pav. 3.2**). „Jalview“ programiniu įrankiu buvo analizuojami *gag* transliacijos produktai už rėmelio poslinkio taikinio – ScV-LA atveju iRNR GGAUUU motyvo ir ScV-LBC atveju iRNR GGAUUUU motyvo (Dinman et al., 1991b; Ramírez et al., 2022a).



Pav. 3.1 Šiame darbe naudotų plazmidinių vektorių schemas ir jų koduojami transliuojami baltymai. **a)** Konstrukte pYAK3-LBC-gag+GFP seka koduoja ScV-LBC viruso kilmės Gag baltymą C-gale sulietą su GFP. **b)** pYAK3-LBC-gag+CFS-GFP konstrukte Gag baltymas su C-gale už STOP kodono prilietu GFP. pYAK3-LA-gag+GFP ir pYAK3-LA-gag+CFS-GFP konstruktai yra analogiški pYAK3-LBC-gag+GFP ir pYAK3-LBC-gag+CFS-GFP variantams.

Be rėmelio poslinio ScV-LA-gag C-galo aminorūgščių regionas pasižymėjo didesniu hidrofobiškumu. Įvykus -1 ribosominiam rėmelio poslinkiui transliacijos produktas pasikeitė į Arg/Ser turtingą regioną. Šiame regione atsiradę motyvai pasižymėjo labiau bazinėmis, polinėmis savybėmis. Išskiriami atsikartojantys RS, SR ir RR regionai gali būti svarbūs sąveikoms su kitais baltymais arba potencialūs fosforilinimo taikiniai, nes serino liekanos dažnai dalyvauja baltymų modifikacijose. ScV-LBC-gag C-galo regionui taip pat būdingi neigiamai įkrautų aminorūgščių motyvai, po rėmelio poslinkio C-galo transliacijos produktas pasikeičia ir regioną praturtina aromatinėmis, bazinėmis arba polinėmis savybėmis pasižyminčiomis aminorūgštimis.



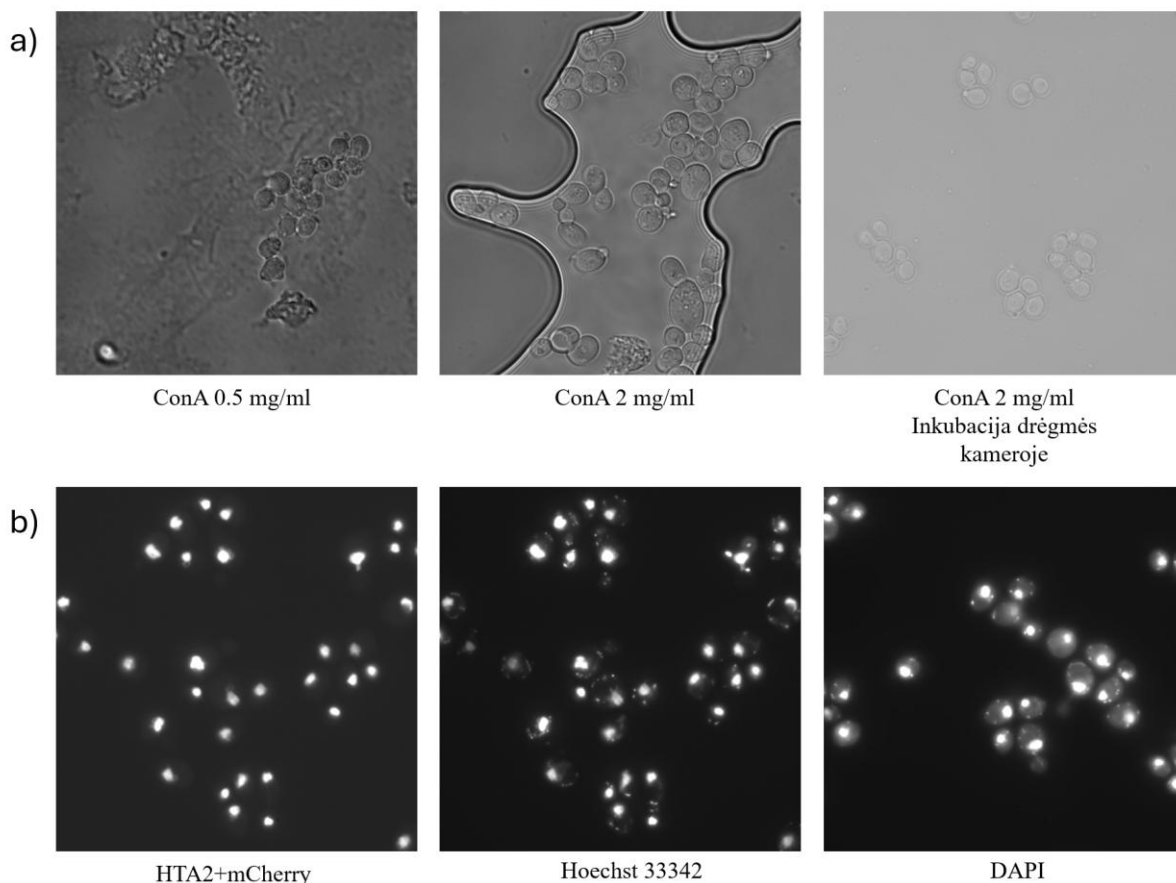
Pav. 3.2 Šiame paveiksle pavaizduotas ScV-LA ir ScV-LBC Gag C-gale esančio regiono amino rūgščių sekų palyginimas (CFS žymi transliacijos produktą įvykus -1 ribosominio rėmelio poslinkiu). Spalvos grupuoja amino rūgštis pagal jų biochemines savybes: violetinė – teigiamai įkrautos Lys/Arg/His, raudona – neigiamai įkrautos Asp/Glu, šviesiai rožinė – hidrofobinės ir alifatinės Ile/Leu/Val/Ala/Met, rožinė – struktūriškai išsiskiriančios Gly/Pro, geltona – Cys, žalia – polinės Ser/Thr/Asn/Gln, oranžinė – aromatinės Phe/Trp/Tyr.

3.2. Fiksuotų ląstelių paruošimo metodo optimizavimas

Siekiant optimizuoti *S. cerevisiae* fiksuotų ląstelių paruošimo metodą mikroskopavimui buvo tikrinamos mėginių paruošimo sąlygos. Įvertinta skirtinga konkanavalino (ConA) koncentracija ir mėginių inkubacijos sąlygos. Pirmiausia BY4741 (HTA2+mCherry) kamieno ląstelės buvo imobilizuojamos ant stiklelių, padengtų 0,5 mg/ml ConA tirpalu, tačiau šiomis sąlygomis preparato paviršius atrodė netolygus, ląstelės pasiskirsčiusios nevienodai ir buvo pastebimos dehidratacijos zonos

(Pav. 3.3a). ConA tirpalo dehidratacija galėjo lemti netolygų paviršiaus padengimą – galimai dalis baltymo susikoncentravo kraštuose, todėl ląstelės negalėjo tolygiai prisitvirtinti. Tikėtina, kad inkubacija drėgmėje padeda ConA išlaikyti hidratuotą, kas yra svarbu tolygiai baltymo adsorbcijai prie stiklo paviršiaus. Atsižvelgiant į šiuos pastebėjimus mikroskopavimo mėginių paruošimo metodas buvo papildytas inkubacija drėgmės kameroje. Atlikus eksperimentą buvo nustatyta, kad ląstelių monosluoksnio susidarymą ir tolygų mėginio paviršių užtikrina 2 mg/ml ConA koncentracija ir mėginių inkubacija drėgmės kameroje (Pav. 3.3a).

Taip pat buvo vizualiai įvertinta skirtumai tarp genetinio HTA2-mCherry branduolio žymėjimo bei DNR dažymo Hoechst 33342 ir DAPI (Pav. 3.3b). Visi trys žymėjimo būdai leido aptikti branduolio lokalizaciją fiksuotose *S. cerevisiae* ląstelėse. HTA2-mCherry signalas paremtas H2A lokalizacija chromatine. Hoechst 33342 dažai jungiasi prie DNR mažojo griovelio AT turtingų regionų, todėl daugiausiai išryškina branduolio DNR, bet gali būti ir matomas silpnesnis mitochondrijų DNR signalas. DAPI taip pat jungiasi prie DNR mažojo griovelio ir taip pat gali nudažyti mitochondrijų DNR. Atlikus eksperimentą DNR dažai Hoechst 33342 pasižymėjo šiek tiek didesniu kontrastu ir geresne raiška lyginant su HTA2-mCherry ir DAPI, todėl tolimesniems darbams pasirinkta vizualizuoti gyvų ląstelių nuotraukas HTA2-mCherry ir fiksuotų ląstelių nuotraukas su Hoechst 33342 dažais (Pav. 3.3b).



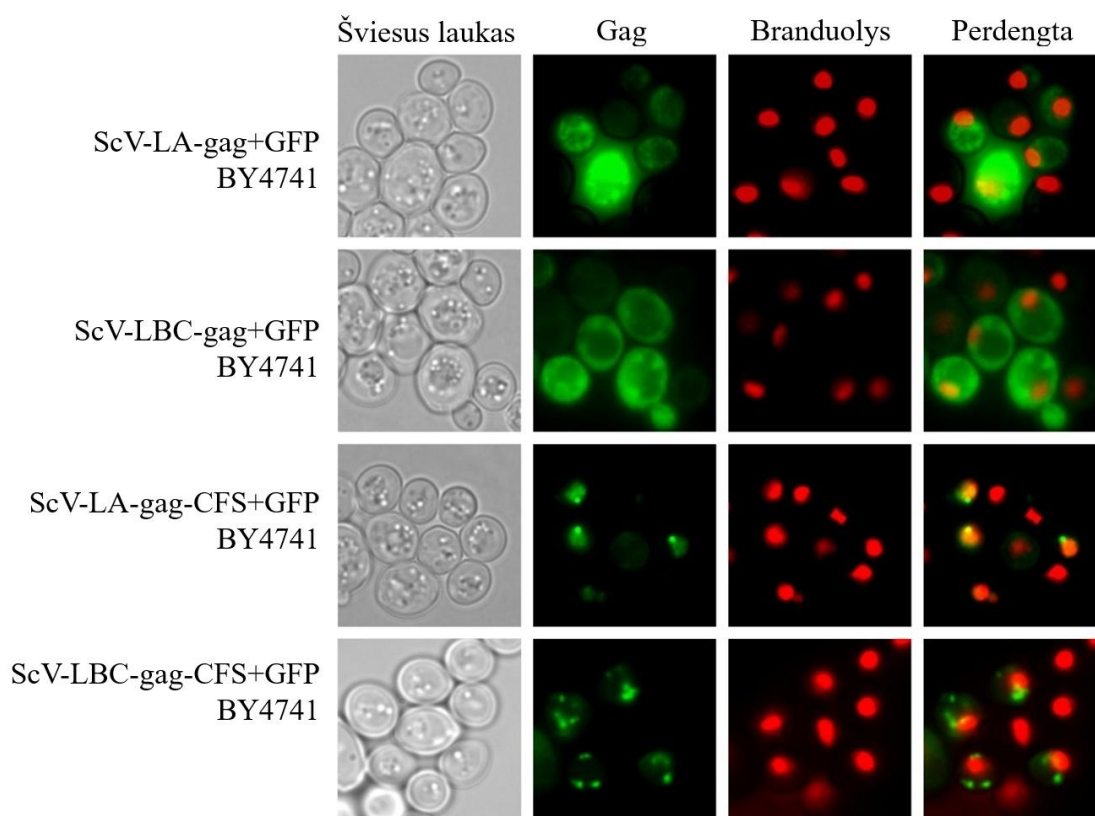
Pav. 3.3 Paveiksle pateiktos fiksuotų *S. cerevisiae* BY4741 (HTA2+mCherry) kamieno ląstelių mikroskopavimo nuotraukos. **a)** Fiksuotų ląstelių imobilizavimo ant ConA padengtų stiklelių palyginimas naudojant 0,5 mg/ml ConA, 2 mg/ml ConA ir 2 mg/ml ConA kartu su inkubacija drėgmės kameroje. **b)** Branduolio žymėjimo palyginimas naudojant HTA2+mCherry, Hoechst 33342 ir DAPI. Tolimesniems eksperimentams parisirinktos 2 mg/ml ConA koncentracija kartu su inkubacija drėgmės kameroje, o fiksuotų ląstelių branduolių vizualizavimui – Hoechst 33342 dažymas.

3.3. ScV-LA ir ScV-LBC kapsidžių baltymų lokalizacijos palyginimas

Rekombinantinių baltymų lokalizacijos tyrime buvo atliktas ląstelės branduolio žymėjimas fluoroforais. Mielių branduolio žymėjimui PGR metodu padaugintas pYM44-mCherry plazmidės fragmentas. PGR metu buvo naudojami pradmenys su HTA2 homologinėmis sekomis. Susidaręs linijinis PGR produktas (homologinės sekos priliestos prie mCherry sekos ir HIS5 auktrofinė žymos), homologinės rekombinacijos būdu integruotas į *S. cerevisiae* BY4741 genomą.

Siekiant įvertinti ScV-LA ir ScV-LBC kilmės kapsidės baltymų lokalizaciją *S. cerevisiae* ląstelėse buvo naudojami haploidiniai BY4741 (HTA2+mCherry) kamienai su natyviais ScV-LA ir ScV-LBC virusais. Šie kamienai buvo transformuojami pYAK3-LA-gag+GFP, pYAK3-LBC-gag+GFP, pYAK3-LA-gag+CFS-GFP ir pYAK3-LBC-gag+CFS-GFP plazmidiniais vektoriais. Vėliau ruošiami gyvų bei fiksuotų ląstelių mėginiai (po 3 pakartojimus) ir atliekama kokybinė fluorescencinės mikroskopijos analizė. Nuotraukose registruoti: Gag-GFP signalai per U-MWIBA filtrus, HTA2+mCherry signalai per U-MWG filtrus, Hoechst 33342 signalai per U-MWU filtrus, taip pat buvo fotografuojami šviesaus lauko vaizdai. Vėliau „Fiji“ programa analizuojamas kanalų persidengimas.

ScV-LA-gag+GFP atveju BY4741 kamiene buvo stebimas ryškus Gag+GFP signalas (**Pav. 3.4**). Fluorescuojantys baltymai formavo sankaupas citoplazmoje. Šie baltymai neatrodė tolygiai pasklidę visoje citoplazmoje. ScV-LBC-gag+GFP baltymų atveju, žalias GFP signalas buvo difuziškai pasiskirstęs citoplazmoje. (**Pav. 3.4**).



Pav. 3.4 ScV-LA ir ScV-LBC Gag+GFP baltymų lokalizacijos palyginimas gyvoje haploidinėse BY4741 (HTA2+mCherry) *S. cerevisiae* kamieno ląstelėse. Fluorescencinės mikroskopijos nuotraukose pateikiami ląstelių šviesaus lauko, Gag-GFP, branduolio žymos ir perdengimo kanalai. Žalia spalva žymi ScV-LA arba ScV-LBC kilmės Gag+GFP, raudona spalva žymi branduolius, atžymėtus mCherry.

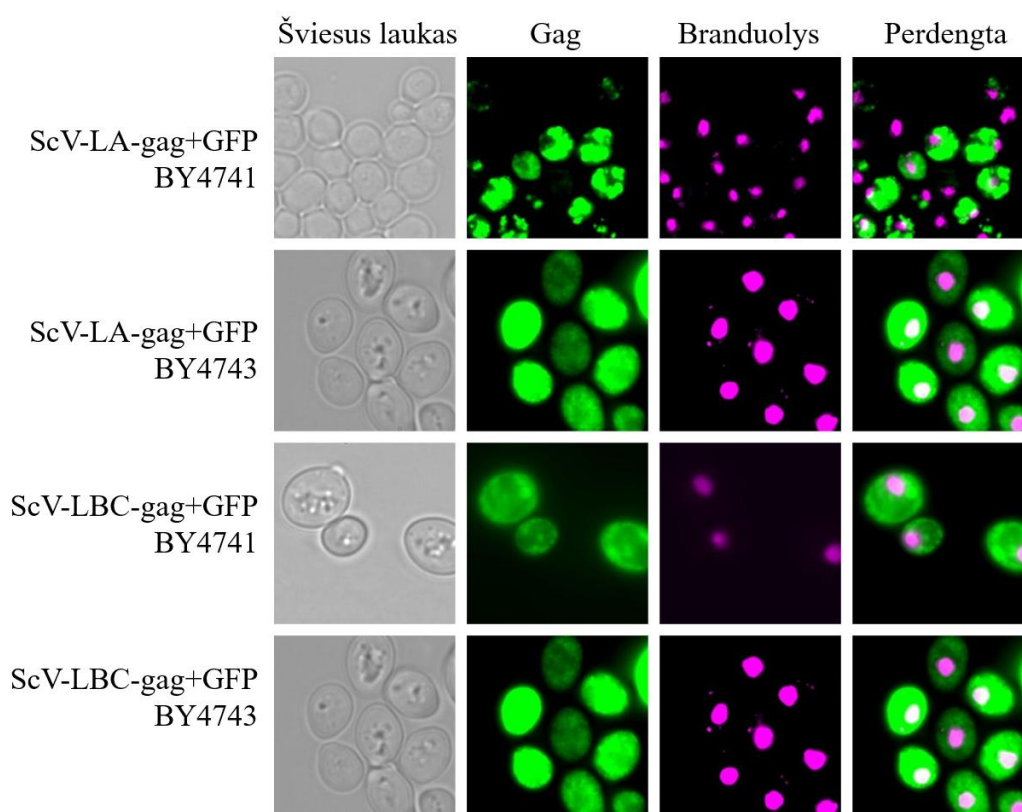
Tuomet buvo įvertinti konstruktai, kuriuose sulietiniai baltymai buvo transliuojami tik įvykus ribosominiam rėmelio poslinkiui, kuris pasitaiko tik 2% transliacijų (**Pav. 3. 4**). Kaip ir buvo tikėtasi, ScV-LA-gag-CFS+GFP baltymo signalas pasirodė silpnesnis lyginant su konstruktais be rėmelio poslinkio. Buvo pastebimi pavieniai žali taškiniai signalai, esantys arti branduolio srities arba persidengiantys su juo. Kiekvienoje ląstelėje buvo matoma tik viena lokali baltymų sanakaupa. Šie rezultatai parodė, kad susidaręs transliacijos produktas su Pol N-galo fragmentu galimai lemia baltymų lokalizaciją šalia branduolio arba net persidengiant su branduolio žyma.

ScV-LBC-gag-CFS+GFP konstrukto atveju baltymai sudarė sanakaupas primenančias pūsleles (**Pav. 3.4**). Sanakaupos buvo pasklidusios po citoplazmą, bet pastebėtas pasiskirstymas ir aplink branduolį ar net persidengiant su juo. Kadangi šio konstrukto baltymų lokalizacija skyrėsi nuo ScV-LBC-gag+GFP baltymų, tai parodė, kad ScV-LBC tipo transliacijos produktas su Pol N-galo fragmentu taip pat funkciškai gali būti susijęs su baltymo translokacija.

3.4. ScV-LA ir ScV-LBC kapsidžių baltymų lokalizacijos palyginimas haploidiniuose, diploidiniuose kamienuose ir sporose

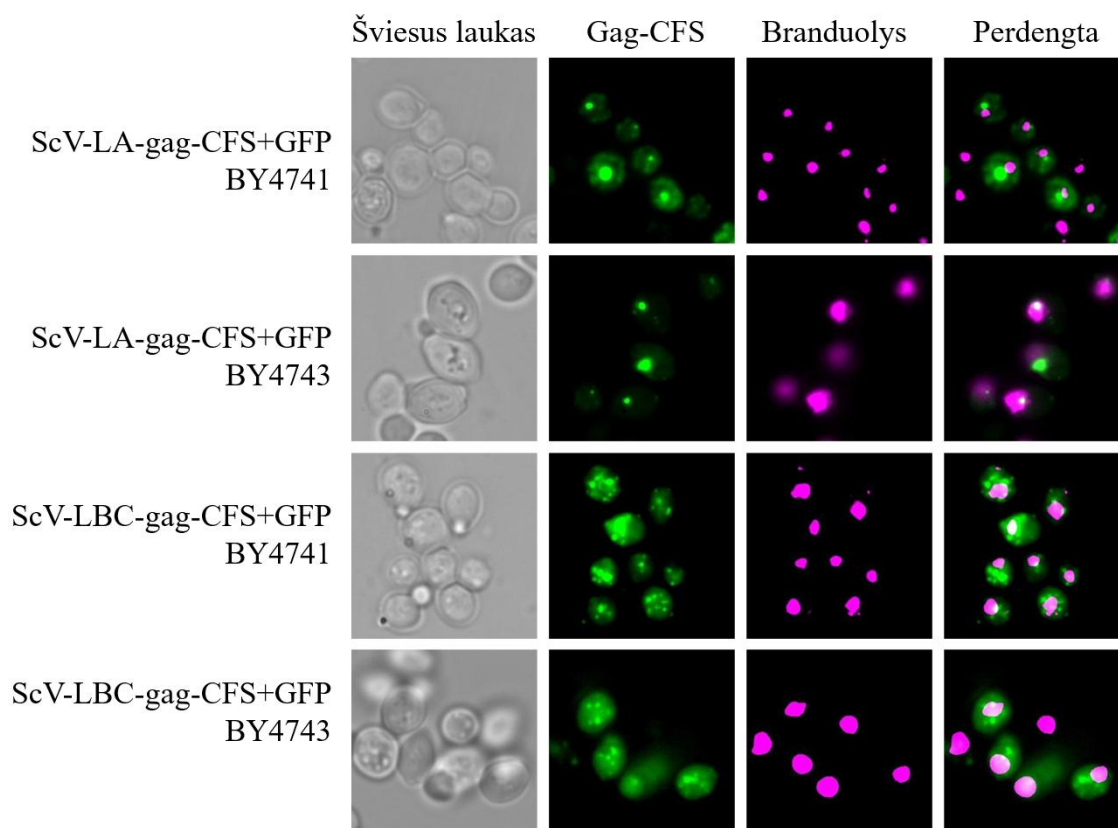
Toliau buvo lyginama ScV-LA ir ScV-LBC kilmės kapsidės baltymų lokalizaciją tarp haploidinių ir diploidinių *S. cerevisiae* kamienų. Diploidinių ląstelių tyrimui buvo kryžminamos a tipo BY4741 (HTA2+mCherry) ir α tipo BY4742 (HTA2+mCherry) ląstelės. Po kryžminimo gautas BY4743 (HTA2+mCherry) kamienas su fluorescensinėmis branduolio žymomis. BY4743 diploidiniai kamieniai buvo transformuojami pYAK3-LA-gag+GFP, pYAK3-LBC-gag+GFP, pYAK3-LA-gag+CFS-GFP ir pYAK3-LBC-gag+CFS-GFP plazmidiniais vektoriais ir analogiškai haploidinių kamienų tyrimui ruošiami mėginiai mikroskopavimui.

Diploidiniame BY4743 kamienne ScV-LA Gag+GFP signalas buvo aptinkamas citoplazmoje, tačiau skyrėsi nuo BY4741 nes atrodė labiau difuziškai pasklidęs po ląstelės citoplazmą ir mažiau sutelktas į atskiras ląstelės sritis. ScV-LBC-gag+GFP konstrukto atveju diploidiniame kamienne žalias signalas buvo difuziškai pasiskirstęs citoplazmoje, primenantys ScV-LA-gag+GFP baltymų sankaupas diploidiniame ir ScV-LBC-gag+GFP baltymų haploidiniame kamienne. (Pav. 3. 5).



Pav. 3.5 ScV-LA ir ScV-LBC Gag+GFP baltymų lokalizacijos palyginimas fiksuotose haploidinėse BY4741 ir diploidinėse BY4743 *S. cerevisiae* kamienų ląstelėse. Fluorescensinės mikroskopijos nuotraukose pateikiami ląstelių šviesaus lauko, Gag-GFP, branduolio žymos ir perdengimo kanalai. Žalia spalva žymi ScV-LA arba ScV-LBC kilmės Gag+GFP, rožinė spalva žymi branduolius, nudažytus Hoechst 33342.

Taip pat buvo įvertinti konstruktai, kuriuose sulietiniai baltymai transliuojami tik įvykus -1 ribosominiam rėmelio poslinkiui (**Pav. 3.6**). ScV-LA-gag-CFS+GFP atveju tiek haploidiniame, tiek diploidiniame kamiene buvo pastebimi pavieniai žali taškiniai signalai, esantys branduolio periferijoje arba šalia jos. ScV-LBC-gag-CFS+GFP atveju taip pat analogiškai kaip ir haploidiniuose kamienuose baltymai kaupėsi citoplazmoje pasiskirsčiusiose pūslelėse.



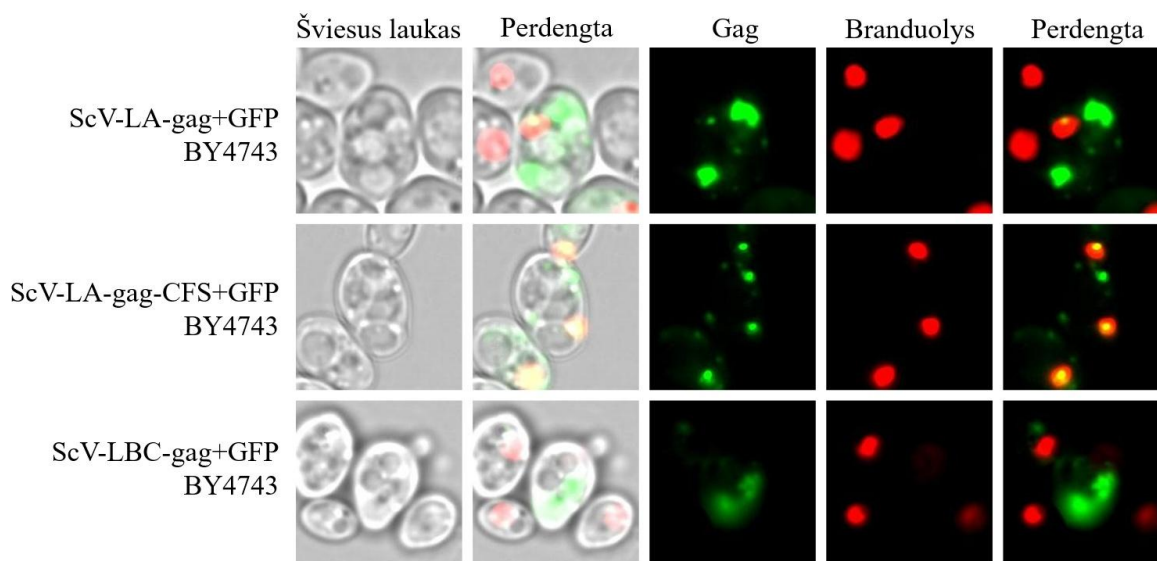
Pav. 3.6 ScV-LA-gag-CFS+GFP ir ScV-LBC-gag-CFS+GFP koduojamų baltymų lokalizacijos palyginimas fiksuotose haploidinių BY4741 ir diploidinių BY4743 *S. cerevisiae* ląstelių kamienuose. Fluorescencinės mikroskopijos nuotraukose pateikiami ląstelių šviesaus lauko, Gag-CFS, branduolio žymos ir perdengimo kanalai. Žalia spalva žymi ScV-LA arba ScV-LBC kilmės Gag-CFS+GFP baltymus, rožinė spalva žymi branduolius, nudažytus Hoechst 33342.

Siekiant nustatyti ScV-LA ir ScV-LBC baltymų lokalizaciją sporose buvo naudojamas sukryžmintas BY4743 (HTA2+mCherry) kamienas, transformuotas pYAK3-LA-gag+GFP, pYAK3-LA-gag-CFS+GFP ir pYAK3-LBC-gag+GFP plazmidiniais vektoriais. Diploidinės ląstelės buvo auginamos „sporuliacijos terpėje“ su azoto ir fermentuojamos anglies šaltinio trūkumu. Vėliau atliktas gyvų ląstelių mikroskopijos mėginių paruošimas ir analizė fluorescencinės mikroskopijos būdu (**Pav. 3.7**).

ScV-LA-gag+GFP baltymai grupavosi priešinguose sporuliuojančios ląstelės poliuose ir atskirai 4 taškinėse sankaupose. ScV-LA-CFS+GFP baltymai kaupėsi 4 poliuose, vienas iš jų persidengė

su branduoliu. Tikėtina, kad ScV-LA-CFS+GFP baltymai pateko į sporas kartu su branduolio aplinka. ScV-LBC-CFS+GFP atveju grupavosi atskirose sankaupose.

Analizės metu buvo tikimasi, kad HTA2+mCherry baltymai bus paskirstyti į sporas. Analizuojant perdengtas šviesaus lauko ir branduolio žymos nuotraukas atrodo, kad mCherry fluoroforu žymėti histonai į sporas nepateko. Todėl gauti rezultatai (**Pav. 3.7**) kelia abejonių dėl interpretacijos patikimumo. Šiam fenomenui patikrinti, buvo paruošti fiksuotų BY4743 (HTA2+mCherry) ląstelių mėginiai DNR dažant Hoechst 33342. Tačiau sporose fluorescencinis signalas vis tiek nebuvo aptiktas.



Pav. 3.7 ScV-LA-gag+GFP ir ScV-LA-gag-CFS+GFP ir ScV-LBC-gag+GFP koduojamų baltymų lokalizacijos palyginimas BY4743 (HTA2+mCherry) ląstelių sporose. Fluorescencinės mikroskopijos nuotraukose pateikiami šviesaus lauko, Gag, branduolio žymos ir perdengimo kanalai. Žalia spalva žymi ScV-LA arba ScV-LBC kilmės sulietinius Gag+GFP ir Gag-CFS+GFP baltymus, raudona – branduolius, nudažytus Hoechst 33342.

Taigi, vizualinė fluorescencinių baltymų lokalizacijos analizė parodė, kad ScV-LA ir ScV-LBC kilmės Gag baltymai skiriasi savo lokalizacijos pobūdžiu (**Pav. 3.4-3.7**). ScV-LA ir ScV-LBC gag+GFP kaupiasi difuziškai pasklidę citoplazmoje ir haploidinėse, ir diploidinėse ląstelėse, su viena išimtimi - ScV-LA kilmės gag baltymai haploidiniame kamiene labiau linkę sudaryti sankaupas. ScV-gag-CFS-LA baltymai lokalizuojasi viename židinyje branduolio periferijoje. Sporuliacijos tyrimų metu buvo pastebimas Gag baltymų paskirstymas į atskirus taikinius skirtinguose ląstelės poliuose, kas taip pat gali būti siejama su Gag baltymų patekimu į sporas.

3.5. Natyvių totivirusų įtaka rekombinantinių ScV-LA ir ScV-LBC baltymų lokalizacijai

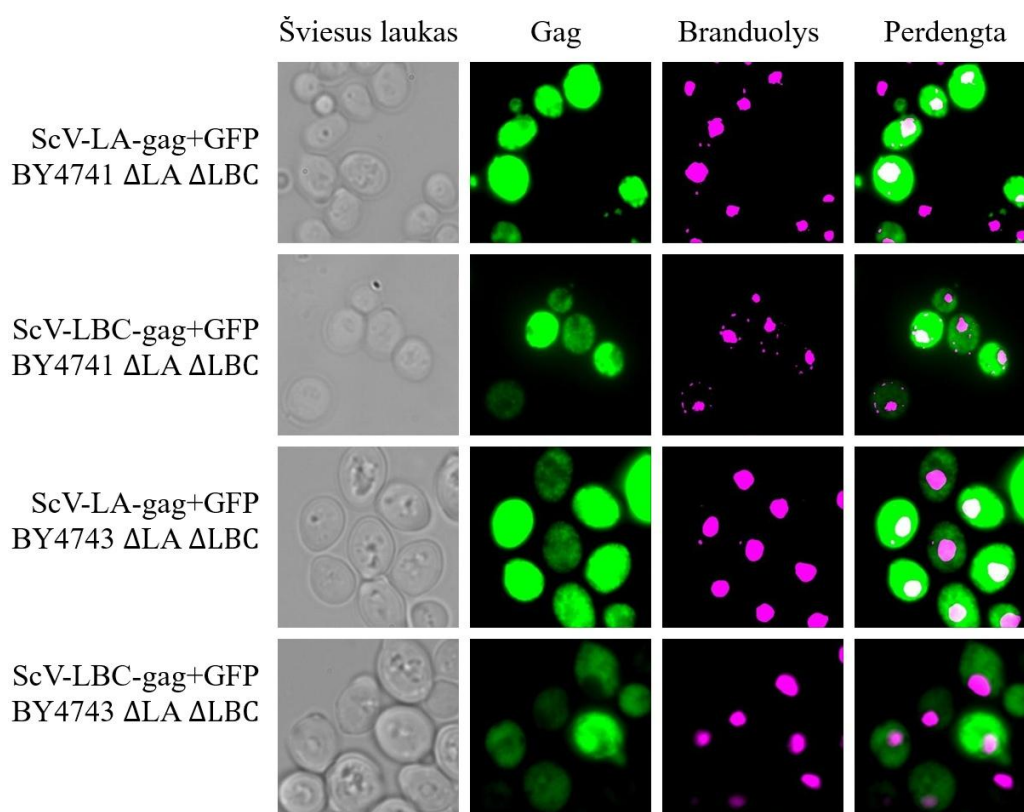
Siekiant ištirti totivirusų įtaką rekombinantinių ScV-LA ir ScV-LBC baltymų lokalizacijai, analogiškai haploidinių ir diploidinių ląstelių tyrimui homologinės rekombinacijos metodu buvo pažymimams mCherry baltymas. Haploidinių ląstelių tyrimui pYM44-HTA2+mCherry plazmidiniu

vektoriumi buvo transformuoti kamienai su eliminuotais natyviais ScV-LA ir ScV-LBC totivirusais – BY4741 Δ LA Δ LBC (HTA2+mCherry) ir BY4742 Δ LA Δ LBC (HTA2+mCherry).

Diploidinių ląstelių tyrimui be natyvių virusų buvo kryžminamos BY4741 Δ LA Δ LBC (HTA2+mCherry) ir BY4742 Δ LA Δ LBC (HTA2+mCherry). Po kryžminimo gautas BY4743 Δ LA Δ LBC (HTA2+mCherry) kamienas su fluorescensinėmis branduolio žymomis.

Siekiant įvertinti, ar natyvūs *S. cerevisiae* totivirusai turi įtakos rekombinantinių ScV-LA ir ScV-LBC kilmės baltymų lokalizacijai, GFP signalai buvo lyginami tarp kamienų, kuriuose palaikoma natyvių virusų replikacija (**Pav. 3.5-3.6**) ir kamienų, kuriuose ScV-LA, ScV-M ir ScV-LBC virusai buvo eliminuoti (**Pav. 3.8-3.9**). Šiam tyrimui BY4741 Δ LA Δ LBC ir BY4743 Δ LA Δ LBC kamienai transformuoti pYAK3-LA-gag+GFP, pYAK3-LBC-gag+GFP, pYAK3-LA-gag+CFS-GFP ir pYAK3-LBC-gag+CFS-GFP plazmidiniais vektoriais. Vėliau atliktas fiksuotų mikroskopijos mėginių paruošimas ir analizė fluorescensinės mikroskopijos būdu.

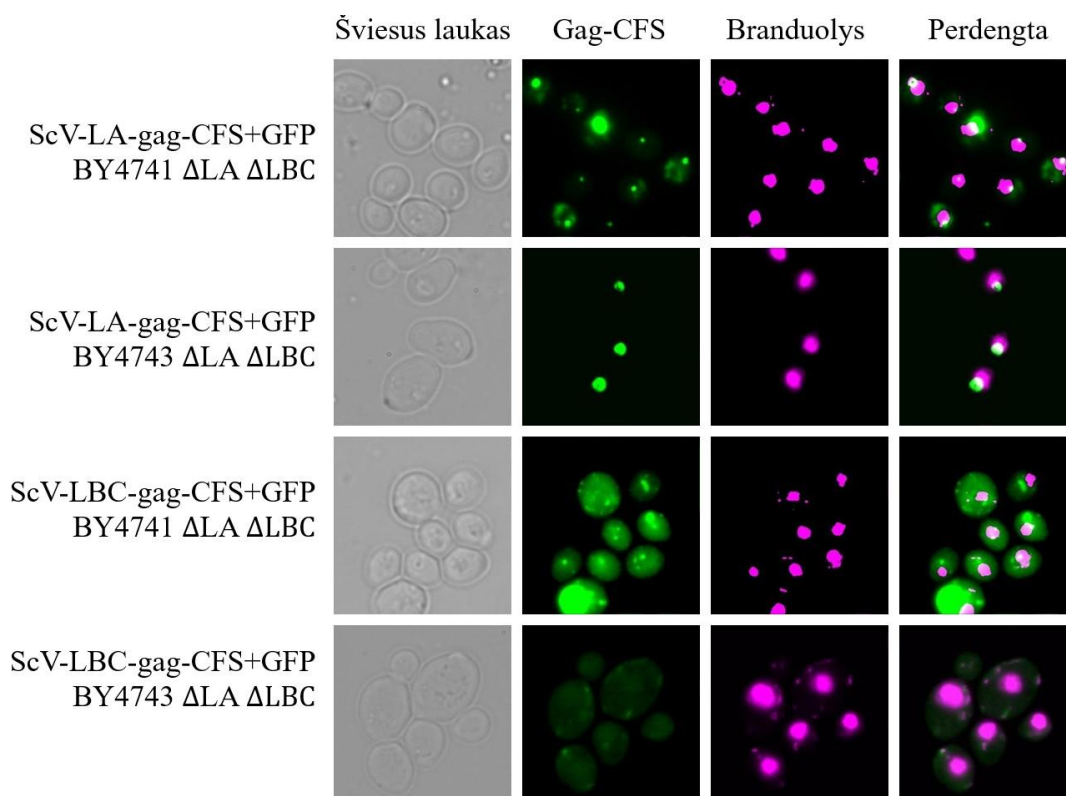
BY4741 Δ LA Δ LBC ir BY4743 Δ LA Δ LBC atvejais ScV-LA-gag+GFP ir ScV-LBC-gag+GFP baltymai buvo pasklidę po citoplazmą (**Pav. 3.8**). Eliminavus virusus iš BY4741 kamieno atsirado pokytis, nes ScV-LA-gag+GFP atveju citoplazminiai baltymai neformavo sankaujų (**Pav. 3. 8**).



Pav. 3. 8 ScV-LA-gag+GFP ir ScV-LBC-gag+GFP koduojamų baltymų lokalizacijos palyginimas BY4741 Δ LA Δ LBC ir BY4743 Δ LA Δ LBC *S. cerevisiae* kamienų fiksuotose ląstelėse. Fluorescensinės mikroskopijos nuotraukose pateikiami ląstelių šviesaus lauko, Gag, branduolio žymos ir perdengimo kanalai. Žalia spalva žymi ScV-LA arba ScV-LBC kilmės Gag+GFP baltymus, rožinė žymi branduolius, nudažytus Hoechst 33342.

Toliau buvo lyginama ScV-LA-gag-CFS+GFP baltymų fluorescensija tarp analogiškų kamienų. Tiek virusus nešiojančiuose kamienuose (**Pav. 3.6**), tiek kamienuose be virusų (**Pav. 3.9**) nebuvo pastebimas signalo pokytis. Baltymai kaupėsi viename židinyje šalia branduolio arba persidengiant su juo. Tai galėtų reikšti, kad natyvių totivirusų persistencija nedaro įtakos nuo Pol N-galo fragmento priklausomai ScV-LA-gag baltymų translokacijai.

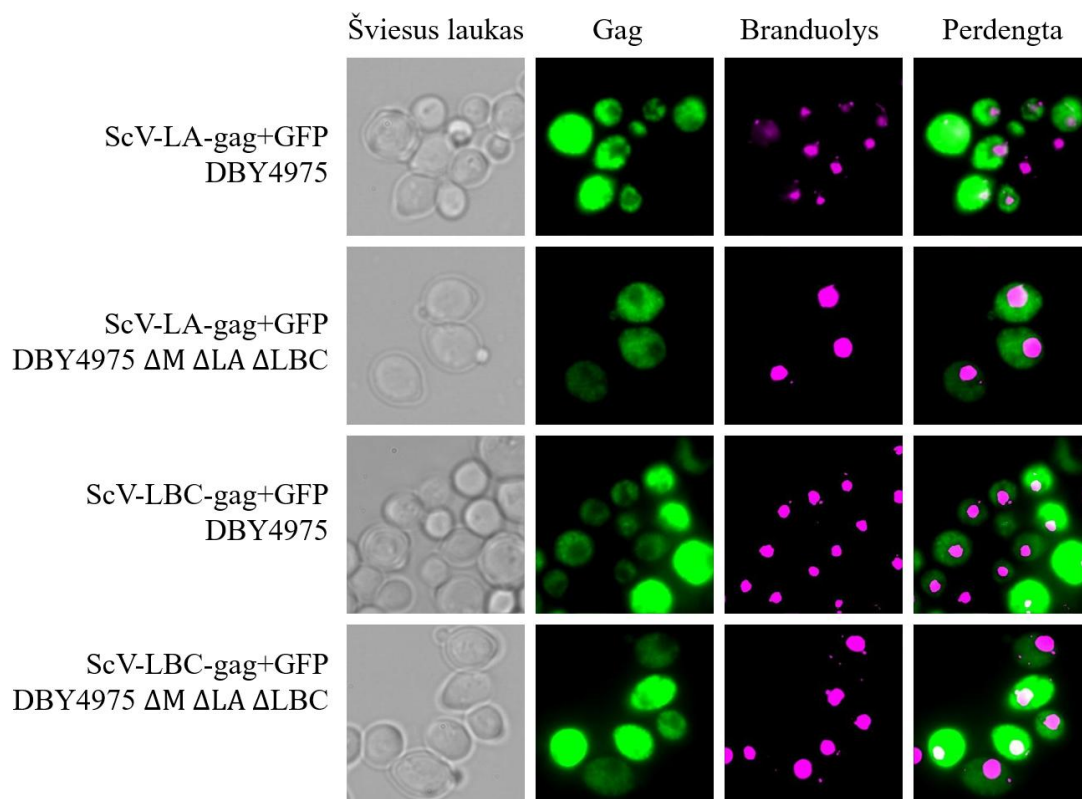
Lyginant ScV-LBC-gag-CFS+GFP baltymų lokalizaciją BY4741, BY4743 (**Pav. 3.6**) su BY4741 Δ LA Δ LBC ir BY4743 Δ LA Δ LBC kamienais (**Pav. 3.9**) pastebėta išimtis. Diploidiniame kamienė be virusų fluorescensija buvo silpna arba išvis neregistruojama. Priešingai haploidiniame kamienė be natyvių virusų Gag-CFS+GFP baltymai lokalizavosi sankaupose primenančiose pūsleles ir didesnėse sankaupose, kurios panašios į vakuoles.



Pav. 3.9 ScV-LA-gag-CFS+GFP ir ScV-LBC-gag-CFS+GFP koduojamų baltymų lokalizacijos palyginimas fiksuotose BY4741 Δ LA Δ LBC ir BY4743 Δ LA Δ LBC *S. cerevisiae* ląstelių kamienuose. Fluorescensinės mikroskopijos nuotraukose pateikiami ląstelių šviesaus lauko, Gag-CFS, branduolio žymos ir perdengimo kanalai. Žalia spalva žymi ScV-LA arba ScV-LBC kilmės Gag-CFS+GFP baltymus, rožinė žymi branduolius, nudažytus Hoechst 33342.

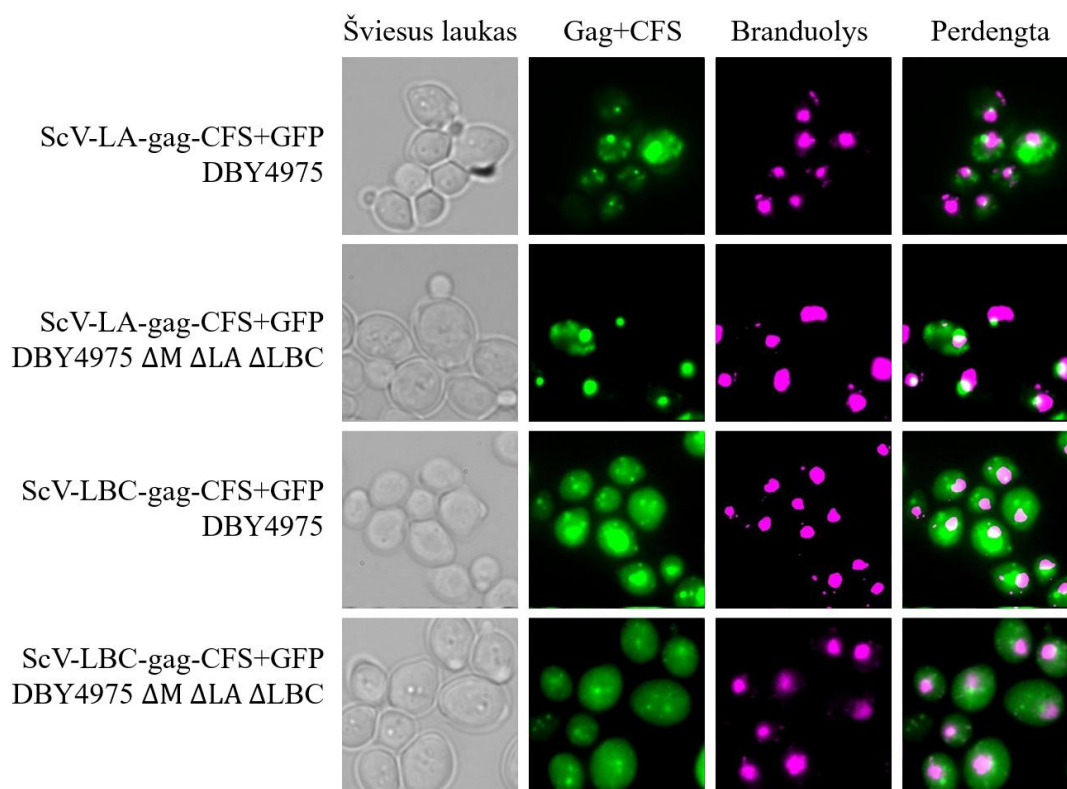
Siekiant ištirti ScV-M palydovo įtaką totivirusų gag+GFP ir gag-CFS+GFP baltymų lokalizaciją buvo naudojami DBY4975 ir DBY4975 Δ M Δ LA Δ LBC kamienai (**Pav. 3.10-3.11**). Nustatyta, kad ScV-LA ir ScV-LBC gag+GFP baltymams būdinga lokalizacija citoplazmoje (**Pav. 3.10**), DBY4975 ir DBY4975 Δ M Δ LA Δ LBC kamienų ląstelėse šie baltymai buvo pasklidę difuziškai. Nepriklausomai nuo ScV-M palydovo ScV-LA ir ScV-LBC tipo Gag+GFP baltymų lokalizacija išliko nepakitusi (**Pav. 3.11**). ScV-LA atveju baltymo sankaupos susirinko viename taške

šalia branduolio arba persidengiant su juo. ScV-LBC atveju baltymai kaupėsi mažose pūslelėse pasklidusiose citoplazmoje arba didesnėse struktūrose primenančiose vakuoles. Tai parodė, kad ScV-M palydovas ScV-LA-gag-CFS+GFP ir ScV-LBC-gag-CFS+GFP baltymų lokalizacijai įtakos nedaro.



Pav. 3.10 ScV-LA-gag+GFP ir ScV-LBC-gag+GFP koduojamų baltymų lokalizacijos palyginimas fiksuotose DBY4975 ir DBY4975 $\Delta M \Delta LA \Delta LBC$ *S. cerevisiae* lastelių kamienuose. Fluorescencinės mikroskopijos nuotraukose pateikiami ląstelių šviesaus lauko, Gag-CFS, branduolio žymos ir perdengimo kanalai. Žalia spalva žymi ScV-LA arba ScV-LBC kilmės Gag+GFP baltymus, rožinė žymi branduolius, nudažytus Hoechst 33342.

Apibendrinant, natyvių *S. cerevisiae* virusų eliminavimas iš BY4741 ir BY4743 kamienų akivaizdžios įtakos rekombinantinių ScV-LA ir ScV-LBC lokalizacijai neturėjo. ScV-LA-gag+GFP ir ScV-LBC-gag+GFP baltymai lokalizavosi citoplazmoje, o ScV-LA-gag+GFP baltymai nepriklausomai nuo natyvių totivirusų kaupėsi viename taške šalia branduolio arba persidengiant su juo. ScV-LBC-gag+GFP baltymai galimai lokalizavosi atskirose sankaupose, kurios pasklidusios po citoplazmą, išimtinai diploidiniame kamienne be virusų Gag baltymų lokalizacijos nepavyko nustatyti.

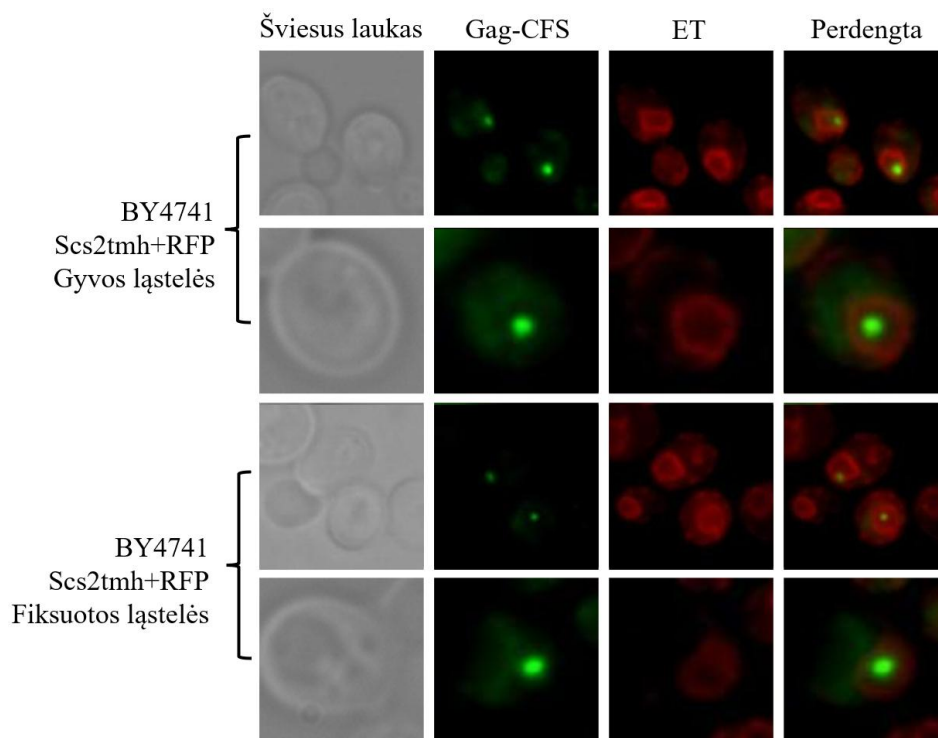


Pav. 3.11 ScV-LA-gag-CFS+GFP ir ScV-LBC-gag-CFS+GFP koduojamų baltymų lokalizacijos palyginimas fiksuotose DBY4975 ir DBY4975 $\Delta M \Delta LA \Delta LBC$ *S. cerevisiae* ląstelių kamienuose. Fluorescencinės mikroskopijos nuotraukose pateikiami ląstelių šviesaus lauko, Gag-CFS, branduolio žymos ir perdengimo kanalai. Žalia spalva žymi ScV-LA arba ScV-LBC kilmės Gag-CFS+GFP baltymus, rožinė žymi branduolius, nudažytus Hoechst 33342.

3.6. ScV-LA rekombinantinių baltymų kolokalizacija su ląstelės kompartmentais

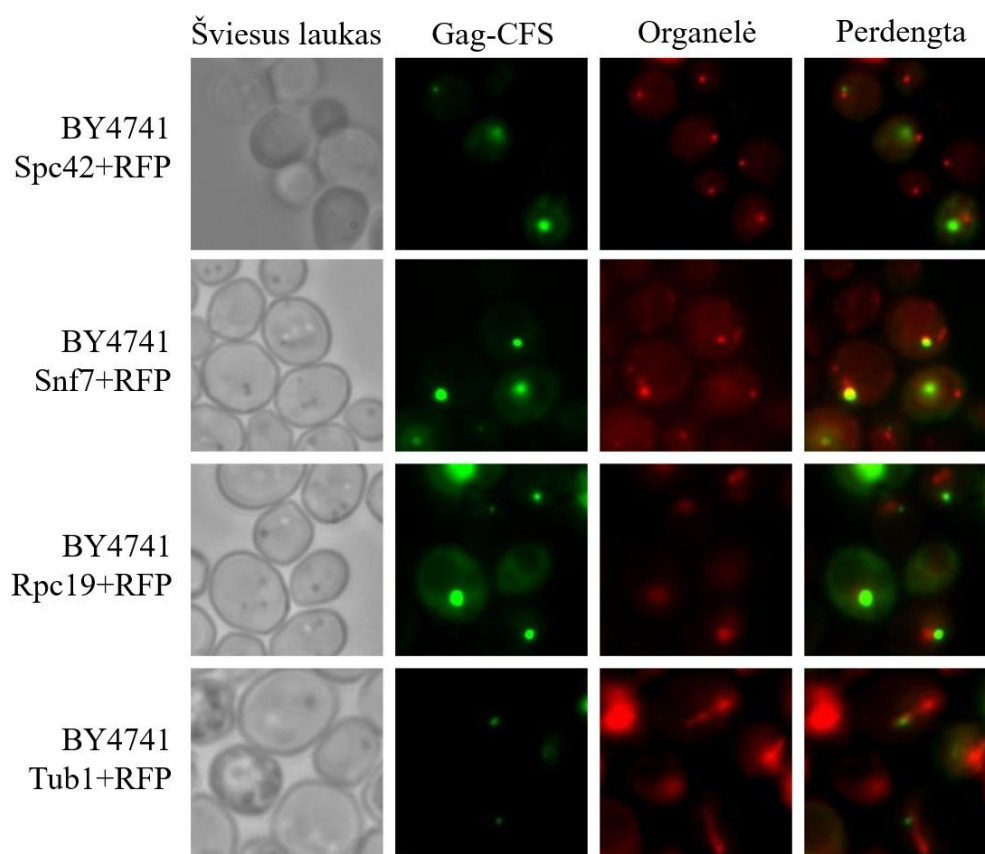
Platesniam kolokalizacijos tyrimui buvo pasirinkta pažymėti daugiau ląstelės kompartmentų fluorescencinėmis žymomis. Šiam tikslui pasirinkta naudoti CRISPR/Cas9 sistemą ir atlikti *S. cerevisiae* genomo redagavimą. BY4741 kamieno transformacijai buvo naudojamas linearizuotas pBBK11 plazmidinis vektorius ir atitinkama donorinė DNR kasetė koduojanti ląstelės kompartmento baltymą sulietą su RFP žyma (pBBK67, pBBK69, pBBK70, pBBK77, pBBK78, pBBK82). Vektoriaus koduojamas SpCas9 ir gRNR nukreipia donorinę kasetę į tikslinį FF18 genomo taikinį chrXV srityje. Donorinėje kasetėje koduojamos trumpos homologinės sritys HomL/HomR leidžiančios homologinės rekombinacijos būdu integruotis į genomą. Šio tyrimo metu buvo pažymėti: endoplazminis tinklas (Scs2tmh), SPB (Spc42), vėlyvojo goldžio/ESCRT-III komplekso komponentai (Snf7), branduolėlis (Rpc19), mikrovamzdeliai (Tub1) RFP fluorescuojančiais baltymais. Po transformacijos gauti BY4741 (Scs2tmh+RFP), BY4741 (Spc42+RFP), BY4741 (Snf7+RFP), BY4741 (Rpc42+RFP), BY4741 (Tub1+RFP), kamienai. Šie kamienai transformuoti ScV-LA-gag-CFS+GFP plazmidine DNR. Fluorescencinės analizės metu registruoti: Gag-CFS+GFP signalai per U-MWIBA filtrus, RFP signalai per U-MWG filtrus.

Interpretuojant ankstesnius rezultatus buvo pastebėta, kad ScV-LA-gag-CFS+GFP baltymams būdinga lokalizacija viename židinyje. Šio baltymo signalas susitelkė šalia branduolio arba persidengiant su jo žyma (**Pav. 3.4, Pav. 3.6, Pav. 3. 9, Pav. 3.11**). Siekiant nustatyti su kuriuo ląstelės kompartmentu galėtų būti susijusi ši lokalizacija buvo atlikta kokybinė kolokalizacijos analizė (**Pav. 3.12-3.13**).



Pav. 3.12 ScV-LA-gag-CFS+GFP koduojamų baltymų kolokalizacijos su Scs2tmh+RFP kokybinė analizė fiksuotose ir gyvose BY4741 (Scs2tmh+RFP) kamieno ląstelėse. Fluorescencinės mikroskopijos nuotraukose pateikiami šviesaus lauko, Gag-CFS, ET žymos ir perdengimo kanalai. Žalia spalva žymi ScV-LA-Gag+GFP, raudona – Scs2tmh+RFP.

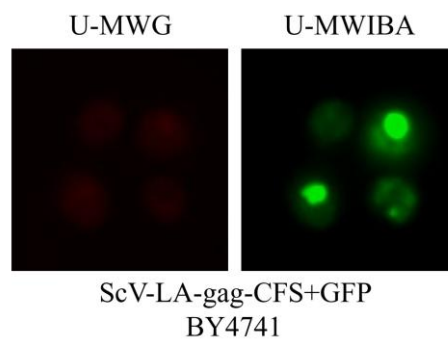
Scs2tmh-RFP atveju Gag baltymas buvo aptinkamas dviem būdais: persidengiant su ET struktūromis arba apsuptas ET aplinkos (**Pav. 3. 12**). Lyginat Gag-CFS+GFP signalą su Spc42-RFP baltymo žyma, pasitaikė atvejų kai žalias signalas buvo arti SPB žymos, tačiau stabilaus ir aiškaus šių signalų sutapimas nenustatytas (**Pav. 3. 13**). Snf7-RFP atveju Gag dalinai persidengė su vėlyvojo goldžio komplekso ECRT-III baltymais. Rpc19-RFP pažymėto branduolėlio atveju Gag+CFS signalas taip pat buvo matomas šalia arba persidengiant su juo (**Pav. 3. 13**).



Pav. 3.13 ScV-LA-gag-CFS+GFP koduojamų baltymų kolokalizacijos su ląstelės kompartmentais kokybinė analizė gyvose ląstelėse: BY4741 (Spc42+RFP), BY4741 (Snf7+RFP), BY4741 (Rpc19+RFP), BY4741 (Tub1+RFP). Fluorescencinės mikroskopijos nuotraukose pateikiami šviesaus lauko, Gag-CFS, Organelių ir perdengti vaizdai. Žalia spalva žymi ScV-LA-Gag+GFP, raudona – SPB (Spc42), vėlyvąjį goldžio kompleksą (Snf7), branduolėlį (Rpc19), mikrovamzdelius (Tub1).

Mikrovamzdelių žymėjimo Tub1+RFP atveju Gag-CFS signalas taip pat persidengė su mikrovamzdelių struktūromis. Gautus kolokalizacijos rezultatus reikia vertinti kritiškai, nes silpnas GFP signalas buvo registruojamas ir naudojant RFP filtrus (**Pav. 3. 14**). Kontrolei buvo mikroskopuojamas ir BY4741 kamienas be RFP žymos transformuotas ScV-LA-gag-CFS+GFP plazmidiniu vektoriumi. Rezultatai parodė, kad GFP signalas registruojamas ir per U-MWG filtrą, kas galimai iškreipė Rpc19 ir Snf7 kolokalizacijos rezultatus. Jei signalai persidengia, nėra aišku ar registruojami toje pačioje plokštumoje.

Apibendrinant, kokybinė ScV-LA-gag+GFP baltymo analizė BY4741 ląstelėse tikslios kolokalizacijos su tiriamomis kompartmentų žymėmis nebuvo nustatyta. Tačiau buvo pastebėta kolokalizacija su branduoliu, ET ir mikrovamzdeliais. Šių rezultatų patikslinimui būtų galima taikyti kitus mikroskopinės analizės metodus pvz.: konfokalinę mikroskopiją siekiant išgauti detalesnius 3D vaizdus. Taip pat būtų galima panaudoti papildomas ląstelės kompartmentų žymas.



Pav. 3.14 BY4741 kontrolė su ScV-LA-gag+CFS+GFP baltymu. Registruojamas signalo persišvietimas per U-MWG filtrus. Palyginima su GFP signalui registruoti naudojamais U-MWIBA filtrais.

4. Rezultatų aptarimas

S. cerevisiae yra ne tik plačiai naudojamas modelinis organizmas, bet ir endogeninių dgRNR virusų šeimininkė. Dauguma laboratorinių ar laukinio tipo mielių kamienų aptinkami totivirusai, tačiau jų viduląsteliniai mechanizmai nėra plačiai ištirtinėti. Todėl šio tyrimo metu buvo siekiama nustatyti galimus veiksnius lemiančius totivirusų ScV-LBC ir ScV-LA virusinių dalelių lokalizaciją *S. cerevisiae* ląstelėse. Tyrimo metu taip pat buvo analizuojami gag transliacijos produktai įvykus rėmelio poslinkiui. ScV-LBC ir ScV-LA virusinių kapsidžių lokalizacijos nustatymui *S. cerevisiae* mielėse buvo optimizuotas fiksuotų mėginių paruošimo metodas. Ląstelių ploidiskumo bei natyvių totivirusų įtakos ScV-LBC ir ScV-LA kilmės dalelių lokalizacijai tirti buvo sukonstruoti *S. cerevisiae* kamienai su skirtingų kompartmentų lokalizacijos žymomis (branduolio, ET, SPB, vėlyvojo goldžio komplekso, branduolėlio, mikrovamzdelių). Diploidinių ląstelių tyrimams buvo sukryžminti haploidiniai kamienai. Taip pat buvo atlikta sporuliacijos indukcija siekiant nustatyti ScV-LA ir ScV-LBC baltymų lokalizaciją sporose.

Pirmiausia buvo nustatyta, kad ScV-LA Gag+GFP baltymai lokalizuojasi citoplazmoje. Šie rezultatai dera su literatūros duomenimis – Gag baltymai nėra pasyvūs struktūriniai komponentai, jie gali savarankiškai formuoti kapsides be virusinio genomo. Literatūroje yra minima, kad prie Gag baltymo C-galo priliejus nedidelės molekulinės masės baltymą, citoplazmoje formuojasi į virusus panašių dalelių (VLP) struktūros (Celitan et al., 2024; Powilleit et al., 2007). Tačiau remiantis šio eksperimento rezultatais jų pasiskirstymo būdas gali būti susijęs ir su haploidine ląstelės būseną. ScV-LA-gag+GFP haploidiniame BY4741 kamienne buvo susidariusios sankaupos, o diploidiniame BY4743 kamienne arba kamienuose be natyvių totivirusų pasiskirstymas labiau difuzinis. Literatūroje minimas atvejis, kad ScV-LA tipo baltymai gali lokalizuotis grupėse ir galimai sąveikauti su transliacijos mechanizmo komponentais – iRNR, ribosomų sankaupomis ir neidentifikuotais baltymais (Schmidt et al., 2024), todėl šie rezultatai neprieštarauja aprašytoms tendencijoms. Diploidinėse ląstelėse galimai pakitusi transliacinė ir metabolinė aplinka netiesiogiai veikia ir ScV-LA dalelių išsidėstymą ląstelėje taip pat gali būti siejama ir su natyviais virusais ar nežinomomis rekombinantinių baltymų sąveikomis su virusinės kilmės citoplazminė RNR. Priešingai, ScV-LBC dalelių lokalizacija ląstelėje iki šiol literatūroje nėra aprašyta, tačiau remiantis gautais rezultatais pirmą kartą nustatyta, kad į virusus panašios dalelės kaupėsi citoplazmoje nepriklausomai nuo ląstelės ploidiskumo ar natyvių virusų eliminavimo.

Lokalizacijos skirtumai buvo pastebėti ScV-LA-gag-CFS+GFP ir ScV-LBC-gag-CFS+GFP baltymų analizės metu, tačiau išliko panašūs nepriklausomai nuo haploidinės arba diploidinės būsenos ir natyvių virusų aplinkos. Šių baltymų fluorescencijos signalas buvo silpnas, kas atitinka

literatūroje minima gag-pol raiškos mechanizmą: tik ~ 2 % transliacijų būdingas -1 ribosominis rėmelio poslinkis, lemiantis Gag-Pol produkto susidarymą (Dinman et al., 1991).

ScV-LA-gag-CFS+GFP signalas dažniausiai telkėsi viename židinyje šalia branduolio arba persidengiant su juo. Susigrupavimas viename taške funkciškai turėtų būti reikšmingas. Literatūroje aprašoma, kad L-A viruso Pol N-galinė sritis yra reikalinga virusinės RNR atpažinimui ir pakavimui, todėl tikėtina, kad šis fragmentas gali sąveikauti su RNR arba nežinomais baltymų kompleksais (Tsumotu Fujimura et al., 2019; Juan Carlos Ribas et al., 1994). Kokybiniai branduolio ir endoplazminio tinklo kolokalizacijos eksperimentai parodė, kad Gag translokacija į branduolį tikėtina, nes buvo paaiškintas endoplazminio tinklo išsidėstymas aplink Gag sandėliavimą. Po rėmelio poslinkio Pol N-galinėje srityje hidrofobinius motyvus pakeičia Arg ir Ser motyvai (RS). RS motyvai gali būti svarbūs translokacijai į branduolį, pavyzdžiui: importinų-β šeimos baltymas transportinas-SR2 sąveikauja su fosforilintais RS motyvais ir dalyvauja HIV-1 viruso dalelės translokacijoje į branduolį (Lai et al., 2001; Tabasi et al., 2021). Arginino motyvai didina teigiamą krūvį, todėl šis regionas gali sąveikauti su neigiamai įkrautomis molekulėmis pvz.: RNR, DNR (Bayer et al., 2005). Jei Gag kaupiasi šalia branduolio galimas ir kitas mechanizmas, kai į branduolį perduodamas tik viruso genomai. Literatūroje yra aprašomi totivirusų integracijos į ląstelės genomą atvejai (Huang et al., 2023; Ramírez et al., 2017; Taylor et al., 2009). Lokalizacija šalia branduolio arba persidengiant su juo gali turėti panašumų ir su *S. cerevisiae* Ty1 retrotranspozono replikacijos ciklu. Literatūroje aprašoma, kad Ty1 Gag baltymai lokalizuojasi viename taške šalia ET, ši lokalizacija susijusi su SRP ir gali inicijuoti retrovirusų susidarymą (Doh et al., 2014; Pachulska-Wieczorek et al., 2016). Informacija apie Ty1 sutampa ir su šiuo darbu gautais kolokalizacijos rezultatais. Šių rezultatų patvirtinimui ateityje būtų galima pritaikyti tikslesnį mikroskopijos metodą pvz.: konfokalinę mikroskopiją.

ScV-LBC-gag-CFS+GFP lokalizacija skyrėsi nuo ScV-LA-gag-CFS+GFP. ScV-LBC atveju Gag baltymai buvo pasklidę po citoplazmą mažose pūslelėse. Tai reiškia, kad ScV-LA ir ScV-LBC Pol N-galo fragmentai gali nevienodai veikti baltymų organizaciją ląstelėje. Tai neprieštarauja su literatūroje aprašytomis šių virusų funkcinėmis savybėmis: L-A veikia kaip pagalbinis virusas M palydovams, o L-BC funkcionalumas nėra žinoma, tačiau L-BC pasižymi savarankiška replikacija ląstelėje (Grybchuk et al., 2022b; Ramírez et al., 2022a; Wickner et al., 2013a). Tai gali reikšti, kad ScV-LA ir ScV-LBC lokalizaciją gali lemti skirtingi viduląsteliniai veiksniai. Tiriant rekombinantinius baltymus šiuos rezultatus reikėtų vertinti kritiškai, nes ScV-LBC-gag-CFS+GFP baltymų lokalizacija panaši ir į baltymų kokybės kontrolės/agregacijos keliamas būdingas sandėliavimas. Mielėse neteisingai susilankstę arba linkę agreguotis baltymai gali būti nukreipiami link kokybės kontrolės mechanizmų (Miller et al., 2015).

Gauti rezultatai taip pat suteikia naujų įžvalgų apie ScV-LA viruso plitimą. Nes buvo pastebėtas ScV-LA-gag-CFS+GFP persidengimas su mikrovamzdelių baltymais (Tub1). Galimai ScV-LA-Gag

baltymai gali būti perduodami į dukterines ląsteles arba sporas, prisijungus prie ląstelės skeleto arba kartu su ET ir branduolio periferija.

Deja, tyrimo metu sporose nepavyko identifikuoti branduolio (HTA2+mCherry) kolokalizacijos žymos. Tai galėjo lemti storesnė sporų sienelės struktūra – ditirozino sluoksnis. Visų pirma subrendusios sporos turi storesnę ir mažiau pralaidžią sienelę, todėl silpnesni fluorescensiniai signalai galėjo nesimatyti, tokiu atveju būtų galima banduti optimizuoti šį metodą, padidinant sporų pralaidumą arba pasirenkant kitokio tipo kolokalizacijos žymas (Suda et al., 2009).

Taigi, rezultatai suteikia naujų įžvalgų apie veiksnius lemiančius ScV-LA ir ScV-LBC viduląstelinę organizaciją, nežinomas sąveikas ir plitimą. Galimai totivirusų ir *S. cerevisiae* evoliucinis ryšys yra žymiai kompleksiškesnis nei buvo manyta iki šiol. Šie tyrimai išplečia mielių totivirusų sampratą ir prisideda prie platesnio supratimo, kaip dgRNR virusai gali prisitaikyti prie eukariotinių ląstelių viduląstelinės aplinkos.

Išvados

1. Palyginus ScV-LA ir ScV-LBC Gag sekas nustatyta, kad -1 ribosominio rėmelio poslinkis pakeičia baltymo C-galo aminorūgščių sudėtį bei fragmento fizikochemines savybes.
2. ScV-LA ir ScV-LBC kapsidės lokalizuotos citoplazmoje, tačiau įvykus -1 ribosominio rėmelio poslinkiui ScV-LA kapsidės kaupiasi viename židinyje branduolio periferijoje, o ScV-LBC formuoja granuliuotas struktūras citoplazmoje.
3. ScV-LA ir ScV-LBC Gag baltymų lokalizacija nepriklauso nuo *S. cerevisiae* haploidinės ir diploidinės būsenos, tačiau sporuliacija galimai paveikia Gag baltymų pasiskirstymą ląstelėje.
4. Natyvūs totivirusai nedaro įtakos ScV-LA ir ScV-LBC virusinių dalelių lokalizacijai *S. cerevisiae*.
5. ScV-LA Gag baltymai galimai sąveikauja su endoplazminiu tinklu ir mikrovamzdelių struktūromis bei patenka į branduolį.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Elžbieta Žukaitė

Magistro baigiamasis darbas

Totivirusų lokalizacijos šeimininko ląstelėje veiksmų paieška

SANTRAUKA

Saccharomyces cerevisiae yra plačiai naudojamas organizmas įvairiose pramonės ir mokslo srityse. Daugelyje *S. cerevisiae* kamienų gali būti aptinkami *Orthototiviridae* šeimos virusai, įskaitant ScV-LA, ScV-LBC ir nuo ScV-LA priklausomus ScV-M palydovus. Šie virusai gali būti susiję su ląstelės šeimininkės fenotipu ir daryti įtaką mielių populiacijų evoliucinei dinamikai. Pavyzdžiui, ScV-M palydovo ir ScV-LA koegzistavimas yra pagrindinis veiksnys, lemiantis mielių biocidinį aktyvumą. Šie virusai neturi ekstraląstelinės fazės ir gali plisti tik ląstelės pasidalijimo metu.

Anksčiau buvo manoma, kad ScV-LA ir ScV-LBC virusai neturi aiškaus poveikio *S. cerevisiae*, tačiau pastarojo dešimtmečio tyrimai parodė, kad totivirusų sąveika su ląstele šeimininke yra sudėtingesnė. ScV-LA gali būti susijęs su *S. cerevisiae* genų raiškos, medžiagų apykaitos ir antivirusinių sistemų pokyčiais. Tai reiškia, kad įvairūs ląstelės kompartmentai galimai tiesiogiai arba netiesiogiai sąveikauja su totivirusais, tačiau apie ScV-LA ir ScV-LBC translokaciją ląstelėse iki šiol nėra žinoma.

Šio darbo metu siekiama nustatyti galimus ScV-LA ir ScV-LBC viruso kapsidės baltymų lokalizacijos veiksmus *S. cerevisiae* ląstelėse. Tyrimams buvo pasirinkta atlikti rekombinantinių ScV-LA ir ScV-LBC Gag baltymų lokalizacijos analizę fluorescencinės mikroskopijos būdu. Tyrimo metu buvo nustatyta, kad -1 ribosominio rėmelio poslinkis pakeičia ScV-LA ir ScV-LBC Gag baltymo C-galo fragmentų amino rūgščių sudėtį bei biochemines savybes. Galimai šie pokyčiai gali būti susiję su baltymų translokacija. Neįvykus ribosominiam rėmelio poslinkiui Gag baltymai kaupiasi citoplazmoje, tačiau įvykus -1 ribosominiam rėmelio poslinkiui ScV-LA Gag baltymai lokalizuojasi branduolyje arba šalia jo persidengiant su endoplazminiu tinklu, mikrovamzdelių struktūromis. Skirtingai nuo ScV-LA, ScV-LBC Gag baltymai įvykus -1 ribosominiam rėmelio poslinkiui lokalizuojasi pūsleles primenančiose struktūrose, pasklidusiose citoplazmoje. Taip pat nustatyta, kad natyvių totivirusų buvimas ir *S. cerevisiae* ploidiskumas nedaro įtakos ScV-LA ir ScV-LBC Gag baltymų lokalizacijai.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Elžbieta Žukaitė

Search for Factors of Totivirus Localization in the Host Cell

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae is a widely used organism in various industrial and scientific fields. Viruses of *Orthototiviridae* family, including ScV-LA, ScV-LBC and ScV-M satellites can be found in many *S. cerevisiae* strains. These viruses may be associated with the host cell's phenotype and influence the evolutionary dynamics of yeast populations. For example, the coexistence of the ScV-M satellite and helper ScV-LA is a key factor determining the yeast's killer activity. Totiviruses lack an extracellular phase and can only replicate during cell division.

It was previously thought that ScV-LA and ScV-LBC viruses had no clear effect on *S. cerevisiae*, but over the past decade it was shown that the interaction of Totiviruses with the host cell is more complex. ScV-LA may be associated with changes in *S. cerevisiae* gene expression, metabolism and antiviral systems. This implies that various cellular compartments may directly or indirectly interact with Totiviruses. However, the translocation of ScV-LA and ScV-LBC within cells remains unknown.

The aim of this study is to identify potential factors influencing the localization of ScV-LA and ScV-LBC viral capsid proteins in *S. cerevisiae* cells. The study involved an analysis of the localization of recombinant ScV-LA and ScV-LBC Gag proteins using fluorescence microscopy. This study revealed that a shift in the -1 ribosomal frame alters the amino acid composition and biochemical properties of the C-terminal fragments of the ScV-LA and ScV-LBC Gag proteins. These changes may be related to protein translocation. In the absence of a -1 ribosomal frameshift, Gag proteins accumulate in the cytoplasm. However, upon occurrence of a -1 ribosomal frameshift, ScV-LA Gag proteins localize in or near nucleus in addition overlapping with endoplasmic reticulum and microtubule structures. Unlike ScV-LA, ScV-LBC Gag proteins following -1 ribosomal frameshift localize in vesicle-like structures scattered throughout the cytoplasm. It has also been found that the native Totiviruses or ploidy in *S. cerevisiae* does not affect localization of ScV-LA and ScV-LBC Gag proteins.

Autoriaus asmeninis indėlis

Tyrimų kryptį sugalvojo darbo vadovė dokt. Gerda Jasinevičienė, dr. Aleksandras Konovalovas ir prof. Saulius Serva. Darbo pavadinimą, tikslą, uždavinius ir analizės metodus padėjo parinkti dokt. Gerda Jasinevičienė.

Šio darbo metu buvo savarankiškai atlikta: literatūros analizė, tirpalų ir terpių gamyba, *S. cerevisiae* kamienų konstravimas BY4741 Δ LA Δ LBC (HTA2+mCherry), BY4742 (HTA2+mCherry), BY4742 Δ LA Δ LBC (HTA2+mCherry), BY4743 (HTA2+mCherry), BY4743 Δ LA Δ LBC (HTA2+mCherry), BY4741 (Rpc19+RFP), BY4741 (Spc42+RFP), BY4741 (Tub1+RFP), BY4741 (Scs2tmh+RFP), BY4741 (Snf7+RFP), plazmidinių vektorių konstravimas (pYAK3-LBC+GFP ir pYAK3-LBC-CFS+GFP), metoduose išvardyti eksperimentai, ScV-LA ir ScV-LBC Gag baltymų C-galo amino rūgščių analizė, rezultatų analizė ir interpretavimas.

Eksperimentų metodai ir jų sąlygos buvo parinktos kartu su dokt. Gerda Jasinevičiene iš bendros laboratorijoje optimizuotų darbų kolekcijos.

Padėka

Dėkoju prof. Sauliui Servai už suteiktą galimybę atlikti tyrimus mokslinėje laboratorijoje ir kuriamą komandinę atmosferą. Taip pat dėkoju už taiklius pastebėjimus ir nuoširdžius patarimus.

Labai nuoširdžiai dėkoju savo darbų vadovei dokt. Gerdai Jasinevičienei už suteiktą galimybę kartu bendradarbiauti mokslinėse paieškose. Taip pat labai ačiū už geležinę kantrybę, rūpestį, pasitikėjimą, palaikymą, supratingumą ir svarbiausiai konstruktyvią kritiką.

Dėkoju laboratorijos kolegoms, dr. Enrikai Celitan, dr. Algirdui Mikalkėnui, dr. Aleksandrui Konovalovui, Kamilei Vaišaiti, Laurai Plakytei ir visai Biochemijos ir molekulinės biologijos katedrai už praktines pamokas, pagalbą ir rūpestį.

Literatūros sąrašas

- Aitmanaitė, L., Konovalovas, A., Medvedevas, P., Servienė, E., & Serva, S. (2021). Specificity Determination in *Saccharomyces cerevisiae* Killer Virus Systems. *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 236, 9(2), 236. doi: 10.3390/MICROORGANISMS9020236
- Akinyemi, I. A., Wang, F., Chang, Z. X., & Wu, Q. (2018). Genome characterization of the newly identified maize-associated totivirus Anhui. *Archives of Virology*, 163(10), 2929–2931. doi: 10.1007/S00705-018-3929-0
- Alves-Rodrigues, I., Galão, R. P., Meyerhans, A., & Díez, J. (2006). *Saccharomyces cerevisiae*: A useful model host to study fundamental biology of viral replication. *Virus Research*, 120(1–2), 49–56. doi: 10.1016/J.VIRUSRES.2005.11.018
- Aviram, N., Ast, T., Costa, E. A., Arakel, E. C., Chuartzman, S. G., Jan, C. H., Haßdenteufel, S., Dudek, J., Jung, M., Schorr, S., Zimmermann, R., Schwappach, B., Weissman, J. S., & Schuldiner, M. (2016). The SND proteins constitute an alternative targeting route to the endoplasmic reticulum. *Nature* 2016 540:7631, 540(7631), 134–138. doi: 10.1038/nature20169
- Ball, S. G., Tirtiaux, C., & Wickner, R. B. (1984). GENETIC CONTROL OF L-A AND L-(BC) dsRNA COPY NUMBER IN KILLER SYSTEMS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. *Genetics*, 107(2), 199–217. doi: 10.1093/GENETICS/107.2.199
- Bayer, T. S., Booth, L. N., Knudsen, S. M., & Ellington, A. D. (2005). Arginine-rich motifs present multiple interfaces for specific binding by RNA. *RNA*, 11(12), 1848. doi: 10.1261/RNA.2167605
- Bean, B. D. M., Whiteway, M., & Martin, V. J. J. (2022). The MyLO CRISPR-Cas9 toolkit: a markerless yeast localization and overexpression CRISPR-Cas9 toolkit. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 12(8). doi: 10.1093/G3JOURNAL/JKAC154
- Becker, B., & Schmitt, M. J. (2017). Yeast Killer Toxin K28: Biology and Unique Strategy of Host Cell Intoxication and Killing. *Toxins*, 9(10). doi: 10.3390/TOXINS9100333
- Bevan, E. A., Herring, A. J., & Mitchell, D. J. (1973). Preliminary Characterization of Two Species of dsRNA in Yeast and their Relationship to the “Killer” Character. *Nature* 1973 245:5420, 245(5420), 81–86. doi: 10.1038/245081b0
- Blanc, A., Ribas, J. C., Wickner, R. B., & Sonenberg, N. (1994). His-154 is involved in the linkage of the *Saccharomyces cerevisiae* L-A double-stranded RNA virus Gag protein to the cap structure of mRNAs and is essential for M1 satellite virus expression. *Molecular and Cellular Biology*, 14(4), 2664. doi: 10.1128/MCB.14.4.2664

- Boob, A. G., Tan, S. I., Zaidi, A., Singh, N., Xue, X., Zhou, S., Martin, T. A., Chen, L. Q., & Zhao, H. (2025). Design of diverse, functional mitochondrial targeting sequences across eukaryotic organisms using variational autoencoder. *Nature Communications* 2025 16:1, 16(1), 4151-. doi: 10.1038/s41467-025-59499-3
- Boynton, P. J. (2019). The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. *Yeast (Chichester, England)*, 36(8), 473–485. doi: 10.1002/yea.3398
- Breckel, C. A., Johnson, Z. M., Hickey, C. M., & Hochstrasser, M. (2024). Yeast 26S proteasome nuclear import is coupled to nucleus-specific degradation of the karyopherin adaptor protein Sts1. *Scientific Reports* 2024 14:1, 14(1), 2048-. doi: 10.1038/s41598-024-52352-5
- Budenholzer, L., Breckel, C., Hickey, C. M., & Hochstrasser, M. (2020). The Sts1 nuclear import adapter uses a non-canonical bipartite nuclear localization signal and is directly degraded by the proteasome. *Journal of Cell Science*, 133(6), jcs236158. doi: 10.1242/JCS.236158
- CASPAR, D. L., & KLUG, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 27, 1–24. doi: 10.1101/SQB.1962.027.001.005
- Celitan, E., Stanevičienė, R., Servienė, E., & Serva, S. (2024). Highly stable *Saccharomyces cerevisiae* L-BC capsids with versatile packing potential. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1456453. doi: 10.3389/fbioe.2024.1456453
- Chau, S., Gao, J., Diao, A. J., Cao, S. B., Azhieh, A., Davidson, A. R., & Meneghini, M. D. (2023). Diverse yeast antiviral systems prevent lethal pathogenesis caused by the L-A mycovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(11), e2208695120. doi: 10.1073/PNAS.2208695120;ISSUE:ISSUE:DOI
- Cheng, C. H., Lo, Y. H., Liang, S. S., Ti, S. C., Lin, F. M., Yeh, C. H., Huang, H. Y., & Wang, T. F. (2006). SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 20(15), 2067. doi: 10.1101/GAD.1430406
- Chowdhury, M. N., & Jin, H. (2023). The RGG motif proteins: Interactions, functions, and regulations. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 14(1), e1748. doi: 10.1002/WRNA.1748;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION
- Crabtree, A. M., Taggart, N. T., Lee, M. D., Boyer, J. M., & Rowley, P. A. (2023). The prevalence of killer yeasts and double-stranded RNAs in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 23. doi: 10.1093/FEMSYR/FOAD046
- Dekker, M., de Vries, H. W., Wortelboer, K. A., Beekhuis, H. J., van Oosterhout, M. G. J. E., Van der Giessen, E., & Onck, P. R. (2025). Kap-centric Nsp1-mediated nuclear transport at

- full amino acid resolution. *Nature Communications* 2025 16:1, 16(1), 11497-. doi: 10.1038/s41467-025-66329-z
- Dinman, J. D., Icho, T., & Wickner, R. B. (1991a). A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(1), 174–178. doi: 10.1073/PNAS.88.1.174
- Dinman, J. D., Icho, T., & Wickner, R. B. (1991b). A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(1), 174. doi: 10.1073/pnas.88.1.174
- Dinman, J. D., & Wickner, R. B. (1992). Ribosomal Frameshifting Efficiency and gag/gag-pol Ratio Are Critical for Yeast M1 Double-Stranded RNA Virus Propagation. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 66, Issue 6). Retrieved from <https://journals.asm.org/journal/jvi>
- Doh, J. H., Lutz, S., & Curcio, M. J. (2014). Co-translational Localization of an LTR-Retrotransposon RNA to the Endoplasmic Reticulum Nucleates Virus-Like Particle Assembly Sites. *PLOS Genetics*, 10(3), e1004219. doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1004219
- Drinnenberg, I. A., Fink, G. R., & Bartel, D. P. (2011). Compatibility with killer explains the rise of RNAi-deficient fungi. *Science*, 333(6049), 1592. doi: 10.1126/SCIENCE.1209575;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION
- Durant, M., Mucelli, X., & Huang, L. S. (2024). Meiotic Cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Spores That Just Need Closure. *Journal of Fungi* 2024, Vol. 10, Page 132, 10(2), 132. doi: 10.3390/JOF10020132
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M., Ayele, M., Gibbs, R. A., Csörgo, B., Pósfai, G., Weinstock, G. M., & Blattner, F. R. (2008). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2597. doi: 10.1128/JB.01695-07
- Family: Orthototiviridae (Interim Report) | ICTV*. (n.d.). Retrieved from <https://ictv.global/report/chapter/orthototiviridae/orthototiviridae>
- Finley, D., Ulrich, H. D., Sommer, T., & Kaiser, P. (2012). The Ubiquitin–Proteasome System of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 192(2), 319. doi: 10.1534/GENETICS.112.140467
- Franić, D., Zubčić, K., & Boban, M. (2021). Nuclear Ubiquitin-Proteasome Pathways in Proteostasis Maintenance. *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 54, 11(1), 54. doi: 10.3390/BIOM11010054

- Fujimura, T., Esteban, R., & Wickner, R. B. (1986). In vitro L-A double-stranded RNA synthesis in virus-like particles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12), 4433–4437. doi: 10.1073/PNAS.83.12.4433;ISSUE:ISSUE:DOI
- Fujimura, Tsutomu, & Esteban, R. (2011a). Cap-snatching mechanism in yeast L-A double-stranded RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43), 17667–17671. doi: 10.1073/PNAS.1111900108;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Fujimura, Tsutomu, & Esteban, R. (2011b). Cap-snatching mechanism in yeast L-A double-stranded RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43), 17667–17671. doi: 10.1073/pnas.1111900108
- Fujimura, Tsutomu, & Esteban, R. (2019). The cap-snatching reaction of yeast L-A double-stranded RNA virus is reversible and the catalytic sites on both Gag and the Gag domain of Gag-Pol are active. *Molecular Microbiology*, 111(2), 395–404. doi: 10.1111/MMI.14161;ISSUE:ISSUE:DOI
- Fung, H. Y. J., Mittal, S. R., Niesman, A. B., Jiou, J., Shakya, B., Yoshizawa, T., Cansizoglu, A. E., Rout, M. P., & Chook, Y. M. (2025). Phosphate-dependent nuclear export via a non-classical NES class recognized by exportin Msn5. *Nature Communications* 2025 16:1, 16(1), 2580-. doi: 10.1038/s41467-025-57752-3
- Galao, R. P., Scheller, N., Alves-Rodrigues, I., Breinig, T., Meyerhans, A., & Díez, J. (2007). *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile eukaryotic system in virology. *Microbial Cell Factories* 2007 6:1, 6(1), 32-. doi: 10.1186/1475-2859-6-32
- Galli, M., Sede, A., Heinlein, M., & Kogel, K. H. (2025). A biocontrol perspective on mycoviruses in fungal pathogen management. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 132(1), 43-. doi: 10.1007/S41348-024-01006-9/FIGURES/3
- Gao, J., Chau, S., & Meneghini, M. D. (2019). Viral attenuation by Endonuclease G during yeast gametogenesis: insights into ancestral roles of programmed cell death? *Microbial Cell (Graz, Austria)*, 7(2), 32–35. doi: 10.15698/MIC2020.02.705
- Gaynor, E. C., Te Heesen, S., Graham, T. R., Aebi, M., & Emr, S. D. (1994). Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast. *Journal of Cell Biology*, 127(3), 653–665. doi: 10.1083/JCB.127.3.653
- Goffeau, A., Barrell, G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546–567.

- doi: 10.1126/SCIENCE.274.5287.546;JOURNAL:JOURNAL:SCIENCE;WGROUP:STRING:PUBLICATION
- Gomkale, R., Cruz-Zaragoza, L. D., Suppanz, I., Guiard, B., Montoya, J., Callegari, S., Pacheu-Grau, D., Warscheid, B., & Rehling, P. (2020). Defining the Substrate Spectrum of the TIM22 Complex Identifies Pyruvate Carrier Subunits as Unconventional Cargos. *Current Biology*, 30(6), 1119-1127.e5. doi: 10.1016/j.cub.2020.01.024
- Gomkale, R., Linden, A., Neumann, P., Schendzielorz, A. B., Stoldt, S., Dybkov, O., Kilisch, M., Schulz, C., Cruz-Zaragoza, L. D., Schwappach, B., Ficner, R., Jakobs, S., Urlaub, H., & Rehling, P. (2021). Mapping protein interactions in the active TOM-TIM23 supercomplex. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 5715-. doi: 10.1038/s41467-021-26016-1
- Grybchuk, D., Procházková, M., Füzik, T., Konovalovas, A., Serva, S., Yurchenko, V., & Plevka, P. (2022a). Structures of L-BC virus and its open particle provide insight into Totivirus capsid assembly. *Communications Biology* 2022 5:1, 5(1), 1–10. doi: 10.1038/s42003-022-03793-z
- Grybchuk, D., Procházková, M., Füzik, T., Konovalovas, A., Serva, S., Yurchenko, V., & Plevka, P. (2022b). Structures of L-BC virus and its open particle provide insight into Totivirus capsid assembly. *Communications Biology* 2022 5:1, 5(1), 847-. doi: 10.1038/s42003-022-03793-z
- Horák, J. (1991). Protein transport and compartmentation in yeast. *Folia Microbiologica* 1991 36:1, 36(1), 3–34. doi: 10.1007/BF02935819
- Hough, B., Steenkamp, E., Wingfield, B., & Read, D. (2023). Fungal Viruses Unveiled: A Comprehensive Review of Mycoviruses. *Viruses*, 15(5). doi: 10.3390/V15051202
- Hsiao, W. Y., Yeh, C. S., Liu, H. I., Tung, L., & Chang, T. H. (2025). Genome-wide screen uncovers novel host factors for L-A virus maintenance and a potential mutualistic-symbiosis relationship in yeast. *BMC Microbiology*, 25(1), 729. doi: 10.1186/s12866-025-04491-6
- Huang, H. J., Li, Y. Y., Ye, Z. X., Li, L. L., Hu, Q. L., He, Y. J., Qi, Y. H., Zhang, Y., Li, T., Lu, G., Mao, Q. Z., Zhuo, J. C., Lu, J. B., Xu, Z. T., Sun, Z. T., Yan, F., Chen, J. P., Zhang, C. X., & Li, J. M. (2023). Co-option of a non-retroviral endogenous viral element in planthoppers. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 7264-. doi: 10.1038/s41467-023-43186-2
- Hwang, E., Kusch, J., Barral, Y., & Huffaker, T. C. (2003). Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *Journal of Cell Biology*, 161(3), 483–488. doi: 10.1083/JCB.200302030

- Ilca, S. L., Sun, X., Kumpula, E. P., Eskelin, K., Stuart, D. I., Poranen, M. M., & Huiskonen, J. T. (2026). Capsid restructuring activates semi-conservative dsRNA transcription in cysto-virus $\phi 6$. *Molecular Cell*, 86(2). doi: 10.1016/j.molcel.2025.12.025
- Kaffman, A., Rank, N. M., & O'Shea, E. K. (1998). Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes & Development*, 12(17), 2673–2683. doi: 10.1101/GAD.12.17.2673
- Kondo, H., Botella, L., & Suzuki, N. (2022). Mycovirus Diversity and Evolution Revealed/Inferred from Recent Studies. *Annual Review of Phytopathology*, 60, 307–336. doi: 10.1146/ANNUREV-PHYTO-021621-122122
- Kozai, T., Fernandez-Martinez, J., Kapinos, L. E., Gallardo, P., van Eeuwen, T., Saladin, M., Eliasian, R., Mazur, A., Zhang, W., Tempkin, J., Panatala, R., Delgado-Izquierdo, M., Escri-bano-Marin, R., Feng, Q., Lin, C., Sali, A., Chait, B. T., Raveh, B., Veenhoff, L. M., ... Lim, R. Y. H. (2025). Karyopherins remodel the dynamic organization of the nuclear pore comp-lex transport barrier. *Nature Cell Biology* 2025 27:12, 27(12), 2089–2101. doi: 10.1038/s41556-025-01812-9
- Kumar, A., Mathew, V., & Stirling, P. C. (2024). Dynamics of DNA damage-induced nuclear inclusions are regulated by SUMOylation of Btn2. *Nature Communications* 2024 15:1, 15(1), 3215-. doi: 10.1038/s41467-024-47615-8
- Lai, M. C., Lin, R. I., & Tarn, W. Y. (2001). Transportin-SR2 mediates nuclear import of phos-phorylated SR proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10154. doi: 10.1073/PNAS.181354098
- Lange, A., Mills, R. E., Devine, S. E., & Corbett, A. H. (2008). A PY-NLS nuclear targeting signal is required for nuclear localization and function of the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA-binding protein Hrp1. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 12926–12934. doi: 10.1074/jbc.M800898200
- Le Lay, C., Hamm, J. N., Williams, T. J., Shi, M., Cavicchioli, R., & Holmes, E. C. (2023). Viral community composition of hypersaline lakes. *Virus Evolution*, 9(2). doi: 10.1093/VE/VEAD057
- Liu, H., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Xie, J., Cheng, J., Peng, Y., Ghabrial, S. A., & Yi, X. (2010). Widespread horizontal gene transfer from double-stranded RNA viruses to eukaryotic nuclear genomes. *Journal of Virology*, 84(22), 11876–11887. doi: 10.1128/jvi.00955-10
- Lukša, J., Celitan, E., Servienė, E., & Serva, S. (2022). Association of ScV-LA Virus with Host Protein Metabolism Determined by Proteomics Analysis and Cognate RNA Sequencing. *Viruses*, 14(11), 2345. doi: 10.3390/V14112345/S1

- Lukša, J., Ravoitytė, B., Aitmanaitė, A., Lina, K., Butenko, A., Yurchenko, V., Serva, S., & Servienė, E. (2017). Different Metabolic Pathways Are Involved in Response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and M Viruses. *Toxins*, 9(8). doi: 10.3390/toxins9080233
- Luque, D., Mata, C. P., Suzuki, N., Ghabrial, S. A., & Castón, J. R. (2018). Capsid Structure of dsRNA Fungal Viruses. *Viruses*, 10(9), 481. doi: 10.3390/v10090481
- Manatschal, C., Farcas, A. M., Degen, M. S., Bayer, M., Kumar, A., Landgraf, C., Volkmer, R., Barral, Y., & Steinmetz, M. O. (2016). Molecular basis of Kar9-Bim1 complex function during mating and spindle positioning. *Molecular Biology of the Cell*, 27(23), 3729–3745. doi: 10.1091/MBE.16-07-0552;JOURNAL:JOURNAL:MBOC;ISSUE:ISSUE:DOI
- Mcbride, R. C., Boucher, N., Park, D. S., Turner, P. E., & Townsend, J. P. (2013). Yeast response to LA virus indicates coadapted global gene expression during mycoviral infection. *FEMS Yeast Research*, 13(2), 162–179. doi: 10.1111/1567-1364.12019
- Merkaš, M., Grujicic, N., Geier, M., Glieder, A., & Emmerstorfer-Augustin, A. (2025). The MF α signal sequence in yeast-based protein secretion: challenges and innovations'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2025 109:1, 109(1), 138-. doi: 10.1007/S00253-025-13532-Z
- Miller, S. B., Ho, C., Winkler, J., Khokhrina, M., Neuner, A., Mohamed, M. Y., Guilbride, D. L., Richter, K., Lisby, M., Schiebel, E., Mogk, A., & Bukau, B. (2015). Compartment-specific aggregates direct distinct nuclear and cytoplasmic aggregate deposition. *The EMBO Journal*, 34(6), 778–797. doi: 10.15252/EMBJ.201489524
- Mordas, A., & Tokatlidis, K. (2015). The MIA Pathway: A Key Regulator of Mitochondrial Oxidative Protein Folding and Biogenesis. *Accounts of Chemical Research*, 48(8), 2191–2199. doi: 10.1021/ACS.ACCOUNTS.5B00150
- Muccilli, S., & Restuccia, C. (2015). Bioprotective Role of Yeasts. *Microorganisms*, 3(4), 588. doi: 10.3390/microorganisms3040588
- Myers, J. M., & James, T. Y. (2022). Mycoviruses. *Current Biology*, 32(4), R150–R155. doi: 10.1016/j.cub.2022.01.049
- Neiman, A. M. (2011). Sporulation in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 189(3), 737–765. doi: 10.1534/GENETICS.111.127126
- Ng, D. T. W., Brown, J. D., & Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Cell Biology*, 134(2), 269–278. doi: 10.1083/JCB.134.2.269
- Okada, E., Chiyoda, K., Inoue, K. S., Yamasaki, K., Takata, M., Satoh, T., & Koyama, S. (2025). Prevalence, geographic distribution, and transmission pathway of *Camponotus yamaokai* virus. *Archives of Virology* 2025 170:5, 170(5), 102-. doi: 10.1007/S00705-025-06285-7

- Pachulska-Wieczorek, K., Le Grice, S. F. J., & Purzycka, K. J. (2016). Determinants of Genomic RNA Encapsidation in the *Saccharomyces cerevisiae* Long Terminal Repeat Retrotransposons Ty1 and Ty3. *Viruses* 2016, Vol. 8, Page 193, 8(7), 193. doi: 10.3390/V8070193
- Pan, M., Alvarez-Cabrera, A. L., Kang, J. S., Wang, L., Fan, C., & Zhou, Z. H. (2021). Asymmetric reconstruction of mammalian reovirus reveals interactions among RNA, transcriptional factor $\mu 2$ and capsid proteins. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 4176-. doi: 10.1038/s41467-021-24455-4
- Park, J. S., & Neiman, A. M. (2012). VPS13 regulates membrane morphogenesis during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 125(12), 3004–3011. doi: 10.1242/JCS.105114/263116/AM/VPS13-REGULATES-MEMBRANE-MORPHOGENESIS-DURING
- Parker, R., & Sheth, U. (2007). P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell*, 25(5), 635–646. doi: 10.1016/j.molcel.2007.02.011
- Parsons, A., Geyer, R., ... T. H.-P. I. C., & 2003, undefined. (n.d.). Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation. *Scholar.Archive.Org* AB Parsons, R Geyer, TR Hughes, C Boone PROGRESS IN CELL CYCLE RESEARCH., 2003•scholar.Archive.Org. Retrieved from https://scholar.archive.org/work/rmhht6pm35c3vglefvu2dqhcma/access/wayback/http://dibernardo.tigem.it/files/papers/2003/parsons-et-al-2003.pdf/at_download/file
- Pieczynska, M. D., Korona, R., & De Visser, J. A. G. M. (2017). Experimental tests of host-virus coevolution in natural killer yeast strains. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(4), 773–781. doi: 10.1111/jeb.13044
- Pieczynska, Magdalena D., de Visser, J. A. G. M., & Korona, R. (2013). Incidence of symbiotic dsRNA ‘killer’ viruses in wild and domesticated yeast. *FEMS Yeast Research*, 13(8), 856–859. doi: 10.1111/1567-1364.12086
- Powilleit, F., Breinig, T., & Schmitt, M. J. (2007). Exploiting the Yeast L-A Viral Capsid for the In Vivo Assembly of Chimeric VLPs as Platform in Vaccine Development and Foreign Protein Expression. *PLOS ONE*, 2(5), e415. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0000415
- Querl, L., & Krebber, H. (2024). Defenders of the Transcriptome: Guard Protein-Mediated mRNA Quality Control in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 10241, 25(19), 10241. doi: 10.3390/IJMS251910241
- Ramírez, M., Martínez, A., & Molina, F. (2022a). New Insights into the Genome Organization of Yeast Double-Stranded RNA LBC Viruses. *Microorganisms*, 10(1), 173. doi: 10.3390/microorganisms10010173

- Ramírez, M., Martínez, A., & Molina, F. (2022b). New Insights into the Genome Organization of Yeast Double-Stranded RNA LBC Viruses. *Microorganisms*, 10(1), 173. doi: 10.3390/MICROORGANISMS10010173/S1
- Ramírez, M., Velázquez, R., López-Piñeiro, A., Naranjo, B., Roig, F., & Llorens, C. (2017). New Insights into the Genome Organization of Yeast Killer Viruses Based on “Atypical” Killer Strains Characterized by High-Throughput Sequencing. *Toxins* 2017, Vol. 9, Page 292, 9(9), 292. doi: 10.3390/TOXINS9090292
- Ravoitytė, B., Lukša, J., Wellinger, R. E., Serva, S., & Servienė, E. (2022). Adaptive Response of *Saccharomyces* Hosts to Totiviridae L-A dsRNA Viruses Is Achieved through Intrinsically Balanced Action of Targeted Transcription Factors. *Journal of Fungi*, 8(4), 381. doi: 10.3390/jof8040381
- Reyes-Proañó, E., Knerr, A. J., & Karasev, A. V. (2024). Molecular characterization of birch toti-like virus, a plant-associated member of the new family Orthototiviridae. *Archives of Virology* 2024 169:7, 169(7), 140-. doi: 10.1007/S00705-024-06067-7
- Ribas, J C, & Wickner, R. B. (1996a). *Saccharomyces cerevisiae* L-BC double-stranded RNA virus replicase recognizes the L-A positive-strand RNA 3' end. *Journal of Virology*, 70(1), 292–297. doi: 10.1128/JVI.70.1.292-297.1996;WEBSITE:WEBSITE:ASMJ;ISSUE:ISSUE:DOI
- Ribas, J C, & Wickner, R. B. (1996b). *Saccharomyces cerevisiae* L-BC double-stranded RNA virus replicase recognizes the L-A positive-strand RNA 3' end. *Journal of Virology*, 70(1), 292–297. doi: 10.1128/JVI.70.1.292-297.1996
- Ribas, Juan Carlos, Fujimura, T., & Wickner, R. B. (1994). Essential RNA binding and packaging domains of the Gag-Pol fusion protein of the L-A double-stranded RNA virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(45), 28420–28428. doi: 10.1016/s0021-9258(18)46944-x
- Rodríguez-Cousiño, N., Gómez, P., & Esteban, R. (2013a). L-A-lus, a new variant of the L-A totivirus found in wine yeasts with klus killer toxin-encoding mlus double-stranded RNA: Possible role of killer toxin-encoding satellite RNAs in the evolution of their helper viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4661–4674. doi: 10.1128/AEM.00500-13;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER
- Rodríguez-Cousiño, N., Gómez, P., & Esteban, R. (2013b). L-A-lus, a new variant of the L-A totivirus found in wine yeasts with Klus killer toxin-encoding Mlus double-stranded RNA: possible role of killer toxin-encoding satellite RNAs in the evolution of their helper viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4661–4674. doi: 10.1128/AEM.00500-13

- Rodríguez-Cousiño, N., Gómez, P., & Esteban, R. (2017). Variation and Distribution of L-A Helper Totiviruses in *Saccharomyces sensu stricto* Yeasts Producing Different Killer Toxins. *Toxins*, 9(10), 313. doi: 10.3390/toxins9100313
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., & Ramírez, M. (2011). A New Wine *Saccharomyces cerevisiae* Killer Toxin (Klus), Encoded by a Double-Stranded RNA Virus, with Broad Antifungal Activity Is Evolutionarily Related to a Chromosomal Host Gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1822. doi: 10.1128/AEM.02501-10
- Rotsch, A. H., Li, D., Dupont, M., Krischuns, T., Neef, U., Oberthür, C., Stelfox, A., Lukarska, M., Fianu, I., Lidschreiber, M., Naffakh, N., Dienemann, C., Cusack, S., & Cramer, P. (2026). Mechanism of co-transcriptional cap snatching by influenza polymerase. *Nature* 2026, 1–8. doi: 10.1038/s41586-026-10189-0
- Rowley, P. A., Ho, B., Bushong, S., Johnson, A., & Sawyer, S. L. (2016). XRN1 Is a Species-Specific Virus Restriction Factor in Yeasts. *PLOS Pathogens*, 12(10), e1005890. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1005890
- Sahaya Glingston, R., Yadav, J., Rajpoot, J., Joshi, N., & Nagotu, S. (2021). Contribution of yeast models to virus research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(12), 4855. doi: 10.1007/s00253-021-11331-w
- Scheifele, L. Z., Garbitt, R. A., Rhoads, J. D., & Parent, L. J. (2002). Nuclear entry and CRM1-dependent nuclear export of the Rous sarcoma virus Gag polyprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3944–3949. doi: 10.1073/PNAS.062652199;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 10.1038/nmeth.2019. doi: 10.1038/NMETH.2019
- Schmidt, L., Tüting, C., Kyrilis, F. L., Hamdi, F., Semchonok, D. A., Hause, G., Meister, A., Ihling, C., Stubbs, M. T., Sinz, A., & Kastritis, P. L. (2024). Delineating organizational principles of the endogenous L-A virus by cryo-EM and computational analysis of native cell extracts. *Communications Biology* 2024 7:1, 7(1), 1–12. doi: 10.1038/s42003-024-06204-7
- Schmitt, M. J., & Becker, B. (2021). Viral Killer Toxins. *Encyclopedia of Virology: Volume 1-5, Fourth Edition*, 1–5, 534–543. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21280-6

- Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2002a). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 257–276. doi: 10.1111/J.1574-6976.2002.TB00614.X
- Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2002b). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 257–276. doi: 10.1111/J.1574-6976.2002.TB00614.X
- Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology* 2006 4:3, 4(3), 212–221. doi: 10.1038/nrmicro1347
- Sieber, B., Coronas-Serna, J. M., & Martin, S. G. (2023). A focus on yeast mating: From pheromone signaling to cell-cell fusion. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 133, 83–95. doi: 10.1016/J.SEMCDB.2022.02.003
- Starmer, W. T., Ganter, P. F., Aberdeen, V., Lachance, M. A., & Phaff, H. J. (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(9), 783–796. doi: 10.1139/m87-134
- Stevens, A., Cui, Y., Shivakoti, S., & Zhou, Z. H. (2023). Asymmetric reconstruction of the aquareovirus core at near-atomic resolution and mechanism of transcription initiation. *Protein & Cell*, 14(7), 546–550. doi: 10.1093/PROCEL/PWAD002
- Stochaj, U. (2023). Yeast profilin mutants inhibit classical nuclear import and alter the balance between actin and tubulin levels. *Https://Doi.Org/10.1139/Bcb-2023-0223*, 102(2), 206–212. doi: 10.1139/BCB-2023-0223
- Suda, Y., Rodriguez, R. K., Coluccio, A. E., & Neiman, A. M. (2009). A screen for spore wall permeability mutants identifies a secreted protease required for proper spore wall assembly. *PloS One*, 4(9). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0007184
- Tabasi, M., Nombela, I., Janssens, J., Lahousse, A. P., Christ, F., & Debyser, Z. (2021). Role of transportin-sr2 in hiv-1 nuclear import. *Viruses*, 13(5). doi: 10.3390/V13050829
- Tang, J., Ochoa, W. F., Sinkovits, R. S., Poulos, B. T., Ghabrial, S. A., Lightner, D. V., Baker, T. S., & Nibert, M. L. (2008). Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), 17526–17531. doi: 10.1073/PNAS.0806724105
- Taylor, D. J., & Bruenn, J. (2009). The evolution of novel fungal genes from non-retroviral RNA viruses. *BMC Biology* 2009 7:1, 7(1), 88-. doi: 10.1186/1741-7007-7-88
- Totivirus ~ ViralZone*. (n.d.). Retrieved from <https://viralzone.expasy.org/646>

- Townsend, F. M., Frigerio, G., & Pelham, H. R. B. (1994). Retrieval of HDEL proteins is required for growth of yeast cells. *Journal of Cell Biology*, 127(1), 21–28. doi: 10.1083/JCB.127.1.21
- Travers Cook, T. J., Skirgaila, C., Martin, O. Y., & Buser, C. C. (2022). Infection by dsRNA viruses is associated with enhanced sporulation efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ecology and Evolution*, 12(1), e8558. doi: 10.1002/ECE3.8558
- Tzeng, T. H., Tu, C. L., & Bruenn, J. A. (1992). Ribosomal frameshifting requires a pseudoknot in the *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus. *Journal of Virology*, 66(2), 999–1006. doi: 10.1128/jvi.66.2.999-1006.1992
- Vijayraghavan, S., Kozmin, S. G., Strobe, P. K., Skelly, D. A., Magwene, P. M., Dietrich, F. S., & McCusker, J. H. (2023a). RNA viruses, M satellites, chromosomal killer genes, and killer/nonkiller phenotypes in the 100-genomes *S. cerevisiae* strains. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 13(10). doi: 10.1093/G3JOURNAL/JKAD167
- Vijayraghavan, S., Kozmin, S. G., Strobe, P. K., Skelly, D. A., Magwene, P. M., Dietrich, F. S., & McCusker, J. H. (2023b). RNA viruses, M satellites, chromosomal killer genes, and killer/nonkiller phenotypes in the 100-genomes *S. cerevisiae* strains. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 13(10). doi: 10.1093/g3journal/jkad167
- Vijayraghavan, S., Kozmin, S. G., Strobe, P. K., Skelly, D. A., Magwene, P. M., Dietrich, F. S., & McCusker, J. H. (2023c). RNA viruses, M satellites, chromosomal killer genes, and killer/nonkiller phenotypes in the 100-genomes *S. cerevisiae* strains. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 13(10). doi: 10.1093/G3JOURNAL/JKAD167
- Viswanath, S., Bonomi, M., Kim, S. J., Klenchin, V. A., Taylor, K. C., Yabut, K. C., Umbreit, N. T., Van Epps, H. A., Meehl, J., Jones, M. H., Russel, D., Velazquez-Muriel, J. A., Winey, M., Rayment, I., Davis, T. N., Sali, A., & Muller, E. G. (2017). The molecular architecture of the yeast spindle pole body core determined by Bayesian integrative modeling. *Molecular Biology of the Cell*, 28(23), 3298–3314. doi: 10.1091/MBE.17-06-0397;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION
- Wang, Y., Lo, W. C., & Chou, C. S. (2017). A modeling study of budding yeast colony formation and its relationship to budding pattern and aging. *PLOS Computational Biology*, 13(11), e1005843. doi: 10.1371/JOURNAL.PCBI.1005843
- Wendler, P., & Enenkel, C. (2019). Nuclear transport of yeast proteasomes. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6(MAY), 450569. doi: 10.3389/FMOLB.2019.00034/FULL
- Wickner, R. B. (1996a). Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 60(1), 250. doi: 10.1128/MR.60.1.250-265.1996

- Wickner, R. B. (1996b). Prions and RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, 30, 109–139. doi: 10.1146/annurev.genet.30.1.109
- Wickner, R. B., Fujimura, T., & Esteban, R. (2013a). Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Virus Research*, 86, 1–36. doi: 10.1016/B978-0-12-394315-6.00001-5
- Wickner, R. B., Fujimura, T., & Esteban, R. (2013b). Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Virus Research*, 86, 1. doi: 10.1016/B978-0-12-394315-6.00001-5
- Widner, W. R., & Wickner, R. B. (1993). Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 13(7), 4331–4341. doi: 10.1128/MCB.13.7.4331
- Young, B. P., Craven, R. A., Reid, P. J., Willer, M., & Stirling, C. J. (2001). Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum in vivo. *The EMBO Journal* 20:1, 20(1), 262–271. doi: 10.1093/EMBOJ/20.1.262
- Yu, K. L., Lee, S. H., Lee, E. S., & You, J. C. (2016). HIV-1 nucleocapsid protein localizes efficiently to the nucleus and nucleolus. *Virology*, 492, 204–212. doi: 10.1016/J.VIROL.2016.03.002
- Zhai, Y., Attoui, H., Jaafar, F. M., Wang, H. Q., Cao, Y. X., Fan, S. P., Sun, Y. X., Liu, L. D., Mertens, P. P. C., Meng, W. S., Wang, D., & Liang, G. (2010). Isolation and full-length sequence analysis of *Armigeres subalbatus totivirus*, the first totivirus isolate from mosquitoes representing a proposed novel genus (*Artivirus*) of the family *Totiviridae*. *Journal of General Virology*, 91(11), 2836–2845. doi: 10.1099/VIR.0.024794-0/CITE/REFWORKS
- Zhang, Y., Schäffer, T., Wölflé, T., Fitzke, E., Thiel, G., & Rospert, S. (2016). Cotranslational Intersection between the SRP and GET Targeting Pathways to the Endoplasmic Reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 36(18), 2374–2383. doi: 10.1128/MCB.00131-16
- Zhao, M., Xu, L., Bowers, H., & Schott, E. J. (2022). Characterization of Two Novel Toti-Like Viruses Co-infecting the Atlantic Blue Crab, *Callinectes sapidus*, in Its Northern Range of the United States. *Frontiers in Microbiology*, 13, 855750. doi: 10.3389/FMICB.2022.855750/TEXT
- Zhao, R. Y. (2017). Yeast for virus research. *Microbial Cell (Graz, Austria)*, 4(10), 311–330. doi: 10.15698/MIC2017.10.592
- Zinoviev, A., Ayupov, R. K., Abaeva, I. S., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2020). Extraction of mRNA from Stalled Ribosomes by the Ski Complex. *Molecular Cell*, 77(6), 1340–1349.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2020.01.011