

VILNIAUS UNIVERSITETAS

ALEKSANDRAS KONOVALOVAS

Mielių *Saccharomyces sensu stricto Totiviridae* šeimos virusų ciklo  
ląstelėje molekulinės determinantės

Daktaro disertacija  
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2018

Disertacija rengta 2013 – 2018 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute Biochemijos ir Molekulinės Biologijos katedroje

**Mokslinis vadovas:**

prof. dr. **Saulius Serva** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, Biochemija – 04 P)

# TURINYS

<b>SANTRUMPOS .....</b>	<b>6</b>
<b>IVADAS .....</b>	<b>7</b>
<b>1 LITERATŪROS APŽVALGA.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 <i>Saccharomyces</i> genties mielių įvairovė.....</b>	<b>10</b>
1.1.1 <i>Saccharomyces sensu stricto</i> mielių paplitimas .....	10
1.1.2 Mielių lytinio dauginimosi reikšmė.....	15
1.1.3 <i>Saccharomyces</i> mielių genų kintamumas .....	15
<b>1.2 <i>Saccharomyces</i> gentyje aptinkami dgRNR virusai .....</b>	<b>18</b>
1.2.1 L-A ir M virusų genomų sandara .....	19
1.2.2 L-A viruso kapsidė .....	21
1.2.3 L-A viruso replikacija.....	25
1.2.4 Ląstelės baltymai, būtini virusui replikuotis ląstelėje.....	26
1.2.5 Endogeniniai virusiniai elementai .....	28
<b>1.3 Virusų ciklas ląstelėje .....</b>	<b>31</b>
1.3.1 Ląstelės-šeimininko baltymai, dalyvaujantys RNR virusų replikacijoje .....	31
1.3.2 Virusų įtaka šeimininko genų kintamumui .....	33
<b>2 MEDŽIAGOS IR METODAI .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Medžiagos .....</b>	<b>35</b>
2.1.1 Reagentai .....	35
2.1.2 Fermentai .....	35
2.1.3 Molekulinės biologijos rinkiniai .....	35
2.1.4 Terpės .....	35
2.1.5 Mikroorganizmų kamienai.....	36
2.1.6 Oligonukleotidai.....	37
2.1.7 Plazmidės.....	38
2.1.8 Buferiniai tirpalai .....	41
<b>2.2 Metodai.....</b>	<b>41</b>
2.2.1 Suminės nukleorūgščių frakcijos gryninimas iš mielių .....	41
2.2.2 Nukleorūgščių fracionavimas ličio chloridu .....	42
2.2.3 Nuo sekos nepriklausomas dgRNR genomų DNR kopijų amplifikavimas ....	42
2.2.4 <i>E. coli</i> kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija .....	45
2.2.5 Mažų plazmidinės DNR kiekių išskyrimas iš <i>E. coli</i> ląstelių .....	46
2.2.6 <i>S. cerevisiae</i> kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija.....	46

2.2.7	Mielių kileriškumo testavimas .....	47
2.2.8	Mielių ląstelių ardymas.....	47
2.2.9	Virusinių dalelių gryninimas.....	48
2.2.10	Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje ir jo dažymas .....	48
2.2.11	Mielių ląstelių mikroskopija.....	49
2.2.12	Homologiškų sekų paieška genomuose.....	50
2.2.13	Daugybinio sekų palyginio sudarymas .....	50
2.2.14	Filogenetinio medžio konstravimas .....	50
2.2.15	Nežinomų baltymų charakterizavimas .....	51
2.2.16	<i>De novo</i> transkriptomų surinkimas .....	51
2.2.17	Kita naudota programinė įranga .....	51
2.2.18	Bioinformatinei analizei naudoti duomenys ir duomenų bazės.....	52
<b>3</b>	<b>TYRIMŲ REZULTATAI.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>DgRNR virusų ir jų palydovų genomų analizė.....</b>	<b>55</b>
3.1.1	Naujų dgRNR L-A virusų ir M palydovų variantų identifikavimas.....	55
3.1.2	Filogenetinė L-A virusų sekų analizė .....	59
3.1.3	L-A tipo virusų Gag baltymo struktūros ir jį koduojančių sekų variabilumo ryšys.....	61
3.1.4	L-A tipo virusų GagPol baltymo Pol domeno sekų variabilumo ir funkcijų ryšys.....	63
3.1.5	Naujų L-A viruso M palydovų sekų analizė .....	64
3.1.6	L-A viruso M palydovas ir endogeniniai virusiniai elementai mielėse .....	67
<b>3.2</b>	<b>ScV-LA-1 viruso sąveikos su ląstelės-šeimininko baltymais tyrimas.....</b>	<b>70</b>
3.2.1	ScV-LA-1 viruso koduojamų baltymų raiškos tyrimas .....	71
3.2.2	ScV-LA-1 viruso nukleokapsidės ir virusinių dalelių gryninimas .....	74
3.2.3	ScV-LA-1 viruso baltymų sąveikos su ląstelės baltymais tyrimas.....	75
3.2.4	Šeimininko baltymų įtaka L-A viruso replikacijai .....	78
3.2.5	ScV-LA-1 koduojamų baltymų lokalizacijos ląstelėje tyrimas.....	81
<b>3.3</b>	<b>Rezultatų aptarimas .....</b>	<b>85</b>
	<b>IŠVADOS.....</b>	<b>88</b>
	<b>MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS.....</b>	<b>89</b>
	<b>FINANSINĖ PARAMA.....</b>	<b>91</b>
	<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS .....</b>	<b>92</b>
	<b>PRIEDAI.....</b>	<b>105</b>



**PADĚKA..... 107**

## SANTRUMPOS

a.r. – aminorūgštis

BMV – dirstės mozaikos virusas (angl. *Brome Mosaic Virus*)

bp – bazių pora(os)

BSA – jaučio serumo albuminas (angl. *bovine serum albumin*)

dgRNR – dvigrandininė RNR

DMSO – dimetilsulfoksidai

DTT – ditionitritolis

EDTA – etilendiamintetraacetato rūgštis

EVE – endogeninis virusinis elementas

GTC – Gamtos Tyrimų Centras (Vilnius, Lietuva)

kDNR – kopijinė DNR

LC-MS/MS – skysčių chromatografijos masių spektrometrija

NatC – N galo acetiltransferazės kompleksas

NDS – natrio dodecilsulfatas

nt – nukleotidas(ai)

PAGE – poliakrilamidinio gelio elektroforezė

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas (angl. *phosphate buffer saline*)

PEG – polietilenglikolis

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PKR – proteinkinazė R

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas

RCNMV – Raudonųjų dobilų nekrozės virusas (angl. *Red Clover Necrotic Mosaic Virus*)

RdRp – nuo RNR priklausoma RNR polimerazė

TBSV – pomidorus infekuojantis virusas (angl. *Tomato Bushy Stunt Virus*)

ToMV – pomidorų mozaikos virusas (angl. *Tomato Mosaic Virus*)

vgRNR – viengrandininė RNR

## IVADAS

*Saccharomyces cerevisiae* rūšies mielės yra vienas svarbiausių eukariotinių organizmų atliekant biochemijos, molekulinės biologijos, ląstelės biologijos ar sistemų biologijos tyrimus. Esant plačiam įvairių genetinių įrankių pasirinkimui, *S. cerevisiae* dažnai naudojamos kaip modelinis organizmas eukariotinėje ląstelėje vykstančių procesų tyrimui. Tiriant *S. cerevisiae* rūšies mieles, gauta daug duomenų apie žmogaus ląstelėse vykstantį lipidų metabolizmą (Petranovic *et al.*, 2010), mitochondrijose vykstantį metabolizmą ir mitochondrines ligas (Rinaldi *et al.*, 2010), eukariotinių ląstelių senėjimo procesus (Barros *et al.*, 2010), prionus (Wickner *et al.*, 2018) ir prionų sukiamų ligų mechanizmus (Fruhmann *et al.*, 2017). Naudojant *S. cerevisiae* mieles modeliniu organizmu, identifikuota daug ląstelės-šeimininko baltymų, svarbių augalų RNR virusų replikacijai ir transkripcijai (Nagy ir Pogany, 2012). Paradoksalu, bet mielėms būdingo L-A viruso sąveika su ląstelės-šeimininko baltymais iki šiol praktiškai netirta.

Mielių virusologijos pradžia laikomi 1963 metai, kai Bevan ir Makower nustatė, kad tam tikri mielių kamienai pasižymi biocidiniu aktyvumu prieš kitas mieles (arba kileriniu fenotipu). Tolesnių tyrimų metu nustatyta, kad *Saccharomyces cerevisiae* rūšies mielėse šį fenotipą dažniausiai sąlygoja biocidiniu aktyvumu pasižymintis sekretuojamas baltymas (kilerinis toksinas), koduojamas *Totiviridae* šeimos dvigrandininio RNR (dgRNR) L-A viruso dgRNR palydovo. DgRNR L-A virusas neturi tarpląstelinės stadijos ir yra neinfektyvus. Ilgą laiką buvo žinomas tik vienas *S. cerevisiae* rūšies mieles infekuojantis L-A tipo viruso variantas. Tačiau pastaraisiais metais pradėjus tirti *Saccharomyces sensu stricto* grupei priskiriamas mieles, identifikuoti nauji dgRNR tipo L-A virusai (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013; Konovalovas *et al.*, 2016; Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017; Rowley *et al.*, 2016).

## **Darbo tikslas**

1. Nuskaityti dgRNR virusų, randamų *Saccharomyces sensu stricto* mielėse, genomų sekas ir atlikti jų tyrimą bioinformatinės analizės metodais.
2. Identifikuoti šeimininko baltymus, sąveikaujančius su ScV-LA 1 viruso koduojamais baltymais ir nustatyti šių baltymų reikšmę viruso ciklui ląstelėje.

## **Mokslinis naujumas**

Šiame darbe pristatome išvystytą ir mielių dgRNR virusų genomo sekos nustatymui pritaikytą metodą. Naudojantis šiuo metodu, pirmą kartą nustatėme *S. paradoxus* rūšies dgRNR virusų genomų sekas. Identifikavome naujus dgRNR virusus, paplitusius *S. cerevisiae* rūšies mielėse. Analizuodami naujai nustatytą ir paskelbtą dgRNR L-A virusų koduojamų baltymų sekas, nustatėme variabiliūs virusinių Gag ir Gag-Pol baltymų motyvus. Aptikome, kad šie variabilūs motyvai išsidėstę viruso replikacijai ir transkripcijai svarbiuose regionuose arba erdviškai šalia jų. Nustatėme, kad L-A viruso Gag baltymo C-galas yra būtinas virusinių dalelių, galinčių vykdyti viruso replikaciją, susidarymui. Šiame darbe pirmą kartą identifikavome 15 ląstelės-šeimininko baltymų, svarbių viruso replikacijai, tarp kurių 13, sąveikaujančių su viruso koduojamais baltymais.

## **Darbo reikšmė**

Darbo metu nustatėme, kad L-A virusas aptinkamas ne tik tarp laukinių mielių kamienų, tačiau yra plačiai paplitęs ir tarp populiariausių, moksliniuose tyrimuose naudojamų *S. cerevisiae* mielių laboratorinių kamienų. Nors L-A viruso buvimas nėra siejamas su ląstelės gyvybingumo ar augimo greičio pokyčiais, tačiau pastaraisiais metais gauti duomenys rodo, kad viruso buvimas ląstelėje keičia didelės dalies šeimininko genų raišką (McBride *et al.*, 2013; Lukša *et al.*, 2017). Žinoma, kad tam tikrų genų delecijos gali pašalinti virusą iš ląstelės (Tercero ir Wickner, 1992), kitos gali aktyvinti viruso replikaciją ir transliaciją, o kartais virusinio baltymo kiekis mielių ląstelėje gali siekti net iki

20 % visų ląstelės baltymų (Dihanich *et al.*, 1989). Esant virusui, transkriptomines ar proteomines analizės duomenys gali būti klaidingai interpretuojami, nes stebimi genų raiškos pokyčiai nebūtinai gali būti susiję vien su tiriamu procesu, tačiau ir su viruso kiekiu ir būvio pasikeitimu ląstelėje. Ląstelės-šeimininko baltymų, sąveikaujančių su dgRNR L-A virusu, identifikuota vos keletas. Dažniausiai jie buvo identifikuoti tiriant nesusijusius su L-A virusu procesus (Chong *et al.*, 2004). Šiame darbe mes nustatėme naujus, dar nepublikuotus ląstelės-šeimininko baltymus, sąveikaujančius su L-A viruso koduojamais baltymais. Biocidiniu aktyvumu pasižyminčiuose kamienuose nuskaitytos naujų L-A viruso M palydovų genomų sekos. Nustatytas tiesioginis skirtingų L-A viruso variantų sudaromų filogenetinių grupių ryšys su šeimininko rūšimi bei smulkesnių filogenetinių subgrupių atsiskyrimas pagal L-A kamieno, kuriame aptiktas L-A virusas, savybes: kilmę ir gebėjimą užtikrinti konkretaus M palydovo replikaciją.

### **Šio darbo ginamieji teiginiai**

1. Išvystytas metodas, skirtas *Saccharomyces sensu stricto* aptinkamų pilno ilgio dgRNR viruso sekų identifikavimui, ir identifikuoti nauji *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* dgRNR L A virusų ir jų M palydovų variantai.
2. Stebimas L-A dgRNR virusų kintamumas skirtinguose *Saccharomyces sensu stricto* mielių kamienuose – viruso ir šeimininko koevoliucijos pasekmė.
3. L-A dgRNR virusų M palydovų sekų įterpimas į chromosomą galimai susijęs su transpozonų aktyvumu mielių ląstelėje.
4. L-A viruso koduojamo Gag baltymo C galinis motyvas yra reikšmingas virusinių nukleokapsidžių vykdomai virusinio dgRNR genomo replikacijai.
5. Nustatyta 15 L-A viruso ląstelės šeimininko baltymų, moduluojančių dgRNR replikacijos lygį, tarp jų 13, tiesiogiai sąveikaujančių su L-A viruso koduojamais baltymais ir du, dalyvaujantys signalo perdavime ląstelėje.
6. Gag baltymo biogenezė galimai susijusi su baltymo transportu į branduolį.

# 1 LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 *Saccharomyces* genties mielių įvairovė

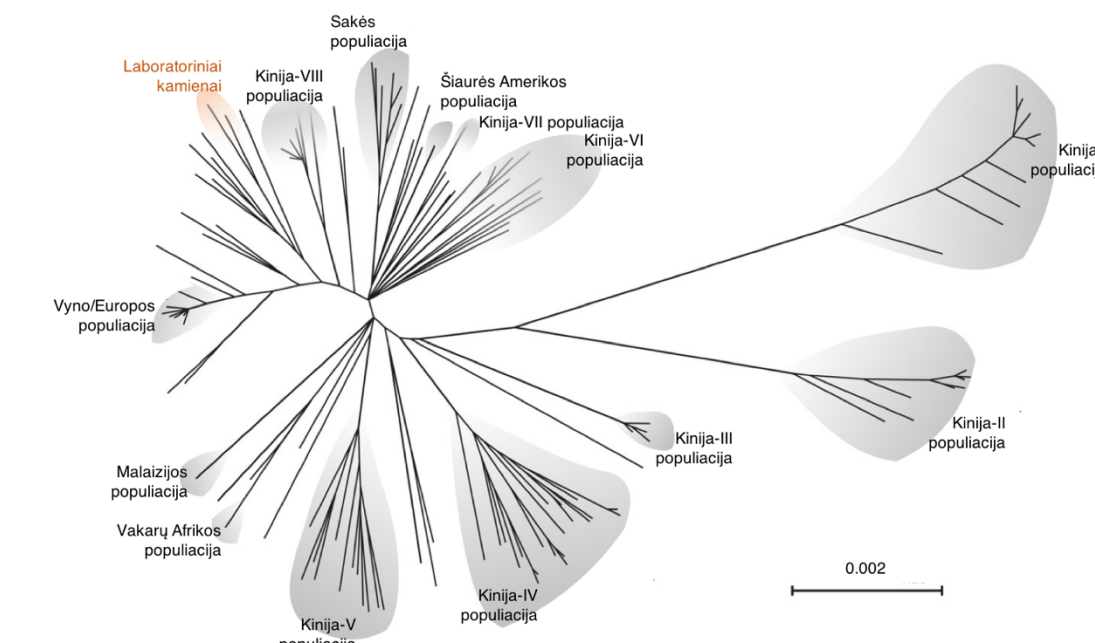
*Saccharomyces cerevisiae* rūšies mielės – vienas svarbiausių modelinių organizmų eukariotinių ląstelių tyrimuose ląstelės biologijos, molekulinės biologijos, biochemijos ir genetikos mokslų srityse (Botstein ir Fink, 2011). Kiek daugiau negu prieš dešimtmetį buvo pradėta domėtis, kokią vietą mielės užima ekologinėse nišose, ir kokia jų kilmės istorija (Liti, 2015). *S. cerevisiae* rūšies mielės galimai yra viena iš anksčiausiai žmogaus prijaukintų rūšių. Archeologiniai radiniai byloja, kad žmogus vėliausiai 7000 m. pr. Kr. naudojo mieles gėrimų fermentavimui: 7000 m. pr. Kr. – Kinija, 5400–5000 m. pr. Kr. Iranas, 3150 m. pr. Kr. Egiptas (Sicard ir Legras, 2011).

### 1.1.1 *Saccharomyces sensu stricto* mielių paplitimas

*Saccharomyces* genties mieliagyviai paplitę visame pasaulyje, jie dažnai aptinkami su žmogaus veikla susijusiose nišose (pvz.: vynu, alaus ir kitų alkoholinių gėrimų gaminimas) ir gyvosios gamtos nišose (pvz.: augalai, dirvožemis, vabzdžių virškinamasis traktas) (Liti *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2014; Peter *et al.*, 2018). Dar viena ekologinė niša, kurioje randamos *S. cerevisiae* – žmogaus mikrobiomas (Angebault *et al.*, 2013). Kai kurie *S. cerevisiae* kamienai pasižymi patogeniškumu žmogui (Muller *et al.*, 2011). Su patogeniškumu susiję *S. cerevisiae* kamienai toleruoja aukštą temperatūrą ( $\geq 40$  °C) (Muller *et al.*, 2011), kas galimai yra mielės adaptacijos prie žmogaus organizmo kaip ekologinės nišos rezultatas (Liti, 2015). *S. cerevisiae* rūšies mielės randamos ir sveikų žmonių mikrobiomose, kas leidžia manyti, kad tai oportunistinis patogenas (Strope *et al.*, 2015).

Pastaraisiais metais intensyviai pradėta išskirti naujas *Saccharomyces* genčiai priklausančias mieles iš bukinių šeimai priklausančių medžių (*Quercus*, *Fagaceae* ir kitų šeimai priklausančių genčių) sulos, žievės, lapų ir šalimais esančio dirvožemio (Sniegowski *et al.*, 2002; Sampaio ir Gonçalves, 2008). Wang su kolegomis nustatė, kad skirtingose ekologinėse nišose *S. cerevisiae* rūšies mielių įvairovė yra neįtikėtinai plati. Ant įvairių vaisių,

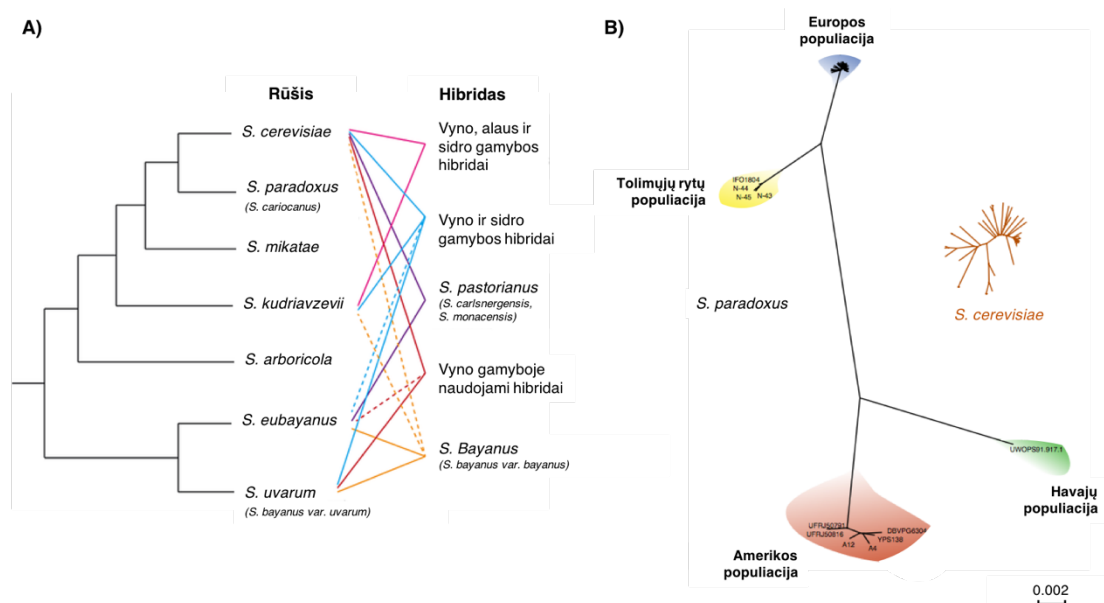
medžių (ąžuolai, kaštonai, kriaušės ir kt.), pūvančių medžių ir dirvožemyje (sodo, miško) buvo identifikuota daug skirtingų *S. cerevisiae* rūšių priklausančių mielių. Atlikę filogenetinę analizę, tyrimo autoriai nustatė aštuonias tik Kinijai būdingas *S. cerevisiae* subpopuliacijas (1.1 pav.) (Wang *et al.*, 2012). Gianni Liti ir Joseph Schacherer vadovaujamos mokslininkų grupės nustatė 1011 mielių kamienų, surinktų iš visų pasaulio vietų, genomų sekas ir išskyrė 26 skirtingas *S. cerevisiae* rūšies populiacijas (Peter *et al.*, 2018). Tyrimo autoriai nustatė, kad *S. cerevisiae* populiacijos koreliuoja su geografinė vietoje, ekologine niša ir žmogaus veiklos įtaka (Liti *et al.*, 2009; Peter *et al.*, 2018).



1.1 pav. *S. cerevisiae* rūšies filogenetinis medis. Pažymėtos pagrindinės *S. cerevisiae* populiacijos (Wang *et al.*, 2012; Liti, 2015).

Artimiausia rūšis *S. cerevisiae* yra *S. paradoxus* mielės. Priešingai negu *S. cerevisiae*, nėra rasta faktų, kad *S. paradoxus* mielės būtų prijaukintos, jos nėra siejamos su žmogaus veikla. *S. paradoxus* rūšies mielės paplitusios visame pasaulyje. ąžuolynai, eglynai, vaisius nokinantys medžiai ir šių vietovių dirvožemis yra pagrindinės ekologinės nišos, kuriose aptinkamos *S. paradoxus* rūšies atstovai (Sniegowski *et al.*, 2002; Sampaio ir Gonçalves, 2008; Brysch-Herzberg ir Seidel, 2017). Remiantis *S. paradoxus* rūšies

palyginamosios genomų analizės rezultatais, išskiriamos Europos, Tolimųjų Rytų, Amerikos ir Havajų populiacijos (1.2 pav. B) (Liti *et al.*, 2009). Lyginant skirtingų populiacijų genomus, stebimi iki 5 % siekiantys sekų skirtumai (Liti *et al.*, 2009), o tarp *S. cerevisiae* labiausiai nutolusių rūšių populiacijų stebimas tik iki 1,1 % genomo variabilumas (Peter *et al.*, 2018). Tokie duomenys suteikia pagrindą įtarti ne tik labai ankstyvą *S. paradoxus* rūšies populiacijų atsiskyrimą, bet ir besiskiriančią nuo *S. cerevisiae* evoliucijos eigą.



1.2 pav. Filogenetiniai *Saccharomyces sensu stricto* mielių ryšiai. A) Kladrograma vaizduoja filogenetinius ryšius tarp skirtingų *Saccharomyces* genties rūšių bei dažniausiai izoliuojamų hibridų. Punktyru pažymėti sąryšiai vaizduoja aptinkamus hibridizacijos su kitomis rūšimis įvykius (Almeida *et al.*, 2014; Boynton ir Greig, 2014); B) *S. paradoxus* ir *S. cerevisiae* filogenetinių medžių palyginimas. Filogenetiniai medžiai sudaryti remiantis nukleotidų polimorfizmu, naudojant artimiausių kaimynų jungimo metodą, ir pavaizduoti tame pačiame mastelyje. Skirtumai, stebimi analizuojant *S. cerevisiae* polimorfizmą visoje populiacijoje, prilygsta *S. paradoxus* subpopuliacijoje stebimam polimorfizmui (Liti *et al.*, 2009).

Kryžminant skirtingų populiacijų *S. paradoxus* aukšliasporės, gaunami gyvybingi diploidai. Vis tik tokie diploidai yra sterilūs, t.y. jų formuojamos aukšliasporės yra beveik negyvybingos (Liti *et al.*, 2006). Sterilių haploidų susiformavimą gali lemti jau minėtas aukštas sekų variabilumas tarp skirtingų populiacijų (Liti *et al.*, 2006; Liti *et al.*, 2009). Naumov su kolegomis 2000 metais aprašė naują *Saccharomyces cariocanus* rūšį (Naumov *et al.*, 2000),



kuri išskirta Pietų Amerikoje iš *Drosophila* rūšies musių (Morais *et al.*, 1992). Šios rūšies mieles kryžminant su kitų žinomų rūšių mielėmis, buvo gaunami sterilūs hibridai (Liti *et al.*, 2006). Nustačius *S. cariocanus* genomo seką, ji 99,7 % sutapo su *S. paradoxus* Amerikos populiacijos mielių genomų sekomis (Liti *et al.*, 2006; Liti *et al.*, 2009). Buvo nustatyta, kad lyginant su *S. paradoxus*, *S. cariocanus* turi keturias reciprokinės chromosomų translokacijas, ir dėl šių genomo pokyčių *S. cariocanus* ir *S. paradoxus* iš Amerikos populiacijos hibridai pasižymi sterilumu (Liti *et al.*, 2006). Šiai dienai yra priimta neišskirti *S. cariocanus* rūšies mielių kaip naujos rūšies, bet priskirti jas *S. paradoxus* mielių rūšiai (Liti *et al.*, 2009).

Išskiriamos trys *Saccharomyces uvarum* rūšies populiacijos: Australazijos, Pietų Amerikos ir Šiaurinio pusrutulio (Almeida *et al.*, 2014). Tarp populiacijų stebimi iki 4 % siekiantys genomų sekų skirtumai. Kryžminant skirtingų populiacijų *S. uvarum* mieles, gaunami hibridai formuoja mažai gyvybingas sporas (iki 73 % aukšliasporių – negyvybingos) (Libkind *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2014). Šiaurinio pusrutulio *S. uvarum* mielių populiacijos genomuose aptinkamos ivairaus ilgio insercijos, kildinamos iš *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* ir *S. eubayanus* rūšių genomų. Tuo tarpu *S. uvarum* rūšyse iš Pietų Amerikos šių insercijų nepatinkama. Remdamiesi šiomis įžvalgomis Almeida su bendraautoriais teigia, kad Šiaurinio pusrutulio *S. uvarum* kilmė yra Pietų Amerika (Almeida *et al.*, 2014).

Libkind su kolegomis *Saccharomyces eubayanus* rūšies mieles pirmą kartą identifikavo 2011 metais Argentinoje (Patagonijoje) (Libkind *et al.*, 2011). Nuskaičius *S. eubayanus* genomo seką paaiškėjo, kad *S. pastorianus* yra *S. cerevisiae* ir *S. uvarum* mielių hibridas. *S. pastorianus* mielės (dar žinomas kaip *S. carlsbergensis* arba *S. monacensis*) yra vienos pagrindinių, naudojamų alaus gamyboje. Kad *S. pastorianus* yra dviejų *Saccharomyces* genčiai priklausančių mielių hibridas, buvo žinoma kurį laiką. Nustatyta, kad vienas iš tėvinių kamienų yra *S. cerevisiae*, tuo tarpu kitas tėvinis kamienas iligus metus buvo mįslė. Buvo mėginama atrasti sąsajas tarp įvairių skirtingų tai dienai

žinomų *Saccharomyces sensu stricto* padermei priklausančių mielių rūšių (Nguyen ir Gaillardin, 2005; Nguyen *et al.*, 2011). *S. eubayanus* rūšies genomine DNR 99 % sutapo su nežinomos kilmės *S. pastorianus* genomo dalimi (Libkind *et al.*, 2011; Bing *et al.*, 2014). 2014 metais *S. eubayanus* rūšis buvo identifikuota Kinijoje. Kinijos populiacijos *S. eubayanus* genomo seka 99.8% sutapo su *S. pastorianus* hibrido *S. eubayanus* kilmės genomo dalimi (Bing *et al.*, 2014). Intriguojantis faktas, kad *S. eubayanus* rūšies mielių Europoje dar nėra aptikta. Antropologiniai tyrimai byloja, kad Europoje jau XVI amžiuje alaus gamybai buvo naudojamos *S. pastorianus* kilmės mielės. Kyla klausimas, ar *S. pastorianus* hibridas susidarė Europoje, ar buvo atgabentas Šilko keliu? Yra tikimybė, kad *S. eubayanus* mielės egzistuoja kažkur Europoje savitoje ekologinėje nišoje ir laukia jų atradimo (Gibson ir Liti, 2015).

*Saccharomyces kudriavzevii* mielių rūšis pirmą kartą izoliuota Japonijos teritorijoje iš nukritusių lapų (Naumov *et al.*, 2000). Netrukus po *S. kudriavzevii* atradimo Japonijoje, jos buvo identifikuotos Portugalijoje (Sampaio ir Gonçalves, 2008) ir Ispanijoje (Lopes *et al.*, 2010).

*Saccharomyces mikatae* ir *Saccharomyces arboricolus* yra mažiausiai iširtos *Saccharomyces sensu stricto* mielių rūšys. Abiejų šių rūšių genomų sekos yra nuskaitytos (Scannell *et al.*, 2011; Liti *et al.*, 2013). Dėl mažo informacijos kiekio, sukaupto apie šias mieles, išsami fenotipinė ir genotipinė analizė nėra atlikta. *S. mikatae* rūšies mielės aptinkamos išskirtinai Japonijoje (Scannell *et al.*, 2011). Tuo tarpu *S. arboricolus* rūšies atstovai randami Kinijoje (Naumov *et al.*, 2010) ir Naujoje Zelandijoje (Gayevskiy ir Goddard, 2016). Manoma, kad *S. arboricola* yra *Saccharomyces* rūšis, labiausiai paplitusi Naujoje Zelandijoje, su žmogaus veikla nesusijusiose nišose (Gayevskiy ir Goddard, 2016).

### 1.1.2 Mielių lytinio dauginimosi reikšmė

Ilgą laiką manyta, kad pagrindinė *S. cerevisiae* rūšies mielių užimama ekologinė niša yra uogos ir vaisiai. Tačiau uogų ir vaisių sezonas yra gana trumpas ir kyla klausimas, kas šaltuoju metų periodu tampa mielių buveine. Esant maisto trūkumui arba stipriai pakitus aplinkos sąlygoms, *Saccharomyces* genties mielės pakeičia dauginimosi programą – pradeda daugintis lytiniu būdu (Goddard ir Greig, 2015). Prasidėjus mielių lytinio dauginimosi ciklui susidaro aukšliai, o juose susiformuoja keturios haploidinės aukšliasporės. Aplinkos sąlygoms tapus palankioms, aukšliasporės subręsta ir gali susiliedamos grįžti į diploidinę būseną. Įprastai stebimas aukšliasporių susilieėjimas į diploidą pačiame aukšlyje. Kad vyktų kryžminimuisi su kitomis mielių rūšimis, turi būti suardytas aukšlio apvalkalas (Reuter *et al.*, 2007). Laboratorijoje atliekant skirtingų rūšių mielių kryžminimo eksperimentus, apvalkalo suardymui naudojami specialus fermentai. Pademonstruota, kad *Drosophila melanogaster* virškinimo trakte gali būti suardytas aukšlio apvalkalas, tačiau pačios aukšliasporės lieka nesuardytos. Yra manoma, kad *Drosophila* genties individų virškinimo traktas yra ta vieta, kurioje vyksta skirtingų rūšių mielių kryžminimasis (Reuter *et al.*, 2007).

Mielių pernašą tarp skirtingų ekologinių nišų gali atlikti įvairiausi vabzdžiai (Gilbert, 1980). *S. cerevisiae* rūšies mielės yra aptiktos *Drosophila* genties individuose (Buser *et al.*, 2014), vapsvose, kurių virškinimo trakte išlieka gyvybingos žiemos metu (Stefanini ir Dapporto, 2012), bičių aviliuose (Goddard *et al.*, 2010). Nustatyta, kad *S. cerevisiae* rūšies mielės geba sintetinti tam tikras lakias medžiagas, kuriomis viliojamos *Drosophilidae* šeimos musės (Becher *et al.*, 2012). Manoma, kad tokiu būdu musės gali būti mielių pernašos nuo vieno augalo ant kito vektoriumi (Buser *et al.*, 2014).

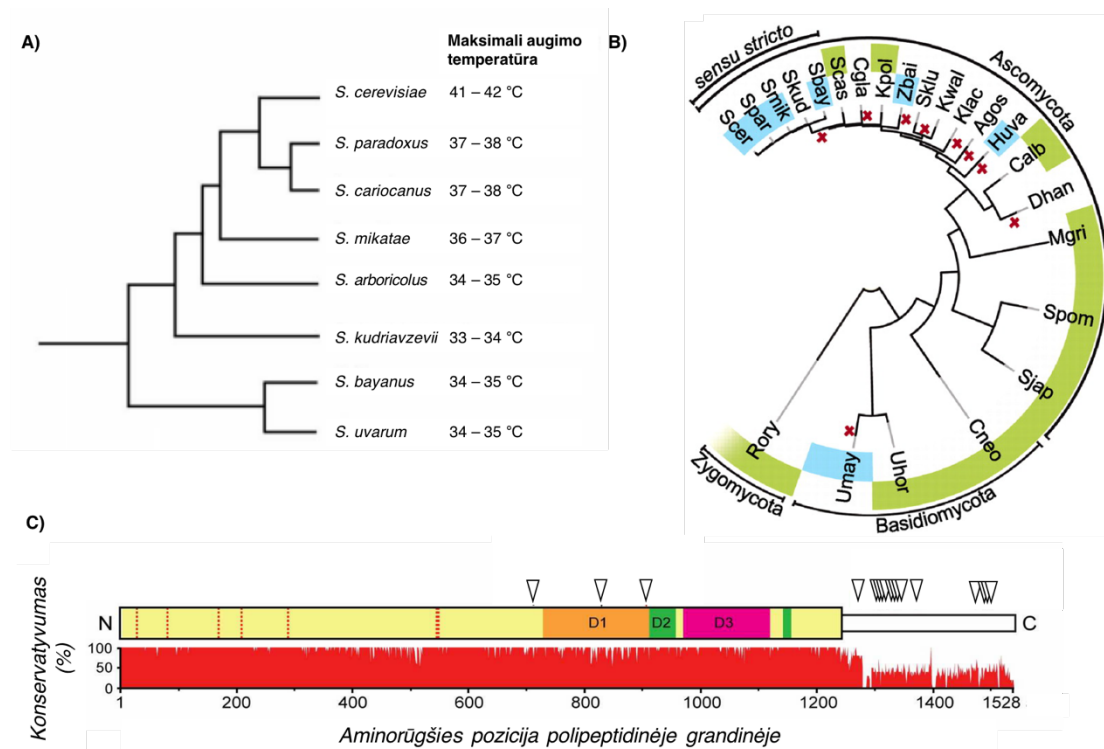
### 1.1.3 *Saccharomyces* mielių genų kintamumas

Atliekant skirtingų *Saccharomyces sensu stricto* mielų palyginamąją genomų sekų analizę, stebimas genų sekų kintamumas, o jų santykinis evoliucijos greitis yra susijęs su rūšies adaptaciniu potencialu (Scannell *et al.*,

2011). *Saccharomyces* rūšies mielės aptinkamos įvairiose ekologinėse nišose, kur vyrauja skirtingi aplinkos faktoriai. Skirtingoms rūšims priklausančios mielės pasižymi skirtingu temperatūros toleravimu (1.3 pav. A). *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* rūšies mielės laikomos termotolerantinėmis (Sweeney *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2011), tuo tarpu *S. kudriavzevii* pasižymi kriotolerantiškumu (Gonçalves *et al.*, 2011). Nustatyta, kad esant žemai aplinkos temperatūrai *S. kudriavzevii* rūšies mielės suaktyvina glicerolio gamybą (Arroyo-López *et al.*, 2010). Kitame tyrime analizuojant genų sekas, koduojančias glikolizėje dalyvaujančius baltymus, buvo nustatyta, kad dalis šių genų statistiškai patikimai pasižymi aukštesniu nesinoniminių mutacijų dažniu tarp termotolerantių ir kriotolerantių *Saccharomyces* genties rūšių (Gonçalves *et al.*, 2011).

Kitas kryptingos atrankos veikiamų *Saccharomyces sensu stricto* mielių pavyzdys yra *XRNI* geno kitimas (Rowley *et al.*, 2016). *XRNI* genas aptinkamas visuose eukariotiniuose organizmuose ir pasižymi aukštu sekos konservatyvumu. Geno koduojamas baltymas Xrn1 ląstelėje atsakingas už transkripcijos klaidų šalinimą, vykdydamas „kepurės“ neturinčių RNR transkriptų hidrolizę 5'→3' kryptimi (Parker, 2012). Mielėse Xrn1 baltymas yra antivirusinės SKI sistemos dalis, reguliuojantis dgRNR virusų kopijų skaičių (Wickner, 1996; Fujimura ir Esteban, 2010). Paul Rowley su kolegomis pademonstravo, kad *XRNI* genas skirtinguose *Saccharomyces sensu stricto* padermės mielėse konkrečiose pozicijose kaupia nesinonimines mutacijas. Tyrimo autoriai pademonstravo, kad turinčiam dgRNR virusą mielių kamienę pakeitus *XRNI* geną kitos rūšies *XRNI* genu, stebimas viruso kopijų padidėjimas. Pastarasis rezultatas pademonstruoja, kad vienas skirtingų rūšių virusinės sistemos baltymas nėra prisitaikęs prie kito *Saccharomyces* rūšies viruso (Rowley *et al.*, 2016). Tačiau pademonstruota, kad pakeitus *S. kudriavzevii* *XRNI* gene D1, D2 ir D3 domenus (1.3 pav. C) koduojančią seką *S. cerevisiae* *XRNI* geno tų pačių regionų koduojančia seka, gautas chimerinis Xrn1 baltymas pasižymėjo tokiu pat antivirusiniu aktyvumu prieš

*S. cerevisiae* dgRNR L-A virusą, kaip ir natyvus *S. cerevisiae* Xrn1 baltymas (Rowley *et al.*, 2016).



1.3 pav. *Saccharomyces sensu stricto* mielių genų sekų kintamumas. A) *Saccharomyces sensu stricto* padermės filogenetinis medis. Kartu pavaizduota maksimali kiekvienos rūšies augimo temperatūra (Gonçalves *et al.*, 2011); B) RNR interferencijos ir dgRNR virusų nesuderinamumas. Filogenetinis medis reprezentuoja įvairias grybų rūšis, kuriose rasti dgRNR virusai (pažymėta mėlynai) (*S. kudriavzevii* rūšyje identifikuotas dgRNR virusas (Rowley *et al.*, 2016), kuris šiame filogenetiniame medyje nėra pažymėtas), kuriose aptikta RNR interferencijos sistema (pažymėta žaliai). Filogenetiniame medyje pažymėti grybų rūšių protėviai, praradę RNR interferencijos mechanizmą (pažymėta raudonu x) (Drinnenberg *et al.*, 2011); C) Xrn1 baltymo domeninė organizacija ir variabilumas tarp skirtingų *Saccharomyces sensu stricto* padermės rūšių. Trikampiais pažymėtos baltymo aminorūgščių pozicijos, veikiamos kryptingos atrankos (Rowley *et al.*, 2016).

Tiriant skirtingų rūšių *Saccharomyces sensu stricto* mieles, nustatyta virš 40 savitų rūšiai iškritų (Scannell *et al.*, 2011). Taip pat nustatyta, kad šios genties mielės yra praradusios RNR interferencijos mechanizmą, kai tuo tarpu artima *Saccharomyces sensu stricto* padermei rūšis *Saccharomyces castellii* RNR interferencijos mechanizmą yra išlaikiusi (Drinnenberg *et al.*, 2009; Drinnenberg *et al.*, 2011). *S. uvarum* ir *S. eubayanus* rūšyse aptinkamas Dicer baltymą koduojantis genas savo seka artimas *S. castellii* Dicer baltymui

(Drinnenberg *et al.*, 2009; Peris *et al.*, 2014). Tyrimo autoriai nustatė, kad RNR interferencijos praradimas sutampa su dgRNR virusų palydovu, koduojančių kilerinį toksiną, egzistavimu konkrečioje rūšyje (1.3 pav. B) (Drinnenberg *et al.*, 2011). Manoma, kad tam tikrame *Saccharomyces sensu stricto* mielių evoliucijos etape tapo naudingiau užtikrinti dgRNR viruso replikaciją, negu turėti RNR interferencijos mechanizmą (Drinnenberg *et al.*, 2009; Drinnenberg *et al.*, 2011).

## 1.2 *Saccharomyces* gentyje aptinkami dgRNR virusai

Pirmos užuominos apie virusines mielių sistemas siekia 1963 metus, kai Bevan ir Makower nustatė, kad tam tikri mielių kamieniai pasižymi biocidiniu aktyvumu prieš kitas mieles. Šis fenotipas buvo apibūdintas kaip *S. cerevisiae* savybė gaminti ir sekretuoti toksiškumu pasižymintį baltymą – kilerinį toksiną, kuris geba žudyti jam jautrias mielių ląsteles. Atliekant tolimesnius tyrimus paaiškėjo, kad šis fenomenas yra plačiai paplitęs ir dažnai aptinkamas kitose mielių rūšyse (Schmitt ir Breinig, 2002). Genetinės determinantės, lemiančios kilerinio fenotipo pasireiškimą, gali būti įvairios: *Totiviridae* virusų šeimai priklausančio dgRNR viruso palydovai (Bostian *et al.*, 1984; Schmitt ir Tipper, 1990; Dignard *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1994; Schmitt ir Neuhausen, 1994; Schmitt *et al.*, 1997; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2015; Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017), linijinės DNR plazmidės (Gunge *et al.*, 1981; Hayman ir Bolen, 1991; Worsham ir Bolen, 1990) arba chromosominiai genai (Goto *et al.*, 1990a; Goto *et al.*, 1990b; Goto *et al.*, 1991).

Daugiausia tyrimų atlikta tiriant *Saccharomyces* genties virusinės kilmės kilerines sistemas. Kilerinę sistemą sudaro du komponentai: L-A virusas ir jo M palydovas (Magliani *et al.*, 1997). *Totiviridae* dgRNR virusų šeimai priskiriamo L-A viruso genome koduojami du baltymai: viruso kapsidės baltymas ir nuo RNR priklausoma RNR polimerazė. L-A viruso dgRNR palydovas koduoja preprotoksina, kuris vykstant potransliacinėms modifikacijoms subręsta į kilerinį toksiną (Wickner, 1996; Schmitt ir Breinig, 2006). Kilerinį toksiną produkuojančios mielės pasižymi atsparumu jam, tačiau

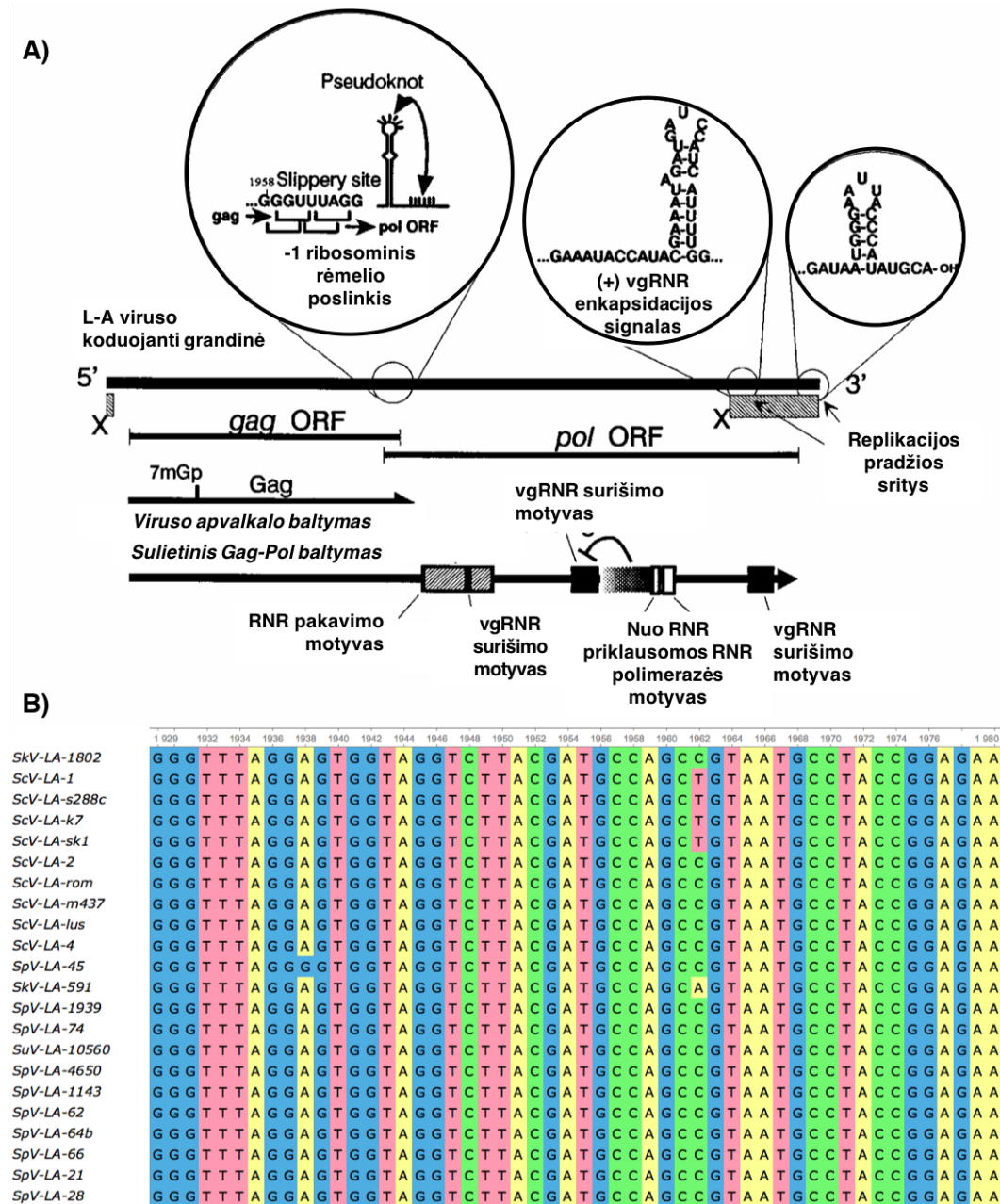
dažnu atveju yra jautrios kitų mielių produkuojamiems toksinams (Schmitt ir Breinig, 2006).

### 1.2.1 L-A ir M virusų genomų sandara

L-A dgRNR viruso 4,6 kb didžio genome koduojami du persidengiantys atviro skaitymo rėmeliai. Pirmasis atviro skaitymo rėmelis koduoja 76 kDa kapsidės baltymą Gag. Antrasis skaitymo rėmelis yra transliuojamas vykstant -1 rėmelio poslinkiui transliacijos metu ir yra išreiškiamas kaip 171 kDa dydžio sulietinis baltymas Gag-Pol (Wickner, 1996). Šis rėmelio poslinkis transliacijos metu vyksta dėl savitos RNR struktūros *gag* ir *pol* atviro skaitymo rėmelių persidengimo vietoje. Transliacijos metu vykstantį -1 rėmelio poslinkį lemia susidaręs RNR pseudomazgas, ties kuriuo vykstant transliacijai ribosoma trumpam sustoja (1.4 pav. A ir C) (Lopinski *et al.*, 2000). Nustatytas rėmelio poslinkio dažnis siekia apie 2% nuo visų transliuojamų viruso nuorašų (Icho ir Wickner, 1989; Dinman *et al.*, 1991). Visų šiai dienai žinomų L-A virusų variantų rėmelio poslinkio regionas yra konservatyvus (1.4 pav. C). Dar vienas ypatingai konservatyvus regionas, pasižymintis 100% identiškumu tarp visų žinomų L-A virusų variantų, randamas polimerazės domeną koduojančio atviro skaitymo rėmelio 3'-galinėje dalyje (1.4 pav. C). Šis regionas yra būtinas sėkmingam koduojančios grandinės pakavimui į virusinę kapsidę (Fujimura *et al.*, 1990). Viengrandininės RNR (vgRNR) pakavimą atlieka Gag-Pol baltymo Pol domeno N-gale esanti sritis (Fujimura *et al.*, 1992).

Literatūroje aprašyti aštuoni *Saccharomyces cerevisiae* ir *Saccharomyces paradoxus* rūšyse aptinkami L-A viruso M palydovai. M palydovo genomai yra 1,6 - 2,4 kb dgRNR. Genomą sudaro 4 struktūriniai elementai: trumpas 5'-netransliuojamas regionas, už jo esantis atviro skaitymo rėmelis, koduojantis preprotoksiną. Už preprotoksiną koduojančio atviro skaitymo rėmelio išsidėsčiusi kelių šimtų nukleotidų ilgio adeninu turtinga seka. Likusi geno dalis yra ilgas 3'-netransliuojamas regionas (Bostian *et al.*, 1984; Schmitt ir Tipper, 1990; Dignard *et al.*, 1991; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2011; Ramírez *et*

al., 2015; Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017). M palydovų genomų 3'-gale aptinkamos plaukų segtuko struktūros, manoma, būtinos palydovo pakavimui į virusinę kapsidę (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017).



1.4 pav. DgRNR virusų genomų ypatybės. A) Pagrindiniai L-A viruso geno kodojančios grandinės regionai. Pažymėtas -1 ribosominio rėmelio poslinkio regionas, pakavimo signalas ir 3' gale esantis esminis nekodojančios grandinės replikacijos pradžios regionas. Pažymėti gag ir pol atviro skaitymo rėmeliai bei translacijos metu gaunami viruso kapsidės baltymas Gag ir sulietinis Gag-Pol baltymas. Gag-Pol baltyme pažymėti domenai, kurie suriša vgRNR (Wickner, 1996); B) Skirtingų L-A virusų konservatyvaus ribosominio rėmelio poslinkio regiono palyginys.

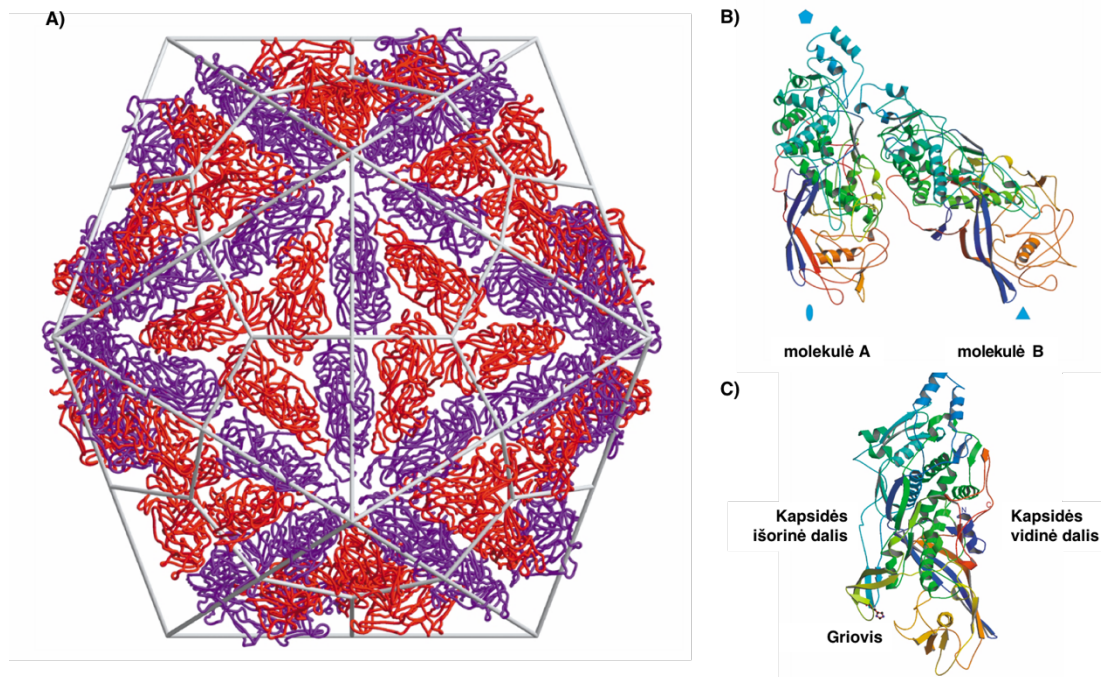


L-A viruso ir jo M palydovo dgRNR genomų ir jo nuorašų 5'-galuose aptinkamas guanozindifosfatas (Nemeroff ir Bruenn, 1987; Masison *et al.*, 1995; Fujimura ir Esteban, 2010). Manoma, kad tokia struktūra padeda viruso genomui ir nuorašams išvengti egzozonukleazės Xrn1 (Fujimura ir Esteban, 2010). Xrn1 baltymas pasižymi stipriu 5'→3' egzozonukleaziniu aktyvumu 5'-monofosforilintai RNR. Esant RNR 5' galui trifosforilintam arba turint „kepurės“ struktūrą, Xrn1 pasižymi labai silpnu 5'→3' egzozonukleaziniu aktyvumu (Fujimura ir Esteban, 2010). Xrn1 egzozonukleazė neatpažįsta ir nehidrolizuoja RNR molekulės, 5'-gale esant guanizinodifosfatui (Fujimura ir Esteban, 2010).

### 1.2.2 L-A viruso kapsidė

Ikosaedrinė L-A viruso kapsidė yra 39 nm skersmens, T = 1 ikosaedro simetrijos, sudaryta iš 60 asimetrinių Gag baltymo dimerų (1.5 pav.) (Cheng *et al.*, 1994; Naitow *et al.*, 2002). Kapsidės viduje yra supakuotas dvigrandininis RNR genomas. Remiantis krioelektroninės (Castón *et al.*, 1997) ir rentgenostruktūrinės analizės (Naitow *et al.*, 2002) metu gautomis struktūromis, nustatyta, kad virusinėje kapsidėje yra 60 nedidelių 10-15 Å skersmens ertimių. Šios ertmės yra pakankamai didelės, kad į vidų galėtų patekti RNR sintezei reikalingi trifosfatai, o į išorę galėtų išeiti tik viengrandininė RNR (Castón *et al.*, 1997). Tačiau šios ertmės yra pakankamai mažos, kad į kapsidės vidų galėtų patekti ląstelinės nukleazės ir kiti fermentai, galintys stabdyti RNR sintezę arba degraduoti nukleorūgštis (Castón *et al.*, 1997). Iš 120 virusinę dalelę sudarančių Gag baltymų, 1-2 Gag molekulės turi prie C-galo prilietą nuo RNR priklausomą RNR polimerazę. Gag-Pol baltymas sintetinamas transliacijos metu vykstant rėmelio poslinkiui (1.4 pav. A) (Ribas ir Wickner, 1998). Gag-Pol baltymas L-A virusui yra ir replikazė, ir transkriptazė. Virusų replikacija ir transkripcija vyksta viriono viduje (Castón *et al.*, 1997). Manoma, kad viruso RNR polimerazė yra išsidėsčiusi kapsidės viduje, ties viena iš 5-to laipsnio simetrijos ašimi. Taip išsidėsčiusi polimerazė

gali tiesiogiai eksportuoti naujai sintetinamą nuorašą iš nukleokapsidės (Castón *et al.*, 1997; Naitow *et al.*, 2002).

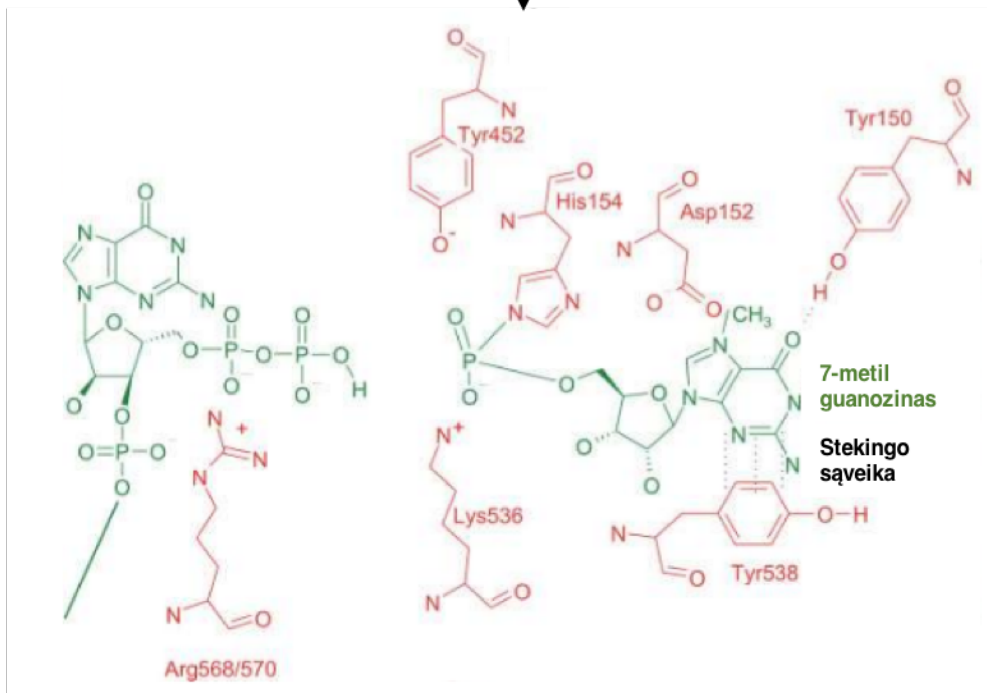
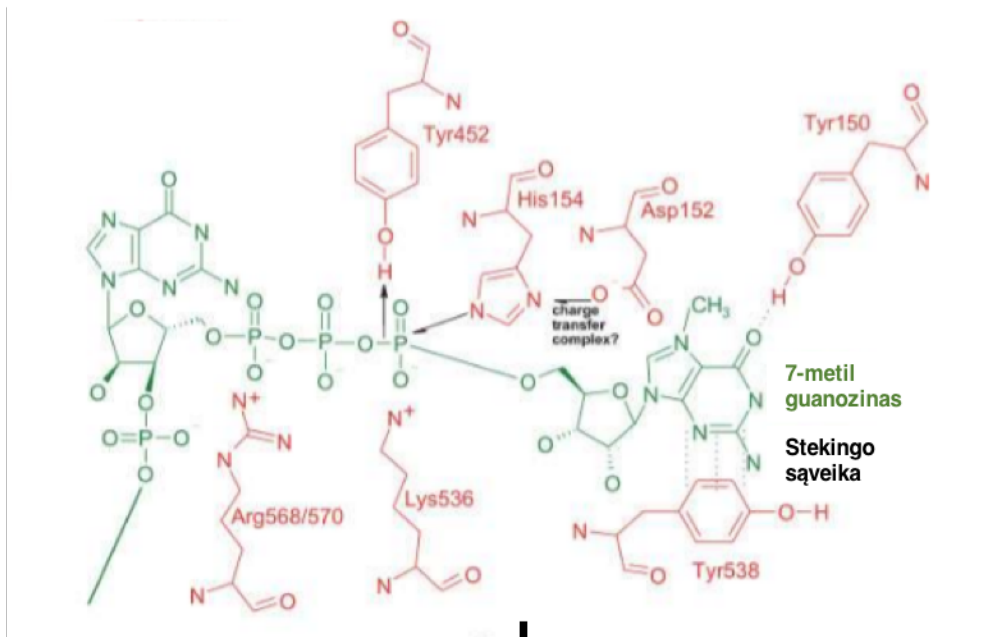


1.5 pav. DgRNR L-A viruso kapsidės struktūra. A) Nukleokapsidės struktūra. Raudona ir violetinė spalvomis žymimi skirtingi asimetrinio dimero Gag baltymo monomerai. Pilkomis linijomis pažymėtas ikosaedras; B) Asimetrinis Gag baltymo dimeras. Asimetrinis dimeras formuoja ikosaedrinę kapsidę. Spalvinis gradientinis spalvų parinkimas: nuo N-galo (mėlyna spalva) iki C-galo (raudona spalva). Mėlynomis figūromis pažymėtos asimetrinio dimero simetrijos ašys (atitinkamai penkiakampiu – 5-to laipsnio simetrijos ašis, trikampiui – trečio laipsnio simetrijos ašis, ovalu – antro laipsnio simetrijos ašis); C) Gag baltymo monomeras. Spalvinis gradientinis spalvų parinkimas: nuo N-galo (mėlyna spalva) iki C-galo (raudona spalva) (Naitow *et al.*, 2002).

Tiriant *Saccharomyces cerevisiae* baltymus, sąveikaujančius su informacinės RNR metilinta 5' kepurės struktūra, buvo pastebėta, kad su specifiniu m<sup>7</sup>GDP sorbentu geba rištis L-A viruso koduojamas Gag baltymas (Blanc *et al.*, 1992). Vėlesnių tyrimų metu identifikuota, kad Gag baltymas geba atpažinti endogeninių informacinės RNR molekulių 5' kepurės struktūrą ir ją hidrolizuoti (Blanc *et al.*, 1994; Masison *et al.*, 1995). Buvo nustatyta, kad kepurės nuskėlimui (*angl. cap-snatching*) yra būtina Gag baltymo 154 pozicijoje esanti histidino aminorūgštis (His154) šoninė grupė ir pasiūlytas kepurės struktūros nuskėlimo mechanizmas (1.6 pav.) (Blanc *et al.*, 1994; Naitow *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2005). His154 yra būtinas M1 palydovo

koduojamo toksino transliacijai. Keičiant His154 kitomis amino rūgštimis, buvo stebimas M1 palydovo koduojamo baltymo fenotipinės išraiškos išnykimas, nors M palydovo genomo replikacijai His154 pakeitimas kita amino rūgštimi įtakos nedarė (Blanc *et al.*, 1992). Tačiau kamienuose, kuriuose atlikta Xrn1/Ski1 baltymą koduojančio geno delecija, buvo stebimas M1 palydovo koduojamo toksino suteikiamo ląstelėms klerinio fenotipo grįžimas, net ir esant L-A viruso koduojamo Gag baltymo His154 mutacijai (Masison *et al.*, 1995). Fujimura ir Esteban pademonstravo, kad esant savitoms reakcijos sąlygoms, *in vitro* L-A viruso Gag baltymas gali nuo ląstelės endogeninės informacinės RNR nuskeltą m<sup>7</sup>GpppGp kepurę perkelti ant susintetinto virusinio transkripto (Fujimura ir Esteban, 2012). Taip pat nustatyta, kad *in vitro* kepurės perkėlimo reakcijai būtinas akceptorius 5' GDP galas. Jei akceptorius 5'-gale yra GTP arba GMP, kepurės perkėlimo reakcija *in vitro* nevyksta (Fujimura ir Esteban, 2012).

Rentgenostruktūrinės analizės metu nustatytoje Gag baltymo struktūroje His154 išsidėstęs kapsidės išorėje (1.5 pav. C) ir yra struktūroje matomo išorinio griovio dalis (1.5 pav. C). Nustatyta, kad struktūriškai panašus griovys yra RNR guanililtransferazės, kuri pasižymi kepurės nuskėlimo aktyvumu, aktyviajame centre (Naitow *et al.*, 2002). Atliekant išsamų rentgenostruktūrinės analizės metu gautų duomenų įvertinimą, nustatytas elektronų tankio padidėjimas griovyje, esančiame ties His154 (Naitow *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2005). Stebimas elektronų tankio padidėjimas sutampa su galima m<sup>7</sup>GDP kepurės pozicija, kuomet m<sup>7</sup>GDP fosfato grupės išsidėsčiusios ties His154, o guanino bazė yra įsiterpusi griovio viduje ir sąveikauja su Tyr452 ir Tyr538 stekingo sąveika (1.6 pav.) (Tang *et al.*, 2005). Baltymų, atpažįstančių ir sąveikaujančių su 5' kepure, išskirtinis bruožas yra tai, kad jie turi po dvi aromatinės amino rūgštis kepurės surišimo kišenėje (Wickner *et al.*, 2013). Autoriai pasiūlė L-A viruso Gag baltymo vykdomą kepurės nuskėlimo mechanizmą (1.6 pav.) (Tang *et al.*, 2005).



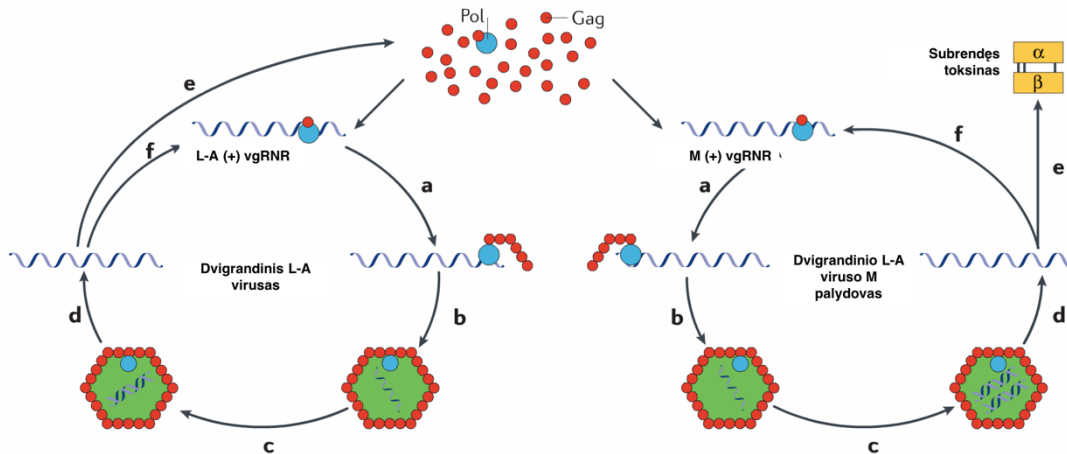
1.6 pav. L-A viruso Gag baltymo vykdomo 5' kepurės nuskėlimo nuo informacinės RNR reakcijos modelis. Informacinė RNR molekulė (substratas) pažymėta žalia spalva, baltymo aktyvųjų centrą sudarančios amino rūgščių šoninės grupės pažymėtos raudonai. Manoma, kad Tyr452 hidroksilo grupė paruošia 5'-kepurės  $\alpha$  fosfatinę grupę nukleofilinei atakai, kurią vykdo His154. Tyr538, Tyr150

sąveikauja su 7-metilguanizino nukleobaze, tuo tarpu Lys536, Arg568 ir Arg570 yra prisijungusios prie informacinės RNR (Tang *et al.*, 2005).

### 1.2.3 L-A viruso replikacija

L-A viruso koduojama nuo RNR priklausoma RNR polimerazė yra viruso replikazė ir transkriptazė (Wickner, 1996). Viruso replikacija vyksta kapsidės viduje, koduojančios grandinės sintezė vyksta konservatyviu būdu – nuo virusinio dgRNR genomo susintetinama koduojanti vgRNR molekulė (Fujimura *et al.*, 1986). Naujai susintetinta koduojanti RNR molekulė, 3'-gale turinti pakavimo signalą, gali būti atpažinta L-A viruso Gag-Pol baltymo (Fujimura ir Wickner, 1988; Fujimura *et al.*, 1992). *In vitro* pademonstruota, kad Gag-Pol baltymo Pol dalyje yra trys domenai (172-190, 374-432, 770-819 a.r.), specifiskai surišantys virusinę vgRNR (1.4 pav. A) (Ribas, *et al.*, 1994a; Ribas *et al.*, 1994b) Darbų autoriai mano, kad sulietinio Gag-Pol baltymo ir jo atpažįstamos vgRNR kompleksas inicijuoja kapsidės susidarymą. Tokiu mechanizmu užtikrinamas bendras koduojančios grandinės ir nuo RNR priklausomos RNR polimerazės pakavimas į naujai besiformuojančią kapsidę (Fujimura *et al.*, 1992; Ribas *et al.*, 1994b). Susidariusioje kapsidėje, turinčioje Gag-Pol baltymą ir vgRNR, pradedama nekoduojančios grandinės sintezė – replikacijos žingsnis (Fujimura *et al.*, 1986). Nustatyta, kad kapsidėje yra tik viena dgRNR genomo kopija (Fujimura *et al.*, 1990). DgRNR turinčioje kapsidėje pradedama koduojančios grandinės sintezė – vykdoma transkripcija (1.7 pav.) (Fujimura *et al.*, 1986).

L-A viruso M palydovo replikacijos ciklas yra tapatus paties L-A genomo replikacijos ciklui (1.7 pav.), tačiau L-A ir M dgRNR replikacija ir transkripcija vykdoma skirtingose kapsidėse (Bostian *et al.*, 1980). M palydovo kapsidėse randamos 1 – 2 dgRNR molekulės. Nustatyta, kad kapsidės, turinčios dvi M palydovų dgRNR, vykdo tik koduojančios grandinės sintezę. Tuo tarpu kapsidėse, turinčiose vieną M palydovo dgRNR molekulę, pirmiausia susintetinama nauja koduojanti grandinė, kuri lieka kapsidėje ir yra paverčiama dgRNR (Esteban ir Wickner, 1986). Toks replikacijos būdas vadinamas „*headful replication*“.



1.7 pav. L-A viruso ir jo M-palydovo replikacijos ir transkripcijos ciklas. (a) (+) virusinės vgRNR pakavimas; (b) kapsidės susidarymas; (c) replikacija – (-) grandinės sintezė; (d) transkripcija – (+) grandinės sintezė; (e) (+) grandinės, koduojamų baltymų translacija; (f) Gag-Pol baltymas atpažįsta (+) vgRNR (Schmitt ir Breinig, 2006).

#### 1.2.4 Ląstelės baltymai, būtini virusui replikuotis ląstelėje

Aprašyta keletas ląstelės-šeimininko baltymų, darančių esminę įtaką L-A viruso ir jo M palydovo replikacijai, koduojamų baltymų translacijai ir potransliacinėms modifikacijoms (Wickner, 1996). Atliekant *S. cerevisiae* delecinių mutantų tyrimus, nustatyta aštuonių genų grupė – *SKI* genai (angl. *superkiller*). Virusą turinčiame kamiene pašalinus šiuos genus, stebimas L-A viruso ir jo M palydovo genomo kopijų skaičiaus padidėjimas ląstelėje, taip pat stebimas kilerinio fenotipo sustiprėjimas (Toh *et al.*, 1978; Ridley *et al.*, 1984; Masison *et al.*, 1995). Šios genų grupės koduojami baltymai sudaro antivirusinę SKI sistemą. Ši sistema sudaryta iš 5'→3' egzonukleazės Xrn1 (Ski1) ir 3'→5' egzonukleaziniu aktyvumu pasižyminčio daugiadomenio komplekso, kurį sudaro: Ski kompleksas (Ski2, Ski3, Ski8) (Brown *et al.*, 2000) ir egzosoma (dešimties baltymų kompleksas, tarp kurių yra Ski4/Csl4, Ski6) (van Hoof *et al.*, 2000; Mitchell ir Tollervey, 2000), Ski kompleksą su egzosoma jungia baltymas Ski7 (Araki *et al.*, 2001). Xrn1 baltymas degraduoja kepurės neturinčią informacinę RNR 5'→3' kryptimi (Hsu ir Stevens, 1993). Rowley su kolegomis pademonstravo Xrn1 ir L-A viruso Gag baltymų fizinę sąveiką. Nėra aišku, ar Xrn1 geba atpažinti Gag ir su juo sąveikaudamas užsiima pozicijas L-A virusinių transkriptų neutralizavimui, ar L-A viruso Gag

baltymas (ar jo dalis) atpažįsta Xrn1, tokiu būdu deaktyvuodamas Xrn1 egzozonukleazę (Rowley *et al.*, 2016).

Kita genų grupė, kurių koduojami baltymai yra svarbūs viruso ir jo palydovo replikacijai ir M palydovo koduojamo baltymo fenotipiniam pasireiškimui, vadinami *MAK* genais (angl. *maintenance of killer*). Nustatyta apie 30 genų, reikalingų stabiliai M1 ir M2 palydovų replikacijai ir kilerinio fenotipo išraiškai (Wickner, 1996). Visi *MAK* genai, išskyrus *MAK3*, *MAK10* ir *MAK31*, manoma, yra svarbūs tik M palydovo replikacijoje, tačiau ne paties L-A viruso genomo replikacijai. Esant *MAK3*, *MAK10* arba *MAK31* genų delecijoms, L-A virusas nebegali replikuotis (Sommer ir Wickner, 1982). Ląstelėje sąveikaudami Mak3, Mak10 ir Mak31 baltymai sudaro N-galo acetiltransferazės kompleksą (NatC) (Rigaut *et al.*, 1999) ir esant bent vieno iš šiuos baltymus koduojančio geno delecijai, kompleksas nėra sudaromas (Polevoda ir Sherman, 2001). Tiriant rekombinantinio L-A viruso raišką nustatyta, kad esant *MAK3* geno delecijai nevyksta L-A viruso koduojamo Gag baltymo N-galo acetilinimas ir viruso kapsidės nesusidaro (Tercero ir Wickner, 1992).

Išskyrus *MAK1* geną, kuris koduoja DNR topoizomerazę I, ir jau minėtus *MAK3*, *MAK10* ir *MAK31* genus, visi likę *MAK* genų koduojami baltymai yra susiję su ribosomos 60S subvieneto biogeneze bei yra svarbūs M palydovo replikacijai. Tiriant kamienus, turinčius šių *MAK* genų delecijas, nustatyta, kad juose esantis L-A virusas nebevykdo M palydovo replikacijos. Dažnu atveju stebimas ir L-A viruso genomo kopijų skaičiaus sumažėjimas 2–4 kartus (Ohtake ir Wickner, 1995; Edskes *et al.*, 1998). Manoma, kad tai vyksta dėl mutantiniuose kamienuose stebimo dramatiško laisvų 60S ribosomų kiekio sumažėjimo, dėl ko sintetinama mažiau L-A viruso koduojamų baltymų, kurių neužtenka užtikrinti tiek L-A, tiek M palydovo palaikymą (Ohtake ir Wickner, 1995).

Kaip minėta, yra gauta informacijos apie įvairius baltymus, dalyvaujančius dgRNR L-A viruso ir jo palydovo replikacijoje ir transliacijoje. Tačiau

tiesioginė L-A viruso koduojamo baltymo sąveika su ląstelės-šeimininko baltymais yra pademonstruota tik su jau minėta (1.1.3 skyrius) Xrn1 egzozonukleaze (Rowley *et al.*, 2016) ir Ded1 helikaze (Chong *et al.*, 2004). Chong su bendraautoriais pademonstravo, kad Ded1 baltymas sąveikauja su L-A viruso kapsidės baltymu. Taip pat tyrimo metu buvo pademonstruota, kad Ded1 baltymas paspartina L-A viruso nekokuojamos RNR grandinės sintezę *in vitro* (Chong *et al.*, 2004).

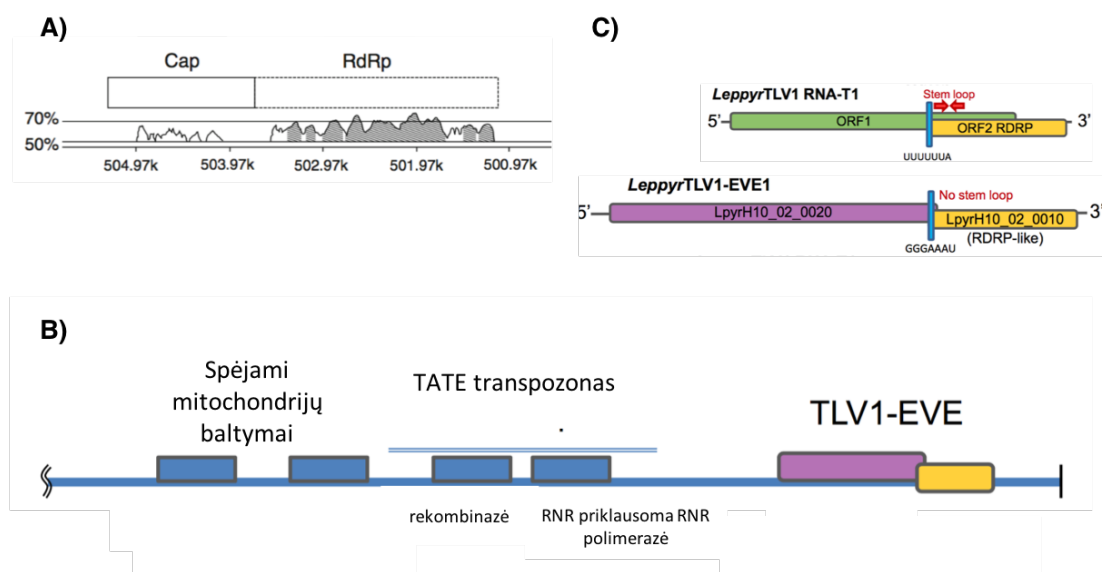
### 1.2.5 Endogeniniai virusiniai elementai

Retrovirusai yra vieninteliai žinomi eukariotinę ląstelę infekuojantys virusai, kurių dauginimosi ciklui būtina integracija į ląstelės-šeimininko genomą. Sekų, panašių į retrovirusus – endogeninių retrovirusų – aptikimas eukariotų genomuose nėra netikėtas (Feschotte ir Gilbert, 2012). Tuo tarpu į neretrovirusinius RNR virusus panašių sekų aptikimas eukariotų genomuose tapo netikėtu posūkiu virusologijos tyrimuose, kadangi pastarieji virusai nekoduoja atvirkštinės transkriptazės ir integravimo mechanizmui reikalingų baltymų (Crochu *et al.*, 2004). Šiuose genomuose nustatomos sekos skirtingų autorių vadinamos įvairiai: NIRV (*angl. non-retroviral integrated genome RNA virus*) (Taylor ir Bruenn, 2009), NERVE (*angl. non-retroviral endogenous RNA viral element*) (Taylor *et al.*, 2014) ir EVE (*angl. endogenous viral element*) (Katzourakis ir Gifford, 2010) – pastarasis pavadinimas yra dažniausiai vartojamas, kalbant apie endogeninius virusinius elementus. Vystantis genomo sekoskaitos technologijoms ir atsirandant vis daugiau organizmų, kurių genomų sekos yra nustatytos, kartu auga ir aptiktų EVE elementų kiekis. Augalų genomuose randami *Geminiviridae* (Bejarano *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2011), vabzdžių genomuose – *Flaviviridae* (Katzourakis ir Gifford, 2010; Belyi *et al.*, 2010), grybuose – *Totiviridae* (Taylor ir Bruenn, 2009; Frank ir Wolfe, 2009; Liu *et al.*, 2010) virusų šeimų EVE elementai.

Kokiu būdu ne retrovirusinės kilmės RNR ir DNR virusai įsiterpia į ląstelės-šeimininko genetinį kodą, nėra iki galo aišku. Yra užuominų, kad viruso perkėlimas į ląstelės genomą gali būti susijęs su transpozonu,



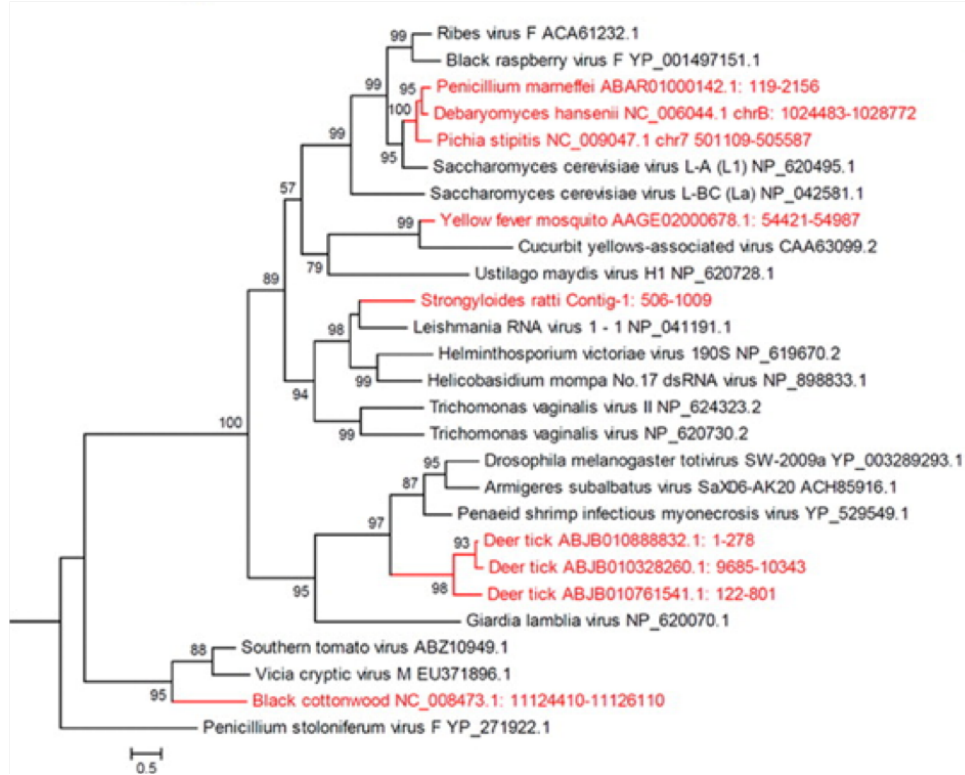
koduojančių atvirkštinę transkriptazę, aktyvumu (1.8 pav. B ir C) (Geuking *et al.*, 2009; Taylor ir Bruenn, 2009; Horie *et al.*, 2010; Grybchuk *et al.*, 2018). Ne retrovirusų kilmės DNR virusams pademonstruotas EVE formavimo mechanizmas susijęs su ląstelės-šeimininko dgDNR trūkių reparacija, kuomet dėl dgDNR trūkių vyksta nehomologinis galų sujungimas; tokiu būdu virusinė DNR gali būti integruojama į šeimininko genomą (Bill ir Summers, 2004).



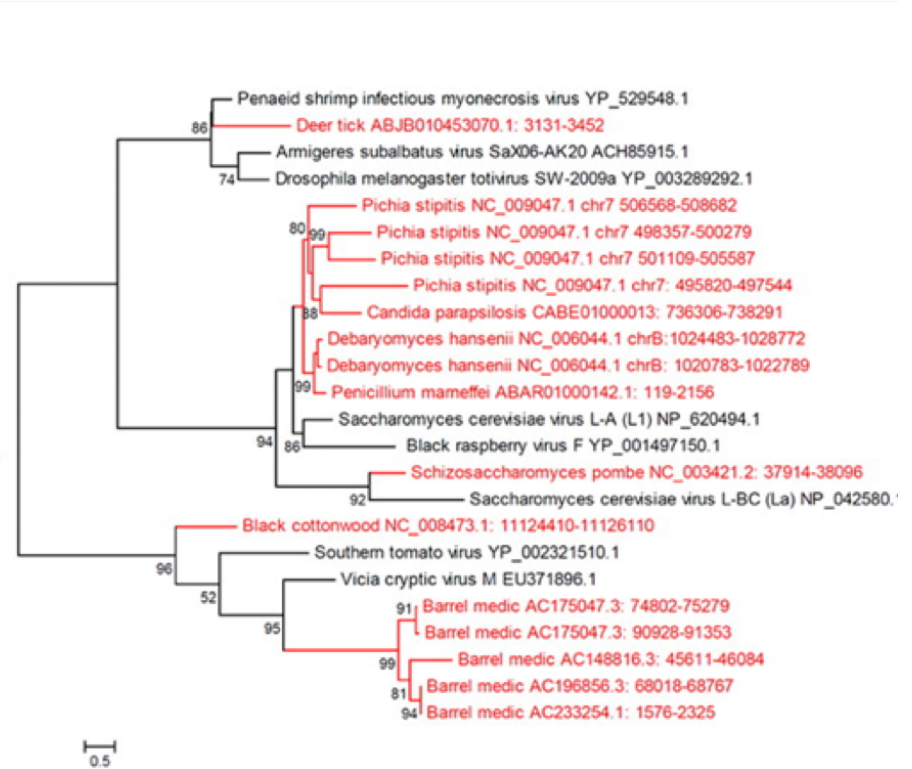
1.8 pav. Endogeniniai virusų elementai genome. A) EVE elementų, koduojamų *Shefferomyces stipitis* ir *Debaryomyces hansenii*, identiškas. *S. stipitis* ir *D. hansenii* sekų panašumo palyginimas. x ašyje atidėtos *S. stipitis* 7-tos chromosomos koordinatės (Bruenn, 2012); B) *Leptomonas pyrrocoris* chromosomoje esantis EVE elementas. Šis EVE elementas yra šalia tripanosomoms būdingo TATE transpozono, kas dažnai sutampa su galimu viruso genomo segmentų endogenizavimu. (Grybchuk *et al.*, 2018); C) Virusinio LeppyrTLV1 viruso genomo segmento RNA-T1 organizacijos palyginimas su *L. pyrrocoris* identifikuotu EVE elementu (Grybchuk *et al.*, 2018).

*Totiviridae* šeimos virusų EVE elementai aptinkami grybuose, augaluose, vabzdžiuose ir nematoduose. Kiekvienu atveju konkretus EVE elementas yra artimiausias konkrečios šeimos virusui: augaluose randami EVE elementai panašiausi į augaluose randamus *Totiviridae* šeimos virusus, grybuose randami EVE elementai panašiausi į grybuose aptinkamus *Totiviridae* šeimos virusus ir t.t. (1.9 pav.) (Liu *et al.*, 2010). Dalis EVE elementų yra transkribuojami ir vyksta jų koduojamų baltymų translacija (Bruenn, 2012). *S. cerevisiae* L-A viruso EVE elementai randami *Pichia stipitis*, *Shefferomyces stipitis* ir

A)



B)



1.9 pav. *Totiviridae* šeimos virusų ir jų infekuojamuose organizmuose sutinkamų EVE elementų filogenetinė analizė. (A) Nuo RNR priklausomos RNR polimerazės filogenetinis medis. (B) Kapsidės baltymo filogenetinis medis. Abu filogenetiniai medžiai sukonstruoti naudojant amino rūgščių sekas. Juodai žymimos viruso koduojamų baltymų sekos, raudonai – EVE elementų šakos (Liu *et al.*, 2010).

*Debaryomyces hansenii* mielių rūšyse (Liu *et al.*, 2010). Analizuojant šiuos EVE elementus nustatyta, kad labiausiai konservatyvi seka yra išlikusi nuo RNR priklausomą RNR polimerazę koduojančiame atviro skaitymo rėmelyje (1.8 pav. A). Tai leidžia manyti, kad šio EVE elemento koduojama nuo RNR priklausomos RNR polimerazė gali būti svarbi ląstelėje vykstantiems procesams (Bruenn, 2012).

### **1.3 Virusų ciklas ląstelėje**

#### **1.3.1 Ląstelės-šeimininko baltymai, dalyvaujantys RNR virusų replikacijoje**

Visuose viruso vystymosi ląstelėje etapuose dalyvauja ląstelės-šeimininko baltymai. Išsamiai ištirtas Q $\beta$  bakteriofago replikazės kompleksas. (+) vgRNR genomą turintis bakteriofagas Q $\beta$  infekuoja *E. coli* bakterijas (Blumenthal ir Carmichael, 1979). Q $\beta$  replikazės kompleksas atlieka bakteriofago genomo replikaciją ir transkripciją (Blumenthal ir Carmichael, 1979). Q $\beta$  replikazės kompleksą sudaro Q $\beta$  bakteriofago koduojama nuo RNR priklausoma RNR polimerazė (vadinama  $\beta$ -subvienetu) ir trys ląstelės-šeimininko baltymai: transliacijos elongacijos faktoriai EF-Tu, EF-Ts ir ribosominis baltymas S1 (Blumenthal ir Carmichael, 1979). Pastaraisiais metais atlikti kristalografiniai Q $\beta$  replikazės komplekso tyrimai atskleidė ląstelės-šeimininko baltymų funkciją Q $\beta$  replikazės komplekso susidaryme ir sintezės vykdyme. Kristalografinė analizė atskleidė, kad EF-Tu ir EF-Ts atlieka šaperono funkcijas ir kartu su  $\beta$ -subvienetu suformuoja Q $\beta$  replikazės šerdį (Takeshita ir Tomita, 2010). Pademonstruota, kad EF-Tu dalyvauja motininės ir naujai susintetintos grandinių atskyrimo, kartu su  $\beta$ -subvienetu sudarydamas tunelį, pro kurį nukreipiama motininė grandinė, taip užkirsdamas kelią dgRNR molekulės susidarymui (Takeshita ir Tomita, 2012). Ribosominis baltymas S1 yra būtinas Q $\beta$  bakteriofago nekoduojančios grandinės sintezei, matrica naudojant koduojančią grandinę. Tačiau S1 baltymas nėra reikalingas koduojančios grandinės sintezei, matrica naudojant nekoduojančią grandinę (Tomita, 2014). EF-Tu, EF-Ts ir S1 yra būtini baltymai *E. coli* baltymų

transliacijai – tai puikus pavyzdys, iliustruojantis kaip panaudodamas esminius ląstelės-šeimininko baltymus virusas užsitikrina savo replikaciją ir transliaciją.

Viruso baltymų pernaša ląstelėje į viruso replikacijos vietą, viruso replikacija, persijungimas iš replikacijos į transkripciją, genomo pakavimas yra įprastos (+) vgrNR virusų ciklo ląstelėje stadijos, kuriose virusai intensyviai naudojami ląstelės-šeimininko baltymais (Nagy ir Pogany, 2012). Augaluose aptinkami (+) vgrNR virusai evoliucijos eigoje neįtikėtinais prisitaikė prie ląstelės-šeimininko. Šie virusai savo replikacijai išnaudoja ląstelės baltymus, membranas, lipidus ir kitus metabolitus (Hyodo ir Okuno, 2014). Visi charakterizuoti eukariotų (+) vgrNR virusai replikacijos kompleksą sudaro ir pačią replikaciją vykdo vidinėse ląstelės membranų invaginacijose: endoplazminio tinklo, Goldžio aparato, chloroplastų, peroksisomų, vakuolių bei plazminės membranos (Miller ir Krijnse-Locker, 2008; Nagy ir Pogany, 2012). Naudojant skirtingas technikas, identifikuota nuo dešimčių iki šimtų ląstelės-šeimininko baltymų, sąveikaujančių su viruso baltymais ir darančių įtaką viruso ciklui ląstelėje. Naudojant *S. cerevisiae* delecinių kamienų biblioteką, nustatyta apie 130 genų, kurių nebuvimas veikia TBSV viruso (*angl.* Tomato bushy stunt virus) replikaciją (Panavas *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006), 30 genų, kurie turi įtakos TBSV viruso rekombinacijai (Serviene *et al.*, 2005; Serviene *et al.*, 2006) ir 146 genai, kurių padidintas sintezės lygis moduluoja TBSV viruso replikazės aktyvumą (Shah Nawaz-ul-Rehman *et al.*, 2012). Taikant analogiškus metodus nustatyti genai, kurių koduojami baltymai turi įtakos BMV (*angl.* Brome mosaic virus) viruso replikacijai (Kushner *et al.*, 2003; Gancarz *et al.*, 2011). Kitas plačiai naudojamas metodas yra proteominė analizė, kuomet identifikuojami baltymai, kurie gryninasi kartu su viruso replikacijos-transkripcijos kompleksu. Tokiu metodu nustatyti ląstelės-šeimininko baltymai, sąveikaujantys su viruso replikaciniu kompleksu šiuose virusuose: TBSV (Serva ir Nagy, 2006), ToMV (*angl.* Tomato Mosaic Virus) (Nishikiori *et al.*, 2006), *potyvirus* genties virusai (Dufresne *et al.*, 2008; Hafren *et al.*, 2010) ir RCNMV (*angl.* Red Clover Necrotic Mosaic Virus)

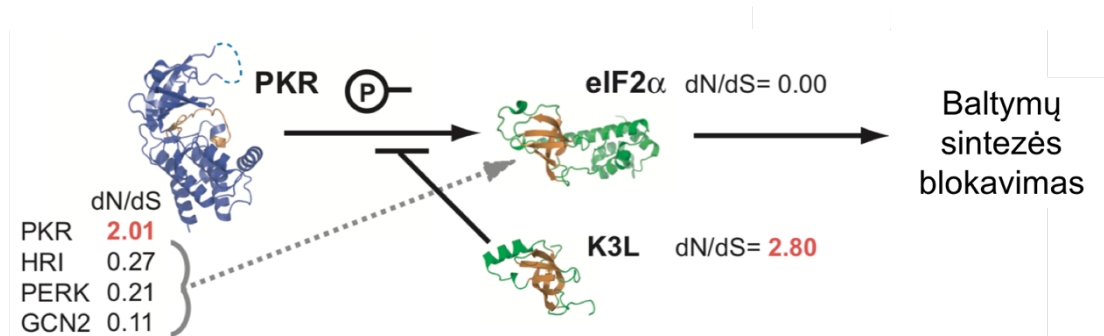
(Mine *et al.*, 2010). Didžiosios dalies identifikuotų baltymų konkrečios funkcijos viruso replikacijoje išlieka nežinomos ir reikalauja išplėstinių tyrimų.

### 1.3.2 Virusų įtaka šeimininko genų kintamumui

Didelė nekoduojančio genomo dalis vystosi veikiami neutralios atrankos (angl. *neutral selection*). Nesinoniminės (keičiančios amino rūgštį) ir sinoniminės mutacijos pseudogenuose pasižymi tokiu pačiu dažniu (Duggal ir Emerman, 2012). Didžioji dalis baltymus koduojančių genų vystosi veikiami stabilizuojančios atrankos (angl. *negative (purifying) selection*) – nesinoniminių mutacijų eliminavimas iš populiacijos, siekiant išlaikyti nepakitusią baltymo funkciją (Duggal ir Emerman, 2012). Į šeimininko ląstelę patekę virusai sąveikauja su šimtais ląstelės baltymų. Dalis šių baltymų yra ląstelės antivirusinės sistemos baltymai, kurie pasižymi aukštu evoliucijos greičiu ir yra veikiami kryptingos atrankos (angl. *positive selection*) – viruso ir ląstelės-šeimininko baltymų koevoliucijos pasekmės (Meyerson ir Sawyer, 2011; Daugherty ir Malik, 2012; Duggal ir Emerman, 2012). Ląstelės antivirusinį baltymą koduojantį geną, veikiamą stiprios kryptingos atrankos dėl viruso evoliucinio spaudimo, galima atpažinti stebint nesinoniminių mutacijų akumuliaciją (dN), lyginant su sinoniminėmis (dS) mutacijomis konkrečiame kodone. Nesinoniminių ir sinoniminių mutacijų dažnio įvertis, didesnis už 1 ( $dN/dS > 1$ ), leidžia daryti prielaidą, kad stebimoje pozicijoje galimai galėjo vykti kryptinga atranka (Hurst, 2002).

Vienas geriausiai ištirtų kryptingos atrankos pavyzdžių yra proteinkinazė R (PKR) koduojantis genas. Šis genas patiria bene didžiausius pokyčius veikiamas kryptingos atrankos. Proteinkinazė R pasižymi vienu didžiausiu adaptaciniu potencialu tarp žinduolių baltymų (Elde *et al.*, 2009). PKR represuoja daugybės virusų replikaciją, inicijuodamas ląstelės-šeimininko translacijos iniciacijos faktoriaus eIF2 $\alpha$  fosforilinimą, taip sustabdydama ląstelės-šeimininko baltymų sintezę (Langland *et al.*, 2006). Evoliucijos eigoje *Poxviridae* šeimos virusai, gripo virusas A (angl. *influenza virus A*), *Herpes simplex* virusas ir hepatito C virusas (angl. *hepatitis C virus*) išvystė

antagonistus PKR baltymui (Langland *et al.*, 2006). *Vaccinia* viruso koduojamas baltymas K3L yra eIF2 $\alpha$  translacijos faktoriaus homologas, kurio PKR nefosforilina. Tokiu būdu K3L baltymas inaktyvuoja PKR, taip suteikdamas galimybę *Vaccinia* virusui sėkmingai vykdyti savo transkripciją. Elde su kolegomis pademonstravo, kad PNK sekoje stebimas konkrečių amino rūgščių kitimas yra lemiamas baltymo adaptacijos prie virusų koduojamų baltymų kintamumo (Elde *et al.*, 2009).



1.10 pav. PKR kinazės atsako į virusinę infekciją schema. PKR, eIF2 $\alpha$  struktūros (PDB archyvas: 2A1A), K3L baltymo struktūra (PDB archyvas: 1LUZ). PKR, HRI, PERK, GCN2 yra kinazės fosforilinančios eIF2 $\alpha$ . Šių kinazių santykinis nesinoniminių ir sinoniminių (dN/dS) įvertis apskaičiuotas naudojant *Homo sapiens* ir *Macaca mullata* kinazių sekas. Pagal dN/dS įvertį vienintelė PKR kinazė veikiama kryptingos atrankos (dN/dS > 1) (Elde *et al.*, 2009).

Enard su kolegomis nustatė 1256 žmogaus baltymus (~13 % iš visų tyrime naudotų 9900, kurių konservatyvios sekos randamos visuose žinduolių genomuose), kurie tiesiogiai sąveikauja su įvairių virusų baltymais arba virusų genetinė medžiaga (Enard *et al.*, 2016). Tyrimo autoriai pademonstravo, kad didesnę dalį ląstelės-šeimininko baltymų, su kuriais sąveikauja virusai, ląstelėje atlieka konservatyvias funkcijas. Šie baltymai pasižymi dideliu adaptaciniu potencialu, lyginant su virusais nesąveikaujančių baltymų grupe (Enard *et al.*, 2016). Apibendrinami gautus rezultatus autoriai teigia, kad virusai yra pagrindinis adaptacinių mutacijų žmogaus (ir žinduolių) genome variklis (Enard *et al.*, 2016; Wilke ir Sawyer, 2016).

## 2 MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Medžiagos

#### 2.1.1 Reagentai

Visi šiame darbe naudoti reagentai buvo aukščiausio grynumo (molekulinės biologijos) laipsnio.

#### 2.1.2 Fermentai

Restrikcijos endonukleazės, FastDigest restrikcijos endonukleazės, šarminė fosfatazė FastAP, T4 polinukleotidkinazė, T4 DNR ligazė, DNaseI, T4 RNR ligazė, Maxima atvirkštinė transkriptazė, Phusion ir DreamTaq DNR polimerazės, DNR dydžio standartas O'GeneRuler Ladder Mix, baltymų dydžio standartas PageRuler Unstained Protein Ladder buvo įsigyti iš „Thermo Fisher Scientific“ ir naudoti laikantis gamintojo rekomendacijų.

#### 2.1.3 Molekulinės biologijos rinkiniai

GeneJet Gel Extraction Kit, GeneJet Miniprep Kit buvo įsigyti iš „Thermo Fisher Scientific“ ir naudoti laikantis gamintojo rekomendacijų.

#### 2.1.4 Terpės

Lentelė 2.1. Tyrimams naudotos mitybinės terpės ir jų sudėtis.

Terpė	Sudėtis	
LB	1 % peptono; 0,5 % mielių ekstrakto; 0,5 % NaCl. Į agarizuotą terpę pridedama 2 % agaro.	
YPD	2 % peptono; 1 % mielių ekstrakto; 2 % gliukozės. Į agarizuotą terpę pridedama 2 % agaro.	
SD	0,67 % Yeast Nitrogen Base; 2 % gliukozės.	Pagal poreikį pridedama uracilo (10 µg/ml) ir reikalingų aminorūgščių: L-leucinas (60 µg/ml), L-metioninas (10µg/ml), L-histidinas (10 µg/ml).
SR	0,67 % Yeast Nitrogen Base; 2 % rafinozės.	
SG	0,67 % Yeast Nitrogen Base; 2 % galaktozės.	
MD	0,5 % peptonas; 0,5 % mielių ekstrakto; 2 % gliukozės; 1,05 % citrinos rūgšties; 3,53 % Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O; 0,003 % metileno mėlio; 2 % agaro.	

## 2.1.5 Mikroorganizmų kamienai

Lentelė 2.2. Tyrimams naudoti mikroorganizmų kamienai.

Kamieno pavadinimas	Rūšis	Genotipas	Nuoroda
DH10B	<i>E. coli</i>	F <sup>-</sup> <i>endA1 deoR<sup>+</sup> recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Str<sup>R</sup> λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen
BY4741	<i>S. cerevisiae</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, ScV-LA-1</i>	Brachmann et al., 1998
BYΔLA	<i>S. cerevisiae</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, LA-0</i>	Šis darbas
BYER	<i>S. cerevisiae</i>	MATa <i>leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sec61-EGFP::HIS3, ScV-LA-1</i>	Šis darbas
α'1	<i>S. cerevisiae</i>	MATα, <i>leu2-2</i>	Čitavičius ir Inge-Večtomov, 1972
21PMR	<i>S. cerevisiae</i>	MATα, <i>leu2 ura3-52</i>	Jokantaitė ir Melvydas, 1996
K7	<i>S. cerevisiae</i>	MATa, <i>arg9, kil-K1</i>	Somers ir Bevan, 1969
M437	<i>S. cerevisiae</i>	ScV-LA-lus, M-2	Naumova ir Naumov, 1973
Rom K-100	<i>S. cerevisiae</i>	ScV-LA-2, M-2	Jokantaitė et al., 1982
KE	<i>S. cerevisiae</i>	ScV-LA-lus, M-lus	Dr. E. Servienė, nepublikuota
K28	<i>S. paradoxus</i>	SpV-LA-28, M-28	Pfeiffer ir Radler, 1984
64b	<i>S. paradoxus</i>	SpV-LA-64b, M-64b	Dr. E. Servienė, nepublikuota
66	<i>S. paradoxus</i>	SpV-LA-66, M-66	Dr. E. Servienė, nepublikuota

Darbe naudoti BY4741 kamieno deleciniai mutantai, kuriuose homologinės rekombinacijos būdu konkretus genas yra pakeistas į KanMX4 kasetę, įsigyti iš Open Biosystems.



## 2.1.6 Oligonukleotidai

Lentelė 2.3. Tyrimams naudoti oligonukleotidai.

Pavadinimas	Seka (5' → 3')	Aprašymas
AK-14+P	ggatcccgggaattcggtaatacactcactatattttatagtgagtcgtatta	Pradmuo skirtas prisiuvimui prie dgRNR (Potgieter <i>et al.</i> , 2009)
AK-15	ccgaattcccgggatcc	Pradmuo skirtas dgRNR genomo kDNR amplifikacijai (Potgieter <i>et al.</i> , 2009)
AK-60	cgccaaggaagggtgggttactaagaacctcgtccaggattttctgat ttgatgcgtacgctgcaggtcgac	Oligonukleotidai skirti BYER kamieno konstravimui, homologinės rekombinacijos būdu priliejant prie Sec61 baltymą koduojančio geno GFP baltymą koduojančią kasetę
AK-61	gtgtggctaaatgcgatttttttcttggatatttttcatttatattcaatcgaatcgcagctcg	
AK-62	ccgggctagctccagcaccagcaccagc	Pradmenų pora skirta pYM44 vektoriaus amplifikavimui
AK-63	gactcgagtgcgcgccacttctaaataagc	
AK-65	cactcgagtactgtacagctcgtccatgc	
AK-66	gagcggccgcgtccggagcaggtgctggtg	Pradmenys skirti skirtingus REazių taikinius turinčios mCherry baltymą koduojančios sekos amplifikacijai
AK-67	tcacgcgccgccttactaaaacattgtcc	
AK-69	ctactagttaaaaatgctgaagcttcgtacgctgc	
YCFH-AK-1	Gatccatggcggccgctgattacaaagacgatgacgataagggttctggtgatctcatcatc atcatcatcatta	
YCFH-AK-2	Ggcctaagatgatgatgatgatgatgagatccaccagaacccttatcgtcatcgtctttgtaacag cggccgcatg	
YCFH-AK-3	gcggatccttaaaaatgttgagattcgttaccataaaactcctcaag	Pradmuo skirtas Gag baltymo amplifikavimui
YCFH-AK-4	ctcacgcgccgcagatctgaaaccctgctgcgtacggcgtacactac	Pradmuo skirtas Gag baltymo amplifikavimui

## 2.1.7 Plazmidės

Lentelė 2.4. Tyrimams naudotos plazmidės.

Plazmidė	Aprašymas	Nuoroda
pUC19	Klonavimo vektorius	Thermo Fisher Scientific
pUC19-k7L	DgRNR L-A viruso iš <i>S. cerevisiae</i> K7 kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių	Šis darbas
pUC19-romL	DgRNR L-A viruso iš <i>S. cerevisiae</i> Rom K-100 kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių	Šis darbas
pUC19-m437L	DgRNR L-A viruso iš <i>S. cerevisiae</i> M437 kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių	Šis darbas
pUC19-m4L	DgRNR L-A viruso iš <i>S. cerevisiae</i> KE kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių	Šis darbas
pUC19-64bL	DgRNR L-A viruso iš <i>S. pradoxus</i> 64b kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių	Šis darbas
pUC19-66L	DgRNR L-A viruso iš <i>S. pradoxus</i> 66 kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių	Šis darbas
pUC19-28L	DgRNR L-A viruso iš <i>S. pradoxus</i> 28 kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių	Šis darbas
pUC19-k7M	DgRNR M palydovo iš <i>S. cerevisiae</i> K7 kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių	Šis darbas
pUC19-romM	DgRNR M palydovo iš <i>S. cerevisiae</i> Rom K-100 kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių	Šis darbas
pUC19-m437M	DgRNR M palydovo iš <i>S. cerevisiae</i> M437 kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių	Šis darbas
pUC19-m64bM	DgRNR M palydovo iš <i>S. pradoxus</i> 64b kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių	Šis darbas
pUC19-m66M	DgRNR M palydovo iš <i>S. pradoxus</i> 66 kamieno DNR kopija, įterpta į SmaI REaze linerizuotą pUC19 vektorių	Šis darbas
pYES2	Baltymus koduojančių genų raiškos mielėse vektorius	Invitrogene
pYM-N20	Plazmidė, P <sup>TEF1</sup> (konstitutyvinio promotoriaus) donoras	Janke et al., 2004

pYAK3	Vektorius sukonstruotas pYES2 (Invitrogen) plazmidėje pakeitus P <sup>GAL1</sup> – promotorių P <sup>TEF1</sup> – promotoriumi iš pYM-N20 plazmidės ir pakeitus klonavimo regioną naujai sukonstruotu klonavimo regionu, turinčiu FLAG ir HIS afininius inkarus koduojančias sekas	Šis darbas
pYAK3-GagWT+CFH	Amplifikuota LA-k7 viruso Gag baltymą koduojanti seka (amplifikacijai matrica naudota pUC19-k7L plazmidė ir AK-67, YCFH-AK-3 pradmenų pora), suformavus lipnius galus (BamHI ir NotI REazemis) įterpta į pYAK3 raiškos vektorių (linerizuota BamHI ir NotI REazemis) prie Gag baltymo C-galo priliejančią FLAG ir HIS afininius inkarus	Šis darbas
pYAK3-LAcDs	LA-k7 viruso Gag ir Gag-Pol baltymus koduojanti seka iškirpta (PstI ir Ecl136II REazės, 4315 bp fragmentas) iš pUC19-k7L plazmidės ir įklonuota į pYAK3-GagWT+CFH plazmidę (plazmidė kirpta PstI ir MssI REazėmis, naudojamas 5978 bp fragmentas). Gauta plazmidė, koduojanti pilno ilgio Gag ir Gag-Pol baltymus	Šis darbas
pYAK3-GagWT	Iš pYAK3-LAcDs plazmidės iškirptas P <sup>TEF1</sup> promotorius ir Gag baltymą koduojanti seka (plazmidė kirpta Ecl136II ir Eco47I REazėmis ir galai užbukinti naudojant T4 DNR polimerazę, naudojamas 2492 bp fragmentas) įterpiamas į paruoštą pYAK3 vektorių (vektorių kerpant Ecl136II ir MssI REazėmis, suformuojami buki galai). Gauta plazmidė koduoja pilno ilgio LA-k7 LA viruso Gag baltymą.	Šis darbas
pYAK3-GagΔ	Amplifikuota LA-k7 viruso Gag baltymą koduojanti seka iki rėmelio poslinkio regiono (amplifikacijai matrica naudojama pUC19-k7L plazmidė ir YCFH-AK3, YCFH-AK4 pradmenų pora. PGR produktas klonavimui paruoštas kerpant BamHI ir Pfl23I REazėmis) įterpta į paruoštą pYAK3 raiškos vektorių (vektorius karpomas BamHI ir MssI REazėmis). Gauta plazmidė koduojanti LA viruso Gag baltymą be C-galinio domeno (1 – 642 a.r.)	Šis darbas
pYM44	Plazmidė skirta kasetės, turinčios žaliai fluorescuojančio baltymą koduojančią seką ir koduojanti histidino selektyvumo markerį, paruošimui PGR metodu. Paruošta kasetė homologinės rekombinacijos būdu inkorporuojama prie pasirinkto endogeninio baltymo koduojančios sekos C-galo. Tokiu būdu gaunama genetinė	Janke et al., 2004

	konstrukcija, koduojanti chromosomoje endogeninį ląstelės-šeimininko baltymą su prilietu žaliai fluorescuojančiu baltymu.	
pHR-SFFV-KRAB-dCas9-P2A-mCherry	Plazmidė, mCherry amplifikacijai naudota matrica	Gilbert et al., 2014
pYM44-mCherry	pYM44 plazmidės pagrindu sukonstruota plazmidė. pYM44 plazmidėje pakeitus GFP baltymą koduojančią seką mCherry baltymą koduojančia seka.	Šis darbas
pYAK3-GagWT+mCherry	Amplifikuota mCherry koduojanti seka (amplifikacijai matrica naudojama pYM44-mCherry plazmidė ir AK-65, AK-66 pradmenų pora) įsiuvama į paruoštą pYAK3-GagWT+CFH plazmidę (vektorius paruošiamas pašalinant FLAG ir HIS afininius inkarus atliekant karpimą NotI ir XhoI REazėmis). Sukonstruota pYAK3-GagWT+mCherry plazmidė koduoja pilno ilgio LA viruso Gag baltymą su C-gale prilietu mCherry domenu	Šis darbas
pYAK3-GagWT-CFS-mCherry	pYAK3-GagWT+CFH plazmidėje pakeitus FLAG ir HIS afininius inkarus koduojančią seką (FLAG ir HIS inkarus koduojanti seka pašalinama kerpant NotI ir XhoI REazėmis), iš pYM44-mCherry plazmidės NotI ir XhoI REazėmis iškirpta seka, sukonstruojama plazmidė – pYAK3-GagWT-CFS-mCherry. Ši plazmidė koduoja pilno ilgio Gag baltymą, o įvykus transkripto ribosominio rėmelio poslinkio mutacijai koduoja Gag baltymą C-gale turintį ribosominio rėmelio poslinkio regione koduojamo Pol domeno N-galą, prie kurio prilietas mCherry domenas	Šis darbas
pYAK3-mCherry	Amplifikuota mCherry baltymą koduojanti seka (kaip matrica naudojama pYAK3-GagWT-CFS-mCherry plazmidė ir AK-69, AK-65 pradmenų pora) klonuojama į paruoštą pYAK3 vektorių (vektorius kerpamas BcuI ir XhoI REazėmis). Gauta pYAK3-mCherry plazmidė koduoja mCherry baltymą	Šis darbas

## 2.1.8 Buferiniai tirpalai

Lentelė 2.5. Tyrimams naudoti tirpalai ir jų sudėtis.

Tirpalo pavadinimas	Sudėtis
TB buferinis tirpalas	50 mM Tris-HCl (pH 9,3), 1% β-merkaptioetanolis
TES buferinis tirpalas	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,2 % NDS
PBS buferinis tirpalas	80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4), 200 mM NaCl
1xTE tirpalas	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8)
1xLiAc/0.5xTE tirpalas	100 mM ličio acetatas (pH 7,5), 5 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA
1xLiAc/40%PEG/1xTE tirpalas	100 mM ličio acetatas (pH 7,5), 40 % PEG-4000, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA
„Natrio tirpalas“	5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub>
„Kalcio tirpalas“	5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM CaCl <sub>2</sub> , 5 mM MgCl <sub>2</sub>
NaOH/SDS tirpalas	100 mM NaOH, 1 % SDS
Mielių ardymo buferinis tirpalas (ardant stiklo rutuliukais)	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM NaCl, 1 mM PMSF
Mielių ardymo buferinis tirpalas (ardant skystu azotu)	10 mM PBS (pH 7,4): 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 200 mM NaCl; 2 mM PMSF, 1 mM EDTA
5 x Baltymų užnešimo tirpalas	0,313 M Tris-HCl (pH 6,8), 10 % SDS, 0,05 % bromfenolio mėlis, 50 % glicerolis, 100 mM DTT

## 2.2 Metodai

### 2.2.1 Suminės nukleorūgščių frakcijos gryninimas iš mielių

Nuo lėkštelės paimta mielių kolonija užsėjama į 50 ml YPD terpę ir auginama purtant 20 val, 30 °C temperatūroje. Biomase surenkama centrifuguojant 5 min, 6000 x g, kambario temperatūroje. Pašalinus supernatantą, nuosėdos resuspenduojamos 4 ml 50 mM EDTA tirpalo ir centrifuguojamos 5 min, 6000 x g, kambario temperatūroje. Pašalinus supernatantą, ląstelės resuspenduojamos 4 ml TB buferinio tirpalo ir inkubuojamos 15 min kambario temperatūroje. Ląstelės centrifuguojamos 5 min, 6000 x g, kambario temperatūroje. Pašalinus supernatantą, ląstelės resuspenduojamos 8 ml TES buferinio tirpalo ir pridedama rūgštinio fenolio

(pH 5,2). Mėginiai inkubuojami 45 min purtant. Į mėginius pridedama po 8 ml chloroformo ir suplakama. Mėginiai centrifuguojami 45 min, 18000 x g, 4 °C temperatūroje. 9 ml vandeninės frakcijos perkeliama į naują mėgintuvėlį ir pridėdamas 1 ml 3 M natrio acetato tirpalo (pH 5,2), sumaišoma. Į mėginį įpilama 10 ml 100 % izopropanolio ir mėginiai gerai išmaišomi. Mėginiai centrifuguojami 10 min, 18000 x g, kambario temperatūroje. Pašalinus supernatantą, nuosėdos plaunamos 70 % etanoliu, džiovinamos ir tirpinamos 200 µl vandens.

### **2.2.2 Nukleorūgščių frakcionavimas ličio chloridu**

Suminės nukleorūgščių frakcijos mišinys maišomas su 4 M LiCl, kad galutinė LiCl koncentracija mėginyje būtų 2,8 M. Mėginiai 16 val inkubuojami 4 °C temperatūroje. Mėginiai centrifuguojami 45 min, 20000 x g, 4 °C temperatūroje. Supernatante lieka ištirpusios dvigrandinę struktūrą turinčios nukleorūgštys, tuo tarpu nuosėdas formuoja viengrandinę struktūrą turinčios nukleorūgštys. Supernatantas, kuriame ištirpusios dvigrandinės nukleorūgštys, perkeliamas į naują mėgintuvėlį. Pridėdamas lygus tūris 100 % izopropanolio ir 1/10 pradinio mėginio tūrio 3 M NaCl. Mėginiai gerai išmaišomi ir centrifuguojami 10 min, 20000 x g, kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas ir nuosėdos plaunamos 70 % etanoliu, džiovinamos ir tirpinamos vandenyje.

### **2.2.3 Nuo sekos nepriklausomas dgRNR genomų DNR kopijų amplifikavimas**

#### **Viengrandinio DNR pradmens prisiuvimas prie dvigrandinės RNR**

Prie išgrynintos dgRNR prisiuvas fosforilintas AK-14+P pradmuo. Ligavimo mišinys (Lentelė 2.6) inkubuojamas 16 val, 37 °C temperatūroje. Mėginys praskiedžiamas iki 200 µl ir sumaišomas su 200 µl „Binding buffer“ iš GeneJet Gel Extraction Kit. Nukleorūgštys iš mišinio išgryninamos naudojant GeneJet Gel Extraction Kit rinkinio kolonėlę ir remiantis gamintojo pateiktomis rekomendacijomis. Nuo kolonėlės membranos nukleorūgštys nuplaunamos 30 µl vandens.

Lentelė 2.6. AK-14+P pradmens lygavimo prie dgRNR reakcijos mišinys

Regentai	Kiekis
50 % PEG6000	12 µl
10x RNR ligazės buferinis tirpalas	3 µl
100 % DMSO	3 µl
dgRNR	250 ng
100 µM AK-14+P pradmuo	0,6 µl
RiboLock™ (25 u/µl)	0,4 µl
BSA (1 mg/1 ml)	3 µl
T4 RNR ligazė (5 U/µl)	3 µl
Vanduo be nukleazių	iki 30 µl

### Atvirkštinė transkripcija

DgRNR su prisiūtais AK-14+P pradmenimis grandinės išlydomos, į mišinį pridedant DMSO iki 15 % galutinės koncentracijos, ir inkubuojamos 2 min, 98 °C temperatūroje. Po inkubacijos mėginiai 5 min perkeliama į ledo vonelę. Išlydytos grandinės naudojamos atvirkštinės transkripcijos reakcijos mišinio ruošimui (Lentelė 2.7). Atvirkštinė transkripcija vykdoma 30 min, 50 °C. Reakcija stabdoma, inkubuojant mėginius 5 min, 85 °C.

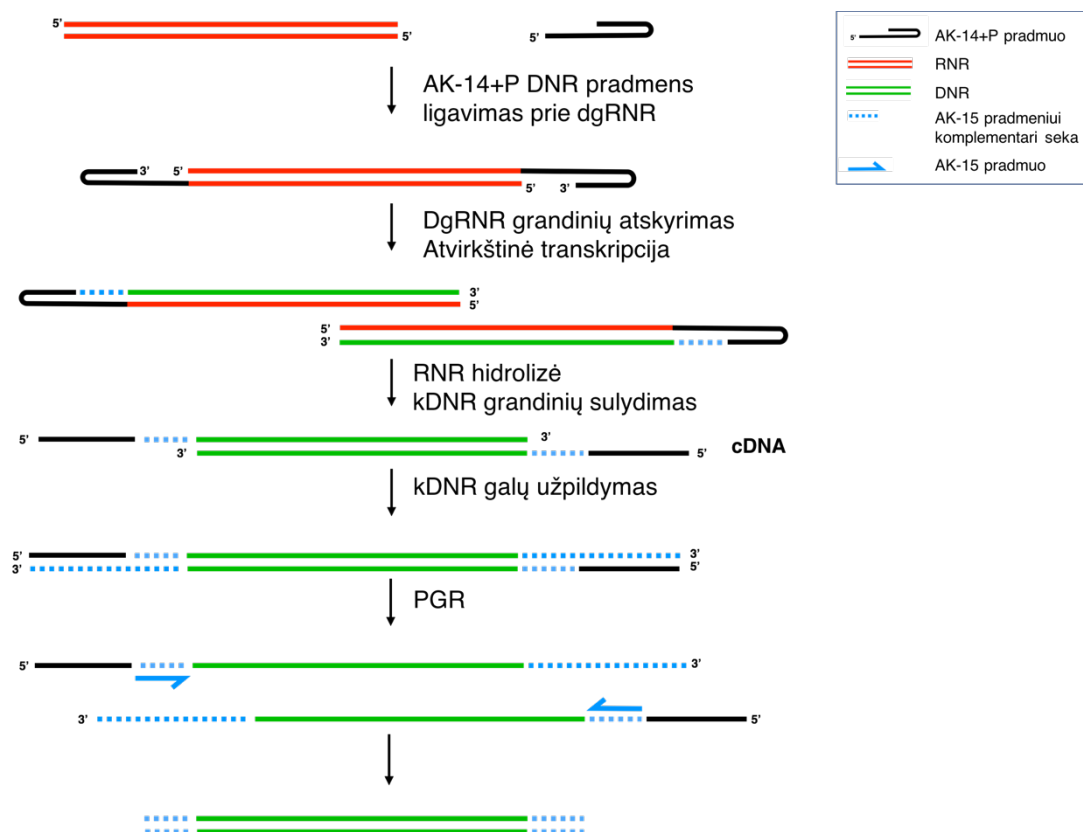
Lentelė 2.7. Atvirkštinės transkripcijos reakcijos mišinys.

Regentai	Kiekis
dgRNR su prisiūtu AK14+P pradmeniu	12 µl
5x atvirkštinės transkriptazės buferinis tirpalas	3 µl
10 mM dNTP miškas	3 µl
RiboLock™ (25 u/µl)	0,4 µl
Maxima atvirkštinė transkriptazė	3 µl
T4 RNR ligazė (5 U/µl)	3 µl
Vanduo be nukleazių	iki 20 µl galutinio reakcijos mišinio tūrio

### RNR hidrolizė ir kDNR grandinių sulydymas

Iš kDNR mišinio RNR pašalinama, į atvirkštinės transkripcijos mėginius pridėjus 2 µl 1 M NaOH (100 mM NaOH koncentracija galutiniame mišinyje) ir inkubavus 30 min, 65 °C temperatūroje. Po inkubacijos mėginiai atvėsina

ledo vonelėje. NaOH neutralizuojamas, į mėginį pridedant 6 µl 0.5 M Tris-HCl (pH 7,5) ir 2 µl 1 M HCl. Po atvirkštinės transkripcijos susidariusios komplementarios kDNR grandinės (2.1 pav.) sulydomos inkubuojant mėginius 150 min, 65 °C.



2.1 pav. Nuo sekos nepriklausomas dgRNR amplifikavimo metodas (Potgieter et al., 2009).

## kDNR padauginimas PGR metodu

Lentelė 2.8. PGR reakcijos mišinys.

Regentai	Kiekis
kDNR	5 µl
5x HF buferinis tirpalas	10 µl
10 mM dNTP	1 µl
10 µM AK-15	4µl
Phusion DNR polimerazė (2U/µl)	0,5µl
Vanduo be nukleazių	Iki 50 µl galutinio reakcijos mišinio tūrio



Gauta kDNR padauginama PGR būdu, naudojant Phusion DNR polimerazę. Lentelė 2.8 pateikti naudoti reakcijos mišiniai. Naudota PGR programa: 72 °C, 1 min (užpildomi kDNR vgdNR galai, taip suformuojant AK-15 pradmeniui komplementarias sekas (2.1 pav. kDNR galų užpildymas)); 98 °C, 30 s; [98 °C, 10 s; 68 °C, 30 s; 40 s/1 kb ]<sub>×25-30 ciklai</sub>; 72 °C, 5 min.

#### **2.2.4 *E. coli* kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija**

Į skystą LB terpę užsėjamas transformacijai pasirinktas bakterijų kamienas. Ląstelės auginamos, kol ląstelių kultūros tankis pasiekia apie 0,6 optinius vienetus 600 nm bangos ilgio šviesoje. Kuomet ląstelių kultūra pasiekia reikiamą tankį, ląstelių auginimas stabdomas, perkeliant jas į ledo vonią. Ląstelės surenkamos centrifuguojant iki 4 °C atšaldytoje centrifugoje 10 min, 1000 x g. Supernatantas nupilamas ir ląstelės resuspenduojamos pusėje pradinio tūrio atšaldyto „natrio tirpalo“. Resuspenduotos ląstelės centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nupilamas ir ląstelės resuspenduojamos pusėje pradinio tūrio atšaldyto „kalcio tirpalo“. Resuspenduotos ląstelės laikomos 20 min 4 °C temperatūroje. Ląstelės surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nupilamas ir ląstelės resuspenduojamos likusiame supernatante (~100 µl). Taip paruoštos ląstelės iki transformacijos laikomos 4 °C temperatūroje.

Vykdamt *E. coli* ląstelių transformaciją, imama 1-50 ng rekombinantinės DNR ir sumaišoma su 50 µl paruoštos kompetentinių ląstelių suspensijos. Transformacijos mišinys inkubuojamas 15 min 4 °C temperatūroje. Po to DNR ir ląstelių mišinys perkeliamas į 42 °C termostatą ir inkubuojamas 2 min. Po temperatūrinio šoko transformacijos mišinys skiedžiamas kambario temperatūros skysta LB terpe santykiu 1:10 ir inkubuojamas 15-60 min 37 °C temperatūroje, priklausomai nuo plazmidės koduojamo atsparumo konkrečiam antibiotikui. Atlikus ląstelių gaivinimą, 1:10 mėginio išsėjama ant agarizuotos LB terpės su pasirinktu antibiotiku. Jeigu transformacijai naudojama mažakopijinė plazmidė arba kompetentinės ląstelės yra transformuojamos ligavimo mišiniu, išsėjamos visos ląstelės.

### **2.2.5 Mažų plazmidinės DNR kiekių išskyrimas iš *E. coli* ląstelių**

Nuo lėkštelės paimamas nedidelis kiekis biomasės ir resuspenduojamas 100 µl 2xTE buferiniame tirpale. Pridedama 200 µl NaOH/SDS tirpalo ir atsargiai sumaišoma. Mėginiai iki 5 min inkubuojami kambario temperatūroje. Į mėginius pridedama 150 µl 3 M natrio acetato (pH 7,0), 450 µl CHCl<sub>3</sub> ir švelniai sumaišoma. Mėginiai centrifuguojami 10 min, 20000 x g, kambario temperatūroje. Vandeninė fazė perkeliama į naują mėgintuvėlį ir pridedamas lygus tūris izopropanolio, supurtoma ir centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Nuosėdos praplaunamos 75 % etanoliu, išdžiovinamos ir tirpinamos minimaliame vandens kiekyje.

### **2.2.6 *S. cerevisiae* kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija**

Į 10 ml YPD terpės užsėjamas transformacijai pasirinktas mielių ląstelės ir auginamas per naktį 30 °C termostatuojamoje purtyklėje. Naktinė kultūra skiedžiama YPD terpe santykiu 1:25, auginimas tęsiamas apie 3-5 val 30 °C temperatūroje, kol ląstelių kultūros tankis pasiekia apie 1,0 optinį vienetą 600 nm bangos ilgio šviesoje. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min, 1000 x g, kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas ir ląstelės resuspenduojamos 25 ml 1xTE tirpalo. Ląstelės centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Pašalinus supernatantą, ląstelės resuspenduojamos 1,5 ml 1xLiAc/0.5xTE tirpale ir inkubuojamos 10 min kambario temperatūroje.

Į 100 µl paruoštų kompetentinių ląstelių pridedama ~1 µg plazmidinės DNR (atliekant homologinę rekombinaciją – ~1 µg linearizuotos DNR), 700 µl 1xLiAc/40%PEG/1xTE ir gerai išmaišoma pipetuoju. Transformacijos mišinys inkubuojamas 30 min, 30 °C temperatūroje. Į mėginius pridedama po 88 µl DMSO ir gerai išmaišoma. Mėginiai inkubuojami 42 min, 42 °C temperatūroje. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 s, 6000 x g, kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, ląstelės resuspenduojamos 1ml 1xTE buferiniame tirpale ir centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis.

Pašalinius supernatantą, ląstelės resuspenduojamos 50 µl 1xTE ir išsėjamos ant selektyvios terpės.

### **2.2.7 Mielių kileriškumo testavimas**

Apie  $10^6$  BY4741 mielių kamieno ląstelių, transformuotų pYAK3 plazmide, sumaišoma su 20-25 ml MD terpe ir užpilama į Petri lėkštelę. Sustingus terpei, užnešama po 1,5 µl 20 val auginto testuojamo kamieno. Lėkštelės inkubuojamos kambario temperatūroje 3 paras. Aplink kilerinį toksiną produkuojančius kamienus susidaro skaidrios lizės zonos.

### **2.2.8 Mielių ląstelių ardymas**

#### **Grubių mielių lizatų paruošimas šarminės lizės būdu**

Paimamas 1ml tūrio per naktį skystoje auginimo terpėje užaugusios biomasės mėginys. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 1 min, 6000 x g, kambario temperatūroje. Pašalinius supernatantą, ląstelės resuspenduojamos 100 µl vandens. Į mėginius pridedama 0.2 M natrio šarmo, sumaišoma ir inkubuojama 5 min kambario temperatūroje. Mėginiai centrifuguojami 2 min, 20000 x g, kambario temperatūroje. Pašalinius supernatantą, nuosėdos resuspenduojamos 50 µl 1 x Baltymų užnešimo dažo ir mėginiai inkubuojami 3 min, 95 °C temperatūroje. Mėginiai centrifuguojami 2 min, 20000 x g. Poliakrilamidiniame gelyje analizuojama 2 – 10 µl paruošto baltyminio mėginio.

#### **Mielių lizatų paruošimas skystu azotu**

Per naktį užaugusios mielių ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min, 5000 x g, 4 °C. Ląstelės resuspenduojamos 0,1 pradinio tūrio vandens ir centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas pašalinamas ir ląstelės resuspenduojamos mielių ardymo buferiniame tirpale (1g biomasės – 5 ml ardymo buferinio tirpalo). Ląstelės perpilamos į skystu azotu atšaldytą tiglą ir užpylus papildomai skysto azoto intensyviai trinamos 15 min. Sutrinti mielių milteliai perkeliama į mėgintuvėlius ir centrifuguojami 10 min, 12 000 x g,

4 °C. Supernatantas perkeliamas į naują mėgintuvėlį ir centrifuguojamas tomis pačiomis sąlygomis. Gautas supernatantas yra tinkamas tolimesnei analizei.

### **Mielių lizatų paruošimas ardant stiklo rutuliukais**

Per naktį užaugusios mielių ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min, 5000 x g, 4 °C. Ląstelės resuspenduojamos 0,1 pradinio tūrio vandens ir centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas pašalinamas ir ląstelės resuspenduojamos mielių ardymo buferiniame tirpale (1 g biomasės – 1 ml ardymo buferinio tirpalo) ir pridedamas lygus biomasės svoriui stiklo rutuliukų (300 µm diametro). Ląstelės ardomos, stipriai plakant 10 kartų po 30 s, prieš kiekvieną plakimą perkeliant mėgintuvėlius 30 s į ledo vonelę. Po ardymo mėginiai centrifuguojami 10 min, 12000 x g, 4 °C temperatūroje. Supernatantas naudojamas tolimesnei analizei.

### **2.2.9 Virusinių dalelių gryninimas**

Suardžius mielių ląsteles skystu azotu (2.2.8 skyrius), gauto supernatanto tūris naudojant ardymo buferinį tirpalą padidinamas iki 23 ml. Mišinys užnešamas ant 15 ml 45 % sacharozės (sacharozė tirpinama ardymo buferiniame tirpale be PMSF) tirpalo ir centrifuguojamas 16 val, 70000 x g, 4 °C temperatūroje (naudojamas Kontron TST 28.38 rotorius ir Sanyo MSE MS60 centrifuga). Po centrifugavimo atsargiai pašalinamas sacharozės gradientas ir nuosėdos tirpinamos 500 µl ardymo buferiniame tirpale be PMSF.

### **2.2.10 Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje ir jo dažymas**

Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis atliekama Laemmli sistemoje iš 5 % koncentruojančio ir 8 % frakcionuojančio gelių. Ruošiami baltyminiai mėginiai sumaišomi su baltymų užnešimo tirpalu ir inkubuojami 5 – 10 min, 95 °C temperatūroje. Atvėsinti baltyminiai mėginiai įnešami į gelį. Elektroforezės pradžioje mėginiai frakcionuojami esant 15 mA srovės stipriui vienam geliui, kol pasiekia frakcionuojantį gelį. Frakcionuojančiame gelyje baltymai atskiriami padidinus srovės stiprį iki 25 mA vienam geliui. Pasibaigus

elektroforezei, geliai kelis kartus plaunami dejonizuotu vandeniu ir dažomi pasirinktu būdu.

### **Baltyminių gelių dažymas PageBlue™ dažu**

Atliekant baltymų dažymą PageBlue™ (Thermo Fisher Scientific) dažu, laikomasi gamintojo rekomendacijų.

### **Baltyminių gelių dažymas SYPRO™ Ruby Protein Gel Strain dažu**

Dejonizuotu vandeniu praplautas gelis perkeliamas į naują indelį ir užpilamas 10 gelio tūrių SYPRO™ Ruby dažymo tirpalo. Uždengus indelį folija, gelis švelniai purtomas 150 min, 50 aps/min greičiu. Perkėlus gelį į naują dėžutę, užpilama 100 ml plovimo buferinio tirpalo (10 % metanolio, 7 % acto rūgšties). Gelis purtomas 30 min, 50 aps/min greičiu. Pašalinus plovimo buferinį tirpalą, gelis du kartus plaunamas 100 ml dejonizuoto vandens, purtant po 15 min tomis pačiomis sąlygomis. Gelis vizualizuojamas UV šviesoje arba skanuojamas skaitytuvu FujiFilm FLA-5100, sužadinimui naudojant 473 nm bangos ilgio lazerį.

## **2.2.11 Mielių ląstelių mikroskopija**

### **Ląstelių fiksacija formaldehidu**

Atliekant ląstelių fiksaciją, ląstelės surenkamos iš 500 µl per naktį auginto mėginio. Ląstelės kelis kartus plaunamos 1 x PBS (pH 7,4) buferiniu tirpalu. Resuspendavus ląsteles 450 µL PBS tirpalu, pridedama 50 µl 37 % formaldehido (iki galutinės 3,7 % koncentracijos) ir švelniai sumaišoma (vykdant DNR dažymą, prieš formaldehidą įdedama Hoechst 33342 dažo iki galutinės 5 µg/ml koncentracijos ir išmaišoma). Mėginiai inkubuojami kambario temperatūroje 15 min. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 5 min, 1000 x g, kambario temperatūroje. Pašalinus supernatantą, ląstelės praplaunamos PBS buferiniu tirpalu. Pašalinus supernatantą, ląstelės resuspenduojamos 50 – 100 µl PBS buferiniame tirpale ir saugomos 4 °C temperatūroje iki mikroskopavimo.

## **Objektyvių stikliukų paruošimas**

Ant švaraus objektyvio stikliuko suformuojamas apie 0,5 mm storio agarozės paviršius. 1 % agarozė ruošiama išlydžius reikiamą kiekį agarozės SD terpėje ir pridėjus ląstelių auginimo užtikrinimui reikiamų aminorūgščių.

## **Mėginių mikroskopavimas**

Nedidelis kiekis šviežiai išaugusių ląstelių paimamos nuo lėkštelės ir resuspenduojamos 10 µl SD terpėje. Atliekant tiek fiksuotų, tiek gyvų ląstelių mikroskopiją, 1 µl ląstelių suspensijos užnešamas ant suformuoto agarozės paviršiaus, mėginys uždengiamas dengiamuoju stikleliu ir analizuojamas Olympus AX70 mikroskopu. Naudotas 100 × aliejaus imersijos objektyvas. Vaizdai skaitmeninami nespalvine Hamamatsu CDD kamera „Orca 4742-95“. Tolesnis vaizdų apdorojimas vykdomas ImageJ programa (Schneider *et al.*, 2012). Stebint su mCherry sulietų baltymų lokalizaciją, naudota U-MWG filtras, sulietų su GFP –U-MWIBA filtras.

### **2.2.12 Homologiškų sekų paieška genomuose**

Homologiškų sekų paieška, naudojant baltymo ar geno seką, vykdyta BLAST+ programa (Camacho *et al.*, 2009). Sekų paieška buvo atliekama 1.1.1 skyriuje pateiktuose genomuose, surinktose transkriptomose. Taip pat paieškoms naudotos NCBI „Nepasikartojančių nukleotidų sekų“ (angl. *nucleotide collection (nr/nt)*) ir „Nepasikartojančių baltymų sekų“ duomenų bazės (angl. *non-redundant (nr)*).

### **2.2.13 Daugybinio sekų palyginio sudarymas**

Daugybiniai aminorūgščių ir baltymų sekų palyginiai sudaromi naudojant MUSCLE (Edgar, 2004) programą, paliekant standartinius nustatymus arba MAFFT v7.313 programos versija (Kato ir Standley, 2013) naudojant automatinį parametrų parinkimą.

### **2.2.14 Filogenetinio medžio konstravimas**

Baltymų sekos išlygintos MAFFT programa. Filogenetinis medis konstruotas naudojant IQ-Tree v1.6.3 programos versiją (Nguyen *et al.*, 2015),

automatiškai atliekant visų programos palaikomų aminorūgščių kaitos modelių patikrą. Remiantis Bajeso informaciniu kriterijumi, geriausiai modelį atitinkantys parametrai buvo: LG+R3. Sukonstruoto filogenetinio medžio patikimumo įvertinimas vykdomas atliekant savirankos analizę (angl. *bootstrap analysis*). Sudarytas medis vizualizuojamas FigTree v1.4.3 programos versija (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### **2.2.15 Nežinomų baltymų charakterizavimas**

Transmembraniniai motyvai ir signalinės sekos baltymų sekose identifikuotos naudojantis Phobius internetiniu serveriu (Käll *et al.*, 2007) N-glikozilininimo vietos baltymų sekose identifikuotos naudojantis NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) internetiniu serveriu. Konservatyvių domenų baltyme paieška vykdyta Pfam duomenų bazėje (Finn *et al.*, 2016).

### **2.2.16 De novo transkriptomų surinkimas**

Visi transkriptomo surinkimo veiksmai buvo atliekami atviros prieigos, didelio našumo reikalaujančių skaičiavimų platformose <https://usegalaxy.org/> ir <https://usegalaxy.eu/> (Afgan *et al.*, 2016). Prieš atliekant surinkimą, iš pradinių RNR sekoskaitos duomenų pašalinami sekoskaitos adapteriai, naudojantis Trimmomatic įrankiu (Bolger *et al.*, 2014). *De novo* transkriptomo surinkimas vykdomas naudojantis Trinity įrankiu (Grabherr *et al.*, 2011).

### **2.2.17 Kita naudota programinė įranga**

Baltymo struktūros vizualizuotos naudojant UCSF Chimera vizualizavimo programa (Pettersen *et al.*, 2004). Statistinių skaičiavimų atlikimui ir grafikų braižymui naudotas R v3.5.1 programos versija (<https://www.r-project.org/>). Daugybiniam sekų palyginiui skaičiuojama Šenono entropija, naudojant Bio3D v2.2 R programos paketą (Grant *et al.*, 2006) ir pasirinkus PAM30 baltymų panašumo matricą.

## 2.2.18 Bioinformatinei analizei naudoti duomenys ir duomenų bazės

Lentelė 2.9. Tyrimams naudotos mielių genomų sekos.

Kamieno pavadiniamas	Aprašas	Nuoroda
SK-1	<i>S. cerevisiae</i> kamienas. Izoliuotas JAV iš dirvožemio.	Yue et al., 2017
S288c	<i>S. cerevisiae</i> kamienas. Izoliuotas JAV iš pūvančių figų.	Yue et al., 2017
UWOPS03-461.4	<i>S. cerevisiae</i> kamienas. Izoliuotas Malaizijoje iš palmių nektaro.	Yue et al., 2017
Y12	<i>S. cerevisiae</i> kamienas. Izoliuotas Dramblio kaulo krante. Kamienas naudojamas palmių vyno gamyboje.	Yue et al., 2017
Y55	<i>S. cerevisiae</i> kamienas. Izoliuotas Prancūzijoje iš vynuogių.	Liti et al., 2009
BC187	<i>S. cerevisiae</i> kamienas. Izoliuotas JAV iš fermentavimo statinių.	Liti et al., 2009
CBS5829	<i>S. paradoxus</i> kamienas. Izoliuotas Danijoje iš dirvožemio.	Liti et al., 2009
CBS432	<i>S. paradoxus</i> kamienas. Izoliuotas Rusijoje (Maskvos apskrityje) iš ąžuolo kamieno.	Liti et al., 2009
T21.4	<i>S. paradoxus</i> kamienas. Izoliuotas Didžiojoje Britanijoje iš ąžuolo kamieno.	Liti et al., 2009
Q62.5	<i>S. paradoxus</i> kamienas. Izoliuotas Didžiojoje Britanijoje iš ąžuolo kamieno.	Liti et al., 2009
Q74.4	<i>S. paradoxus</i> kamienas. Izoliuotas Didžiojoje Britanijoje iš ąžuolo kamieno.	Liti et al., 2009
DBVPG4650	<i>S. paradoxus</i> kamienas. Izoliuotas Italijoje iš dirvožemio.	Liti et al., 2009
N-45	<i>S. paradoxus</i> kamienas. Izoliuotas Rusijoje (Rytų Azija) iš ąžuolo kamieno.	Liti et al., 2009
Y8.5	<i>S. paradoxus</i> kamienas. Izoliuotas Didžiojoje Britanijoje iš ąžuolo kamieno.	Liti et al., 2009
N-17	<i>S. paradoxus</i> kamienas. Izoliuotas Rusijoje (Tatarstane) iš ąžuolo sulos.	Liti et al., 2009
ZP591	<i>S. kudriavzevii</i> kamienas. Izoliuotas Portugalijoje iš ąžuolo kamieno.	Scannell et al., 2011
IFO1802	<i>S. kudriavzevii</i> kamienas. Izoliuotas Japonijoje iš pūvančių lapų.	Scannell et al., 2011
IFO1815	<i>S. mikatae</i> kamienas. Izoliuotas Japonijoje iš dirvožemio.	Scannell et al., 2011
H6	<i>S. arboricolus</i> kamienas. Izoliuotas Kinijoje iš ąžuolo kamieno.	Liti et al., 2013



Be Lentelė 2.9 paminėtų genomų, naudotos genomo sekos, publikuotos šiuose straipsniuose: Liti et., 2009; Scannell et al., 2013; Yue et al., 2017; Parker et al., 2018.

Lentelė 2.10. *De novo* transkriptomui surinkimui naudoti pradiniai RNR sekoskaitos duomenys iš SRA duomenų archyvo.

<b>Kamienas</b>	<b>SRA duomenų bazės ID</b>	<b>Identifikuoti virusai</b>
S288C	SRX495158	ScV-LA-1
BY4741	ERR1742857, SRX342373	ScV-LA-1
BY4742	ERR1742859	ScV-LA-1, L-BC
BY4743	SRR1002819	ScV-LA-1, L-BC
FY4	SRX521598	ScV-LA-1, L-BC
W303	SRX682812, SRX2742200	ScV-LA-1, L-BC, M-1 palydovas
YPH499	SRX3605780	ScV-LA-1
Σ1278b	SRR2069955, SRR2069956	ScV-LA-1, L-BC, M-1 palydovas
CEN.PK	SRX1898675	ScV-LA-1, M-1 palydovas
SK1	SRX672216	ScV-LA-1, M-1 palydovas
N17	SRR3481648	M-64b palydovas
YJM453	SRX2153027	M-2 palydovas
YJM1307	SRX2152996	M-1 palydovas
YJM1341	SRX2152987	M-2 palydovas
YJM1273	SRX2152982	M-1 palydovas
YJM1387	SRX2152910	M-1 palydovas

YJM280	SRX342370	ScV-LA-1
YJM1307	SRX342426	M-1 palydovas
DBVPG6044	SRX2486594	ScV-LA-1

### 3 TYRIMŲ REZULTATAI

#### 3.1 DgRNR virusų ir jų palydovų genomų analizė

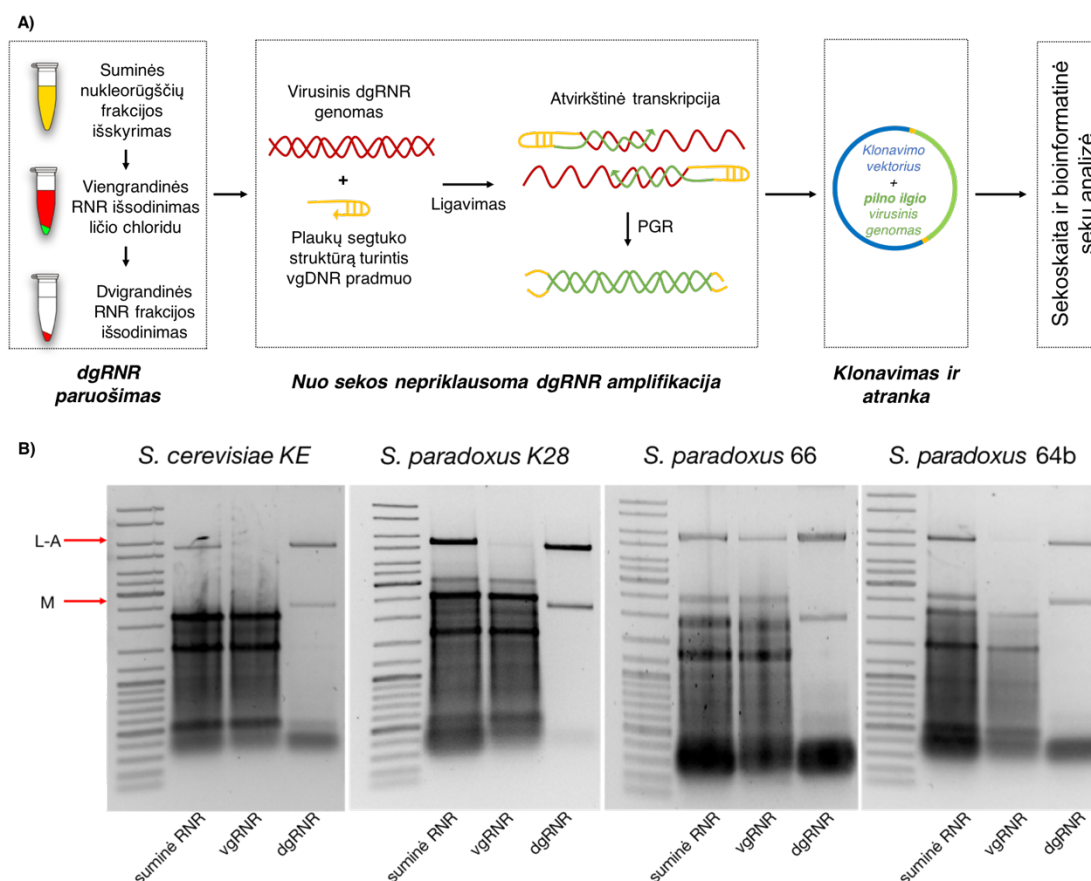
Pirminis šio darbo tikslas buvo identifikuoti ląstelės-šeimininko baltymus, dalyvaujančius *S. cerevisiae* L-A viruso replikacijos ir transkripcijos cikluose. Tyrimams pasirinktas M437 kamienas (Naumova ir Naumova, 1973), turintis dgRNR L-A virusą ir M-2 palydovą, koduojantį K2 kilerinį toksiną. Tačiau klonavus šiame kamiene esantį L-A virusą, paaiškėjo, kad tai ne tikėtasis ScV-LA-1, o į ScV-LA-lus (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013) panašus viruso variantas (ScV-LA-m437), pasižymintis 98% nukleotidų ir 99% aminorūgščių sekų panašumu. Nustačius šiame kamiene esančio M palydovo genomo seką patvirtinta, kad jame esantis atviro skaitymo rėmelis koduoja K2 toksiną. Gauti rezultatai nesutapo su literatūroje publikuotais rezultatais, kuriuose buvo teigiama, kad ScV-LA-lus viruso variantai negali užtikrinti M2 palydovo replikacijos (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013). Nusprendėme identifikuoti L-A virusus prieinamuose laboratoriniuose ir gamtiniuose kamienuose.

Pirmoji dgRNR L-A viruso genomo seka nuskaityta 1989 metais (Icho ir Wickner, 1989) (šiam darbe ši konkreti seka vadinama ScV-LA-1). Ilgus metus tai buvo vienintelė žinoma L-A tipo viruso seka, kol 2013 metais Rosa Esteban vadovaujama grupė atrado naują dgRNR L-A viruso variantą ir nuskaitė jo genomą (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013). Pastaraisiais metais literatūroje publikuoti 11 naujų L-A virusų variantų (Konovalovas *et al.*, 2016; Rowley *et al.*, 2016; Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017), aptiktų įvairiuose *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. kudriavzevii* ir *S. uvarum* kamienuose. Šio darbo 3.1 skyriuje pristatomas dgRNR virusų ir jų palydovų tyrimas, kuris apima tiek literatūroje publikuotų, tiek naujai nuskaitytų L-A viruso variantų genomų analizę.

##### 3.1.1 Naujų dgRNR L-A virusų ir M palydovų variantų identifikavimas

Norėdami identifikuoti naujus dgRNR virusus ir jų palydovus bei nustatyti genomų sekas *Saccharomyces sensu stricto* mielėse, išvystėme virusų sekų

nustatymo algoritmą (3.1 pav. A). Algoritmą sudaro keturi principiniai metodai: dgRNR išskyrimas (2.2.1 ir 2.2.2 skyriai), nuo sekos nepriklausomas dgRNR virusų genomų pavertimas DNR ir padauginimas (2.2.3 skyrius), gautų genomų DNR kopijų klonavimas ir klonų atranka, virusinių genomų DNR kopijos sekoskaita ir gautų geno sekų bioinformatinė analizė. Naudojantis šiuo metodu, buvo analizuojami Gamtos tyrimų centro Genetikos laboratorijos kolekcijoje turimi, kileriniu fenotipu pasižymintys kamieniai (K7, Rom K-100, M437, K28, KE) ir gamtoje identifikuoti, biocidiniu aktyvumu prieš kitas mieles pasižymintys *S. paradoxus* kamieniai (64b, 66) (Dr. E. Servienė, nepublikuota).



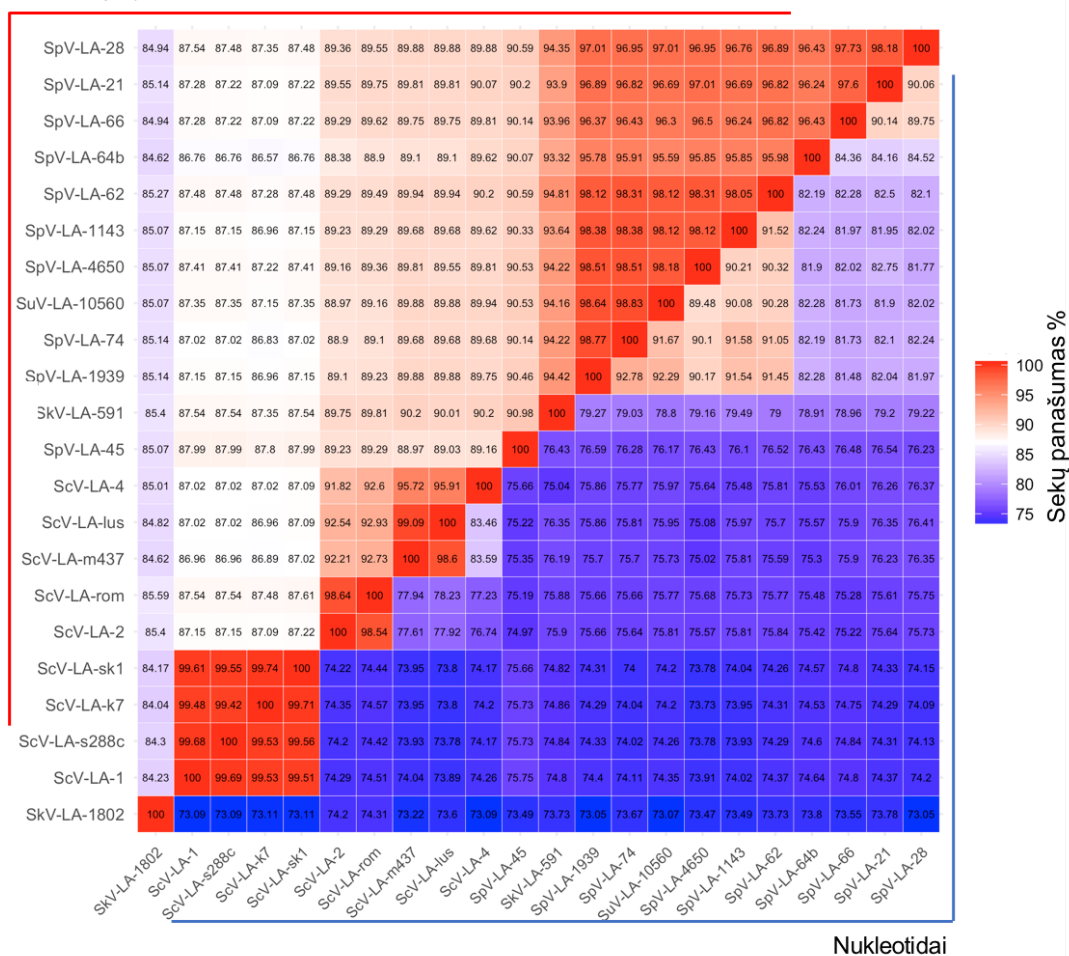
3.1 pav. DgRNR virusų identifikavimas. A) DgRNR L-A virusų ir jų M palydovų geno sekų identifikavimo schema. B) Ličio chloridu frakcionuota suminė RNR iš skirtingų kamienų. Išskirtos trys frakcijos: suminė RNR, viengrandinė RNR (vgRNR) ir dvigrandinė RNR (dgRNR).

Visuose tirtuose kamieniuose aptikti L ir M dgRNR segmentai (3.1 pav. B). Nuskaicius visų L segmentų genomų sekas nustatėme, kad tai skirtingi

*Totiviridae* šeimai priklausančio L-A viruso variantai. Lyginant šių virusų geno sekas ir viruso koduojamų baltymų aminorūgščių sekas su literatūroje minimais L-A viruso variantais, identifikuota, kad dalis jų pasižymi aukštu sekų panašumu. *S. cerevisiae* K7 kamiene aptikto L-A viruso (ScV-LA-k7) geno seka beveik sutampa su ScV-LA-1 viruso geno seka. Rom K-100 kamiene aptikto L-A viruso (ScV-LA-rom) geno seka yra labai panaši į ScV-LA-2 viruso geno seką. Kaip minėta anksčiau, nuskaičius M437 kamiene aptiktą LA viruso geno seką (ScV-LA-m437), nustatėme, kad jo geno seka panaši į ScV-LA-lus viruso geno seką. KE, K28, 64b ir 66 kamienuose rastų L-A virusų (atitinkamai ScV-LA-4, SpV-LA-K28, SpV-LA-64b ir ScV-LA-66) genomų sekų panašumo lygis buvo žymiai mažesnis (3.2 pav.).

Naudodamiesi išvystytu dgRNR virusų sekų nustatymo algoritmu, nustatėme K7, Rom K-100, M437 kamienuose identifikuotų dgRNR M palydovų genomų sekas. K7 kamiene nustatytas M-1 palydovas, koduojantis K-1 toksiną. Tuo tarpu Rom K-100 ir M437 kamienuose pirmą kartą nustatėme pilno ilgio M-2 palydovo geno seką: iki tol buvo nustatyta tik K-2 kilerinį toksiną koduojančio atviro skaitymo rėmelio seka (Dignard *et al.*, 1991; Meškauskas ir Čitavičius, 1992). Ramirez su kolegomis 2017 metais taip pat pavyko nuskaityti pilno ilgio M-2 palydovo geno seką (Ramírez *et al.*, 2017), kuri sutampa su mūsų identifikuotomis sekomis. KE kamiene nuskaityta M palydovo K-lus kilerinį toksiną koduojančios geno dalies seka, o K28 kamiene – K28 kilerinį toksiną koduojanti seka. Taip pat nustatėme M palydovų genomų sekas *S. paradoxus* 64b ir 66 kamienuose (atitinkamai SpV-M64 ir SpV-M66). Nustatėme, kad SpV-M64 geno seka yra unikali, neturinti panašumų į jokių žinomus M palydovus. Tuo tarpu SpV-M66 seka turi panašumo (3.1.5 skyrius) su 2017 metų pabaigoje Rosa Esteban grupės publikuota M-21 palydovo geno seka (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017).

## Aminorūgštys



3.2 pav. Žinomų dgRNR L-A virusų panašumai. Aptatiniame grafiko trikampyje vaizduojami nukleotidų sekų panašumai tarp skirtingų L-A virusų genomų koduojančių sekų. Viršutiniame grafiko trikampyje vaizduojami L-A viruso genomo koduojamų baltymų skirtumai tarp skirtingų L-A virusų genomų.

Analizuodami prieinamus laboratorinius *S. cerevisiae* kamienus (BY4741,  $\alpha'1$ , 21PMR), visuose juose identifikavome L-A viruso variantus, genomo sekomis labai artimus ScV-LA-1 virusui. Nusprendėme įvertinti L-A viruso paplitimą dažniausiai naudojamuose *S. cerevisiae* kamienuose, kurie minimi Louis apžvalgoje (Louis, 2016). Analizuodami M437 kamieno informacinės RNR sekoskaitos (RNA-Seq) duomenis (Lukša *et al.*, 2017) ir iš jų *de novo* atkurdami ląstelės transkriptomą, jame identifikavome pilno ilgio L-A viruso ir M palydovo genomų sekas. Todėl nusprendėme analizuoti viešai prieinamus *S. cerevisiae* laboratorinių kamienų RNR sekoskaitos duomenis iš NCBI SRA

(angl. *Sequence Read Archive*) duomenų bazės, nes pradiniai naujos kartos sekoskaitos technologijų duomenys yra saugomi šioje duomenų bazėje.

Siekdami nustatyti, kaip L-A virusas paplitęs tarp *S. cerevisiae* laboratorinių kamienų, NCBI SRA duomenų bazėje ieškojome šių kamienų RNR sekoskaitos pradinių duomenų. Keturiolikoje kamienų buvo rastas bent vienas duomenų rinkinys – pusėje tarp Louis išskirtų 28 dažniausiai naudojamų laboratoriniuose tyrimuose *S. cerevisiae* mielių kamienų (Louis, 2016). Verta paminėti, kad ne visų kamienų RNR sekoskaitos duomenų rinkiniai buvo rasti SRA duomenų bazėje. Kiekvienam RNR sekoskaitos duomenų rinkiniui *de novo* rekonstruotas transkriptomas ir jame vykdoma į L-A virusą panašių sekų paieška. Vienuolikoje kamienų: S288C, BY4741, BY4742, BY4743, FY4, W303, YPH499, YPH500, Σ1278b, CEN.PK, SK1 aptiktos ScV-LA-1 viruso genomo sekos. Tyrimo metu gauti duomenis leidžia įtarti, kad didelė dalis laboratorijose naudojamų mielių yra infekuotos dgRNR viruso ScV-LA-1 variantu.

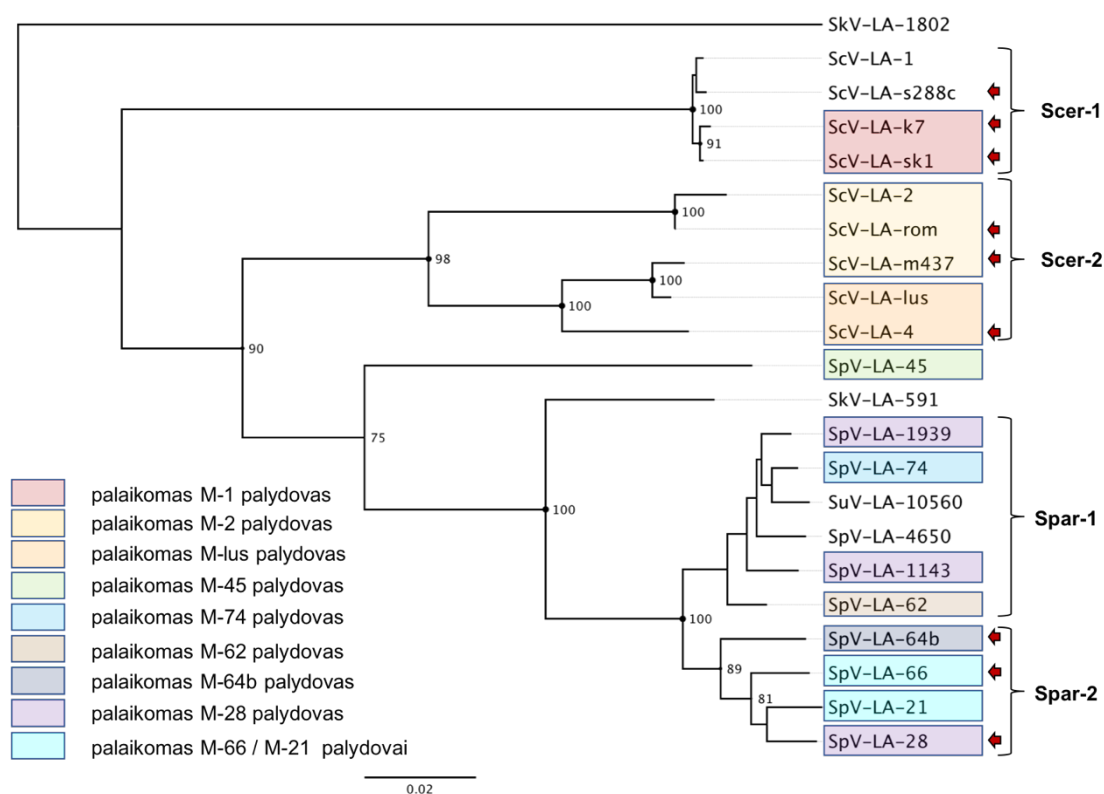
### 3.1.2 Filogenetinė L-A virusų sekų analizė

Filogenetinio medžio konstravimui naudojome visas analizės dienai prieinamas L-A viruso sekas: publikuotas literatūroje (Konovalovas *et al.*, 2016; Rowley *et al.*, 2016; Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017) ir šiame darbe identifikuotas (3.1.1 skyrius).

Filogenetinis medis konstruojamas naudojant virusų koduojamų Gag ir Gag-Pol baltymų sekas. Sekos, 100 % sutapusios aminorūgščių lygmenyje (pvz.: S288c kamienui giminingų BY4741, BY4742, BY4743 L-A viruso sekos aminorūgščių lygmenyje sutapo, analizei palikta tik S288c kamiene rasto viruso seka), arba esančias nepilno ilgio, iš analizės buvo pašalintos.

Atlikę filogenetinio medžio analizę nustatėme, kad virusų sekos formuoja dvi filogenetines grupes, išsiskiriančias pagal priklausomumą *S. cerevisiae* arba *S. paradoxus* mielių rūšiai. Abejose šiose grupėse stebimas aukšta tikimybine verte paremtas grupavimasis į smulkesnes filogenetines grupes (3.3 pav.). *S. cerevisiae* rūšies virusai formuoja dvi atskiras grupes: M-1 palydovo

replikaciją užtikrinančių Scer-1 grupę ir M-2/M-lus palydovų replikaciją užtikrinančių Scer-2 grupę.



3.3 pav. *Saccharomyces sensu stricto* mielėse aptinkamų dgRNR L-A virusų variantų filogenetinis medis. Raudonomis rodyklėmis pažymėtos L-A viruso genomo sekos nuskaitytos šio darbo metu, be šių sekų filogenetinėje analizėje naudotos sekos publikuotos šiuose straipsniuose Icho ir Wickner, 1989; Rowley *et al.*, 2016; Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017. Skirtingomis spalvomis pažymėtas L-A viruso gebėjimas užtikrinti savauto M palydovo replikaciją. <sup>1</sup>SpV-LA-1939 ir SpV-LA-1143 kamienuose nėra identifiukuota M28 palydovo seka, tačiau šie kamienai pasižymi kil-K28 kileriniu fenotipu, būdingu K28 kamienai (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017).

<sup>2</sup>SpV-LA-21 ir SpV-LA-66 virusus turinčiuose kamienuose nustatyti M palydovai koduoja 92 % sekų panašumu ir kileriniu aktyvumu pasižymintį baltymą.

Istoriškai K28 kamienas buvo priskirtas *S. cerevisiae* rūšiai (Pfeiffer ir Radler, 1984). Šiame kamiene buvo aptiktas L-A tipo virusas ir nustatyta jo genomo seka (Konovalovas *et al.*, 2016). Nuskaičius L-A virusų genomų sekas iš *S. paradoxus* 64b ir 66 kamienų ir atlikus jų filogenetinę analizę, nustatyta, kad jie kartu su L-A-28 formuoja atskirą filogenetinę grupę, kuri patikimai atsiskiria nuo *S. cerevisiae* rūšies mielėse aptinkamų L-A tipo virusų grupės. Iškelta hipotezė, kad K28 kamienas yra klaidingai priskirtas *S. cerevisiae*

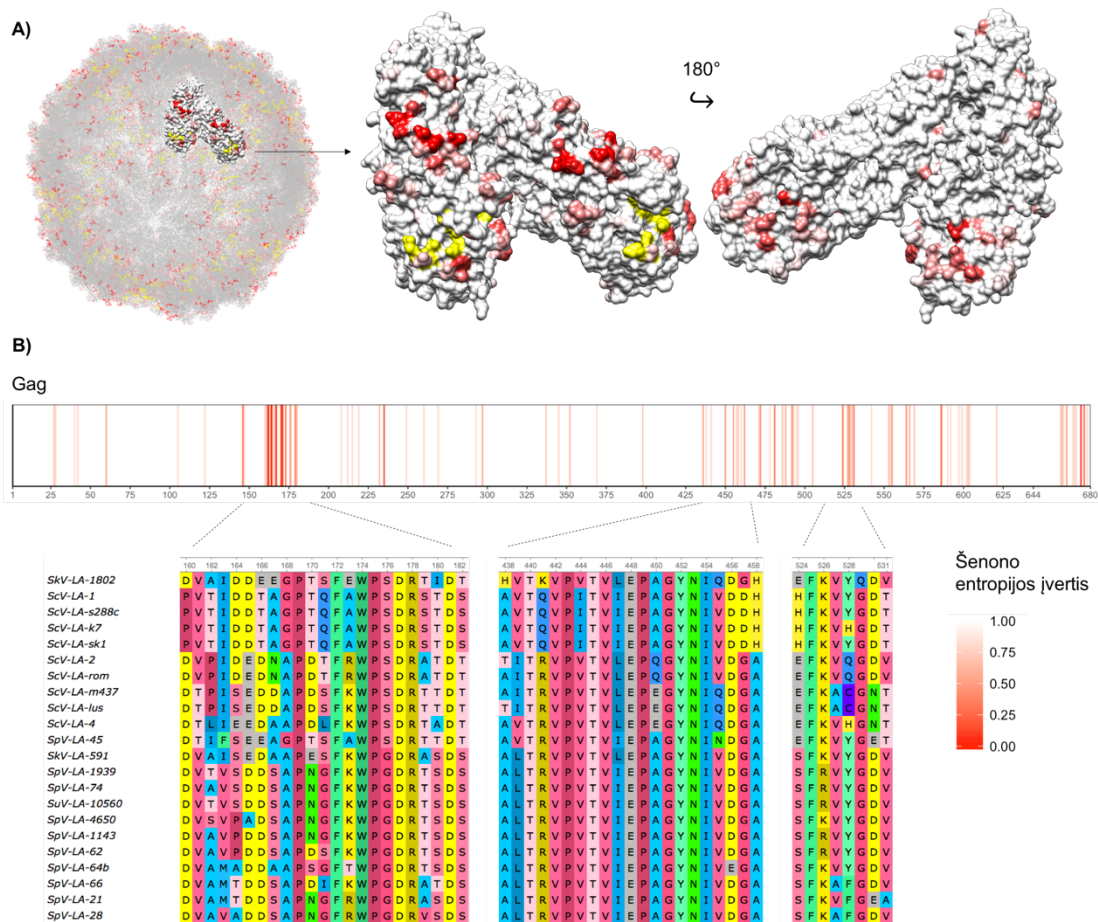


rūšiai, o iš tiesų yra *S. paradoxus* mielių rūšies. Atlikus K28 kamieno ribosominės DNR konservatyvių regionų (ITS1, 5.8S, ITS4) regiono restrikcijos fragmentų polimorfizmo analizę bei atlikus šio regiono sekoskaitą, K28 kamienas buvo priskirtas *S. paradoxus* rūšiai (Dr. E. Servienė, nepublikuota). Rosa Esteban tyrimų grupė, 2017 metų pabaigoje atlikusi analogišką tyrimą, K28 kamieną irgi priskyrė *S. paradoxus* rūšiai (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017). Tarp *S. paradoxus* virusų taip pat stebimas patikimas grupavimasis į dvi grupes: Spar-1 ir Spar-2, tačiau nestebimas grupavimasis, paremtas konkrečiau M palydovo replikacijos palaikymu, kaip *S. cerevisiae* rūšies virusų atveju.

### **3.1.3 L-A tipo virusų Gag baltymo struktūros ir jį koduojančių sekų variabilumo ryšys**

*Saccharomyces sensu stricto* mielėse aptinkami L-A virusai yra labai konservatyvūs savo sekomis. Labiausiai nutolę viruso variantai pasižymi apie 70 % nukleorūgščių sekų sutapimu, tuo tarpu analizuojant L-A virusų koduojamų baltymų aminorūgščių sekas, stebimas 85 % ir aukštesnis sekų identiškumo lygis (3.2 pav.). Analizuodami palyginius nustatėme, kad tam tikros L-A viruso genomo vietos yra ypatingai variabilios: jose stebimi drastiški aminorūgščių pokyčiai, kuomet viena aminorūgštis keičiama kita, turinčia visai kitas fizikochemines savybes (3.4 pav. B pav.). Nustatėme, kad išorinėje kapsidės paviršiuje išsidėsčiusios mažiausiai konservatyvumu pasižymintys aminorūgštys, tuo tarpu vidinis kapsidės paviršius sudarytas iš konservatyvių aminorūgščių (3.4 pav. A).

Gag baltyme nustatėme regionus, kuriose tarp L-A virusų stebimas aukštas aminorūgščių variabilumas. Pirmasis regionas, apimantis 160–184 a.r., nepasižymi konkrečios antrinės struktūros elementais ir yra išsidėstęs kapsidės paviršiuje. Stebimi sekų skirtumai pasiskirstę pagal L-A viruso filogenetines grupes (3.4 pav. B). Tokios sandaros domenai dažnai aptinkami baltymas-baltymas sąveikos paviršiuose. Antrasis variabilus regionas – 524–531 a.r. kilpa ties kepurės nuskėlimo (angl. *cap-snatching*) vieta. Scer-1 grupei



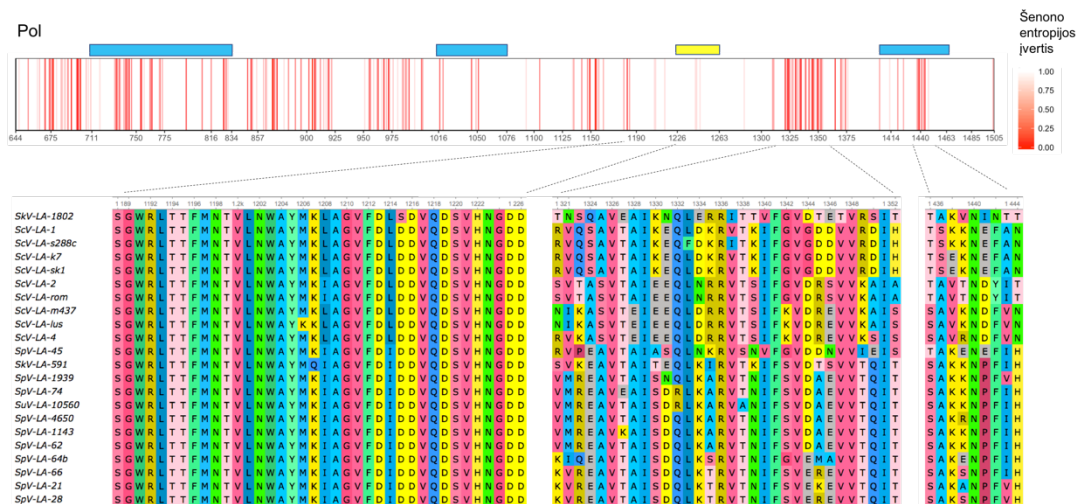
3.4 pav. L-A tipo virusų Gag baltymo struktūros ir jį koduojančių sekų variabilumo ryšis. A) Gag baltymo struktūra (pdb archyvas: 1M1C): virusinė dalelė; kapsidės asimetrinio dimero išorinė ir vidinė kapsidės pusės. Geltonai pažymėtos kepurės nuskėlime dalyvaujančios amino rūgštys, baltos-raudonos spalvos gradientas žymi Šenono entropijos įvertį, kuris apskaičiuojamas naudojant daugybinį Gag baltymo sekų išlyginimą (Šenono įvertis, lygus 1, žymi pozicijos konservatyvumą (balta spalva), tuo tarpu reikšmė artėjantis prie nulio – variabilumo didėjimas (raudona spalva)); B) Gag baltymo sekos konservatyvių-variabilių pozicijų grafikas ir variabilių regionų daugybiniai palyginiai.

priskirtų virusų seka 438–458 a.r. išskiria juos iš visų kitų L-A virusų (3.4 pav. B), kurių sekos šiame regione pasižymi aukštu konservatyvumo laipsniu. Šis regionas išsidėstęs kapsidės paviršiuje ties kepurės nuskėlimo vieta. Stebimas aminorūgščių variabilumas ties kepurės skėlimo aktyviuoju centru gana netikėtas. Kepurės nuskėlime dalyvaujančios aminorūgštys (Tang *et al.*, 2005) tarp visų žinomų L-A viruso variantų yra konservatyvios. Galima įtarti, kad kepurės nuskėlimo procese gali dalyvauti ląstelės-šeimininko baltymai, kurie sąveikauja su šiuo variabilium regionu, arba šie variabilūs regionai užtikrina tam tikrą RNR atpažinimą.

Vidinėje kapsidės dalyje, ties antro laipsnio simetrijos ašimi (481–508 a.r.) stebimas sekų variabilumas. Šioje baltymo dalyje aminorūgščių sudėtis pasiskirsčiusi pagal filogenetines grupes.

### **3.1.4 L-A tipo virusų GagPol baltymo Pol domeno sekų variabilumo ir funkcijų ryšys**

L-A tipo virusų koduojamo sulietinio Gag-Pol baltymo Pol domene stebimas aukštesnio lygio sekų variabilumas, lyginant su viruso koduojamu Gag baltymu. Analizuodami daugybinius Gag ir Pol domenų sekų palyginius nustatėme, kad 14 % aminorūgščių padėčių Gag baltyme yra bent vienas pakitimas, tuo tarpu Pol domene tokiu padėčių yra 30 %, o nekonservatyvūs aminorūgščių pakitimai Pol domene bent du kartus dažnesni. Pol domene yra identifikuoti trys viengrandinę RNR surišantys motyvai: N-galinis RNR surišantis domenas 711–834 a.r., centrinis RNR surišantis domenas 1016–1076 a.r., ir C-galinis domenas 1414–1463 a.r. (Ribas *et al.*, 1994a; Ribas *et al.*, 1994b). Motyvas 711–834 a.r. pasižymi aukštu konservatyvumu, jis yra C-galinis RNR surišantis domenas, atsakingas *in vivo* už L-A viruso ir M palydovo koduojančios grandinės pakavimą į kapsidę (Ribas *et al.*, 1994b). Šiame domene yra du motyvai: 670–677 a.r. ir 693–701 a.r. pasižymintys aukštu variabilumo lygiu, o variabilios aminorūgšys pasiskirsčiusios pagal viruso filogenetines grupes. Pol domeno C-gale išsidėstęs viengrandinės RNR pakavimo domenas; manoma, kad jis atlieka pagalbinę funkciją, vykstant koduojančios grandinės pakavimui ir dalyvauja viruso replikacijos ciklo iniciacijoje (Ribas *et al.*, 1994b). Pastarajame domene 1436–1444 a.r. pozicijose stebimas sekų variabilumas, pasiskirstęs pagal filogenetines grupes. Centrinis surišantis RNR domenas pasižymi aukštu konservatyvumo laipsniu, priešingai nei C- ir N-galiniai RNR surišantys domenai. Visų L-A virusų RNR polimerazės katalitinio domeno sekos yra konservatyvios (3.5 pav.).



3.5 pav. L-A viruso koduojamo sulietinio Gag-Pol baltymo Pol domeno sekų konservatyvių-variabilių pozicijų grafikas ir variabilių regionų daugybiniai palyginiai. Mėlyni stačiakampiai virš grafiko žymi viengrandinės RNR surišimo domenus, o geltonas stačiakampis – nuo RNR priklausomos RNR polimerazės katalitinį domeną.

Dar bent du regionai, kuriuose stebimas aukštas sekų variabilumas, nustatyti sulietinio Gag–Pol baltymo Pol domene. Tarp RNR polimerazės katalitinio centro ir C-galinio RNR surišančio domeno įsiterpęs 1321–1352 a.r. regionas aukštu variabilumo lygiu išsiskiria tarp kitų variabilių regionų (3.5 pav.). Šio regiono funkcija kol kas nėra žinoma. Kitas regionas, kuriame stebimas aukštas variabilumo lygis, yra išsidėstęs tarp N-galinio ir centrinio RNR surišančių domenų.

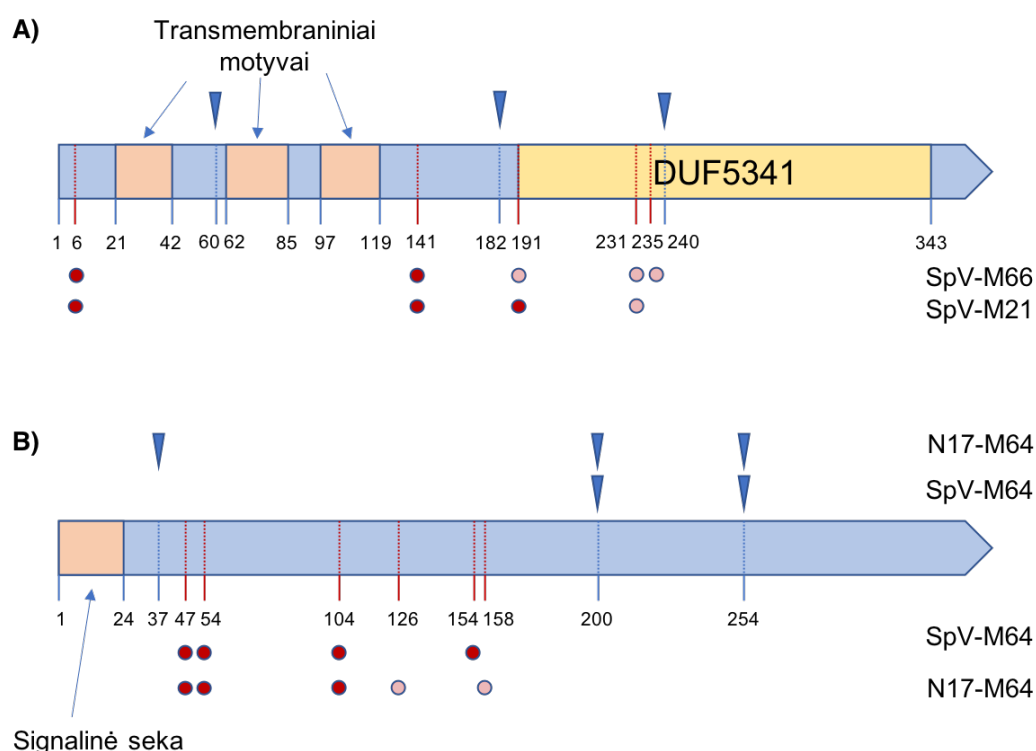
### 3.1.5 Naujų L-A viruso M palydovų sekų analizė

Anksčiau GTC Genetikos laboratorijoje aptiktuose biocidiniuose *S. paradoxus* kamienuose, taikant dgRNR genomo sekų nustatymo metodą (2.2.3 skyrius), nuskaityti dviejų naujų M palydovų – SpV-M66 ir SpV-M64 genomai. Jų genomo architektūra sutampa su kitų *Saccharomyces sensu stricto* mielių dgRNR L-A virusų M palydovams būdinga genomo organizacija. SpV-M66 palydovas sudarytas iš 4 nt ilgio 5'-galinio netransliuojamo regiono, 1038 nt ilgio atviro skaitymo rėmelio, apie 100 nt ilgio adeninu turtingos sekos ir 322 nt ilgio 3'-galinio netransliuojamo regiono. SpV-M66 genomo seka 86 % sutampa su dgRNR viruso SpV-LA-21 viruso SpV-M21 palydovo (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2017) genomo seka, šių palydovų koduojamų

baltymų panašumas yra 92 %. Klonavę šio M palydovo genomą į mielių raiškos vektorių ir transformavę juo *S. cerevisiae* BY4741 mielių kamieną, patvirtinome, jog M palydovo genomo koduojamas baltymas suteikia mielėms kilerinį aktyvumą (neparodyta). Analizuodami seką, baltymo N-gale nustatėme tris transmembraninius motyvus (3.6 pav. A). Atliekant SpV-M66 palydovo koduojamo baltymo konservatyvių domenų paiešką Pfam baltymų šeimų duomenų bazėje, identifikuotas DUF5341 konservatyvus domenas baltymo 190–343 a.r padėtyse. DUF5341 domeną turinčių baltymų funkcija ląstelėje nėra žinoma, šį domeną turintys baltymai aptinkami išskirtinai *Ascomycota* grybų skyriui priskiriamose rūšyse. Atlikus SpV-M66 palydovo koduojamo 346 a.r. baltymo homologų paiešką, nustatyti baltymo homologai skirtingose *Saccharomycetaceae* mielių šeimai priklausančiose rūšyse, tarp jų *Saccharomyces sensu stricto* grupei priklausančių *S. cerevisiae* ir *S. eubayanus* rūšyse. Homologija stebima tik DUF5341 Pfam šeimos domene.

SpV-M64 palydovo genomą sudaro 16 nt ilgio 5'-galinis netransliuojamas regionas, 912 nt ilgio atviro skaitymo rėmelis, 170 nt ilgio adeninu turtinga seka ir 988 nt 3'-galinis netransliuojamas regionas. SpV-M64 palydovo genomui homologinių sekų nebuvo rasta. Atlikę homologų M64 genome koduojamam baltymui paiešką, *Schizosaccharomyces* genčiai priklausančių mielių rūšių genomuose ir *Saccharomycetaceae* šeimai priskiriamų mielių rūšių genomuose identifikavome nežinomos funkcijos baltymus koduojančias sekas. *S. paradoxus* rūšies mielių N-17 kamieno transkriptome (transkriptomas rekonstruotas iš SRA duomenų bazėje rastų RNR sekoskaitos duomenų rinkinių) identifikavome du nuorašus. Vienas iš jų sutampa su M64 genomo dalimi iki polyA sekos, kitas sutampa su genomo dalimi, esančia už polyA sekos. Identifikuotų nuorašų (toliau N17-M64) sutapimas su SpV-M64 palydovo genomo seka yra 83 %, o koduojamo baltymo panašumas sudaro 89 %. Norint įsitikint, kad rastos sekos šaltinis nėra šeimininko genomo seka, atlikta N17-M64 sekos paieška *S. paradoxus* N-17 genomo sekoje. N17-M64 seka nebuvo aptikta. Įvertinę, kad SpV-M64 palydovo genomo pradžia ir

pabaiga sutampa su nustatyto N17-M64 sekos pradžia ir pabaiga, manome, kad tai yra nežinomo L-A viruso varianto dgRNR palydovas.



3.6 pav. SpV-M66 ir SpV-M64 palydovų koduojamų baltymų ypatybės. A) SpV-M66 palydovo koduojamo baltymo schema, pažymėti transmembraniniai motyvai ir konservatyvus DUF5341 domenai; B) SpV-M64 palydovo koduojamo baltymo schema, pažymėta: N-gale esanti signalinė seka, trikampaiais pažymėti Kex2 proteazės taikiniai SpV-M64 ir N17-M64 palydovų koduojamuose baltymuose, apskritimais pažymėtos galimos N-glikozilinimo vietos (raudonu apskritimu pažymėtos labai aukšto spėjimo patikimumo glikozilinimo vietos, rausvu – žemesnio patikimumo glikozilinimo vietos).

SpV-M64 palydovo koduojamame baltyme nustatyta hidrofobinė signalinė sritis, išsidėsčiusi baltymo N-gale (1–24 aminorūgštys). Nustatytos keturios galimos glikozilinimo sritys: 47, 54, 104 ir 154 baltymo pozicijose. Nustatytos ir dvi galimos Kex2 proteazės hidrolizės vietos: 200 padėtyje (atpažįstama seka Lys<sup>199</sup>Arg<sup>200</sup>) ir 254 padėtyje (Pro<sup>253</sup>Arg<sup>254</sup>). N17-M64 nuorašo koduojamame baltyme be išvardintų pozicijų identifikuota papildoma Kex2 proteazės hidrolizės vieta, esanti 37 padėtyje (Arg<sup>36</sup>Arg<sup>37</sup>) (3.6 pav. B). SpV-M64 genome koduojamo baltymo 37 pozicijoje yra įvykęs aminorūgšties pokytis Arg → Gln, kuris lemiamas genome įvykusios mutacijos CGG →

CAG. Tai gali būti priežastis, kodėl *S. paradoxus* M64 palydovo koduojamas baltymas nepasižymi kileriniu fenotipu: klonavus į mielių baltymų raiškos plazmidę ir ja transformavus *S. cerevisiae* mieles, kilerinis fenotipas nestebimas (rezultatai neparodyti). Kex2 proteazė yra būtina M-1, M-2 ir M-28 palydovų koduojamų kilerinių toksinų brendimui (Schmitt ir Breinig, 2006). SpV-M64 palydovui praradus Kex2 proteazės atpažinimo/hidrolizės vietą, galimai todėl nestebimas M palydovo koduojamo baltymo kilerinis aktyvumas. Vis tik įmanoma, kad M64 palydovo koduojamas baltymas nėra biocidiniu aktyvumu pasižymintis baltymas ir dalyvauja nežinomuose ląstelės procesuose.

Tarp *S. paradoxus* aptinkamų homologiškų M palydovų stebimas didesnis sekų kintamumas, negu *S. cerevisiae* rūšies mielėse aptinkamų M palydovų. Kaip minėta, tarp SpV-M66 ir SpV-M21 palydovų stebimas 86 % genomo (nukleorūgščių) ir 92 % koduojamo baltymo (aminorūgščių) sekų panašumai, o SpV-M64 ir N17-M64 83 % genomo ir 89 % koduojamo baltymo sekų panašumas. Tuo tarpu tarp *S. cerevisiae* M-1 tipo palydovų labiausiai besiskiriančios sekos pasižymi 98,73 % baltymą koduojančių sekų panašumu, o tarp M2 tipo palydovų – 97,5 % baltymą koduojančių sekų panašumu. *S. paradoxus* rūšies mielėse aptinkamų baltymų M palydovų variabilumas gali būti rūšies prisitaikymo prie besikeičiančių aplinkos sąlygų veiksnys.

### **3.1.6 L-A viruso M palydovas ir endogeniniai virusiniai elementai mielėse**

Frank ir Wolfe nuskaitė *Vanderwaltozyma polyspora* mielių genomo seką ir jame identifikavo 10 kb regioną, kuriame aptiko penkis pseudogenus, homologiškus mielių kileriniams toksinams ir virusinės kilmės baltymams (Frank ir Wolfe, 2009). Literatūroje minimas ir Mlus palydovo koduojamo Klus toksino homologas, paglitęs tarp *S. cerevisiae* rūšies mielių (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2011). Charakterizuodami naujus M palydovus ir jų koduojamus baltymus, skirtingose mielių rūšių genomuose identifikavome jų homologus. Todėl buvo atlikta visų žinomų M palydovų koduojamų baltymų iš

*Saccharomyces sensu stricto* mielių homologų paieška skirtingų rūšių mielių genomuose.

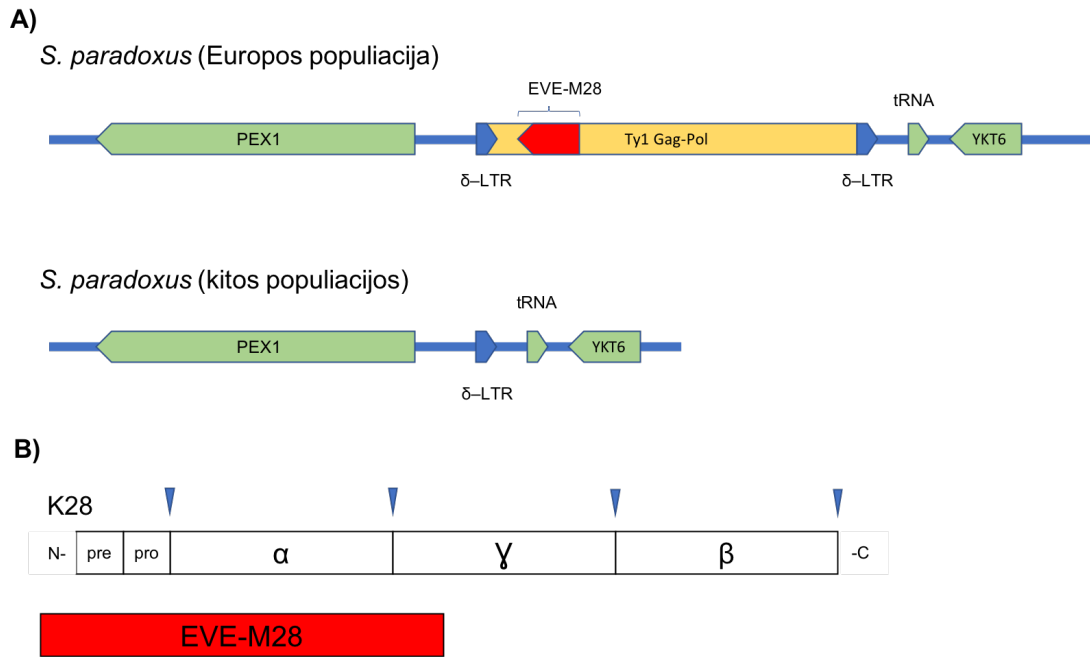
Atlikę analizę, skirtingose mielių rūšyse aptikome homologus visiems žinomiems *Saccharomyces sensu stricto* mielių M palydovų koduojamiems toksinams. *S. cerevisiae* M1 ir M2 bei *S. paradoxus* M45 ir M74 palydovų koduojami baltymų homologai aptinkami įvairiose mielių rūšyse, išskyrus *Saccharomyces sensu stricto* mieles. Tuo tarpu *S. cerevisiae* M1us palydovo ir *S. paradoxus* M64, M66, M62 palydovų koduojamų baltymų homologai identifikuoti ir *Saccharomyces sensu stricto* mielėse. Reikšmingas sekų panašumas baltymų lygmenyje leidžia daryti prielaidą dėl bendros šių baltymų kilmės. Visgi koduojančių sekų panašumas nukleotidų lygmenyje išvardintuose variantuose yra nestebimas.

*S. paradoxus* M28 palydovo koduojamo kilerinio toksino (K28) homologus aptikome tikrai *S. paradoxus* rūšies mielių Europos populiacijoje. Stebimas ~88% sekų panašumas tiek nukleotidų, tiek aminorūgščių lygmenyje. Ypatingai aukštas sekų panašumas bei jų aptikimas tikrai Europos populiacijoje leidžia daryti prielaidą, kad M28 palydovo integracija į chromosomą evoliuciniu požiūriu įvyko neseniai. Norėdami nustatyti galimą integracijos mechanizmą, atlikome genetinės aplinkos analizę tarp skirtingų žinomų *Saccharomyces sensu stricto* mielių genomų.

Nustatėme, kad M28 palydovui homologiška seka (EVE-M28) aptinkama visuose Europos populiacijos *S. paradoxus* kamienuose, kurių genomų sekos yra nustatytos. Ji išsidėsčiusi tarp PEX1 ir YKT6 baltymus koduojančių genų; tarp šių genų nustatyta ir Ty1 transpozono integracijos vieta, tuo tarpu visose kitose *Saccharomyces sensu stricto* mielėse, kurių genomų sekos (1.1.1 skyrius) buvo analizuotos, šis regionas pasižymi sekų konservatyvumu ir Ty1 transpozono integracija nestebima (3.7 pav. A). Įvairiuose organizmuose identifikuojamų EVE elementų atsiradimas chromosomoje dažniausiai siejamas su atvirkštine transkripcija ir integracija į genomą, kurią vykdo transpozonai (Feschotte, 2008; Bruenn *et al.*, 2015; Geuking *et al.*, 2009).



EVE-M28 atveju mes stebime būtent tokio tipo integraciją. Nagrinėdami Ty1 transpozono seką nustatėme, kad joje yra susikaupę daug rėmelio poslinkio bei non-sense tipo mutacijų. Stebimas aukštas EVE-M28 sekų panašumas su M28 palydovu leidžia įtarti, kad EVE elemento koduojamas baltymas gali būti svarbus ląstelės vykstantiems procesams ir dėl šios priežasties koduojanti seka lieka konservatyvi.



3.7 pav. M28 palydovo analogai – endogeniniai virusiniai elementai. A) *S. paradoxus* Europos populiacijos ir kitų populiacijų XI chromosomos regiono tarp PEX1 ir YKT6 baltymus koduojančių genų palyginimas; B) M28 palydovo koduojamo K28 toksino palyginimas su EVE-M28 koduojamu baltymu. Mėlynais trikampiais pavaizduotos KEX2 proteazės kirpimo vietos.

Atlikę EVE-M28 koduojamo baltymo ir K28 kilerinio toksino sekų palyginimą nustatėme, kad EVE-M28 koduojamas baltymas sutampa su K28 toksino 34–152 padėtyse esančiomis aminorūgštimis – kilerinio toksino  $\alpha$  subvienetu (3.7 pav. B). K28 toksino  $\alpha$  subvienetas yra atsakingas už K28 toksino biocidinį aktyvumą, tuo tarpu  $\beta$  subvienetas – už pateikimą į ląstelę (Schmitt ir Breinig, 2006). Pademonstruota, kad vykdant rekombinantinio  $\alpha$  subvieneto baltymo biosintezę, mielės tampa žymiai atsparesnės K28 toksinui (Breinig *et al.*, 2006). Surinkę *S. paradoxus* N17 kamieno (priklausanti Europos populiacijai (Liti *et al.*, 2009)) transkriptomą, jame identifikuojame

EVE-M28 nuorašą, kas leidžia daryti pagrįstą prielaidą apie vykstančią šio endogeninio virusinio elemento raišką ląstelėje.

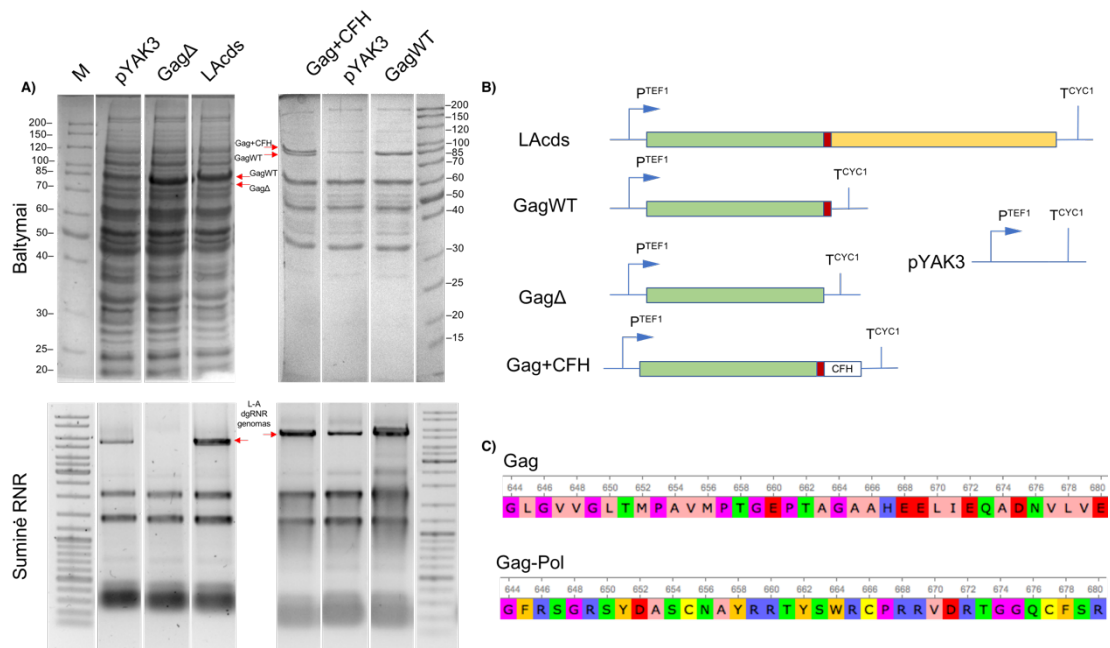
### **3.2 ScV-LA-1 viruso sąveikos su ląstelės-šeimininko baltymais tyrimas**

BY4741 kamienas yra vienas pagrindinių mielių kamienų, naudojamų laboratoriniuose tyrimuose. Šio kamieno pagrindu yra sukurta daug įvairių įrankių, skirtų genetikos, proteomikos, ląstelės biologijos didelės apimties tyrimams atlikti. Tarp šių įrankių verta paminėti mielių iškritų kolekciją (angl. *YKO – Yeast Knock-Out Collection*), kurią sudaro ~5000 kamienų, turinčių pavienę atviro skaitymo rėmelio iškritą (Winzeler *et al.*, 1999), padidintos raiškos kamienų kolekcijas (Mnaimneh *et al.*, 2004) ir ląstelinės lokalizacijos kolekciją (Huh *et al.*, 2003). BY4741 kamienne, kaip ir didelėje dalyje kitų laboratorinių kamienų (3.1.1 skyrius), identifikuotas ScV-LA-1 tipo dgRNR virusas. Šio viruso buvimas ląstelėje įprastai yra ignoruojamas, nors pastaraisiais metais mokslinėje literatūroje publikuoti duomenys demonstruoja, kad L-A tipo virusai moduliuoja ląstelės genų raišką (McBride *et al.*, 2013; Lukša *et al.*, 2017).

Yra žinomi tik keli su L-A virusu galimai sąveikaujantys baltymai, lemiantys L-A dgRNR genomo replikaciją ir baltymą koduojančių atviro skaitymo rėmelių transkripciją (Chong *et al.*, 2004; Rowley *et al.*, 2016). Norėdami išplėsti žinias apie L-A viruso koduojamų baltymų sąveiką su ląstelės-šeimininko baltymais, atlikta virusinių dalelių proteominė analizė ir identifikuoti su L-A virusu sąveikaujantys baltymai. Šiame skyriuje pristatomi šio tyrimo rezultatai, pradedant nuo ScV-LA-1 viruso baltymus koduojančių genų raiškos vektorių konstravimo ir raiškos tyrimo, baigiant virusinių dalelių proteomų charakterizavimu ir tolimesnės šeimininko baltymų, dalyvaujančių viruso replikacijoje, analizės.

### 3.2.1 ScV-LA-1 viruso koduojamų baltymų raiškos tyrimas

Norėdami nustatyti rekombinantinių ScV-LA-1 tipo viruso koduojamų baltymų poveikį natyviai BY4741 kamienne esančiam L-A virusui, sukonstravome keturias plazmides, koduojančias skirtingus L-A viruso genomo koduojamų baltymų (Gag ir Gag-Pol) domenų. pYAK3-LAcDs plazmidėje už TEF1 konstitutyvaus promotoriaus ( $P^{TEF1}$ ) įterpta pilno ilgio L-A viruso koduojanti seka. Transformavus šia plazmide BY4741 kamieną, stebimas aukštas Gag baltymo biosintezės lygis, taip pat yra matomas ir Gag-Pol baltymo sintezės lygio padidėjimas, lyginant su kamieniu, transformuotu tuščiu raiškos vektoriumi – pYAK3 (3.8 pav.). Analizuodami suminę RNR nustatėme, kad rekombinantinių Gag ir Gag-Pol (baltymas sintetinamas vykstant ribosominio rėmelio poslinkiui) baltymų ląstelėje kiekio padidėjimas skatina natyvaus L-A viruso genomo replikaciją. DgRNR virusinio genomo replikacijos skatinimas taip pat buvo stebimas, transformavus BY4741 kamieną pYAK3-GagWT plazmide, koduojančia ScV-LA-1 viruso tipo Gag baltymą (1–680 a.r.). Duomenys, gauti atlikus šiuos eksperimentus, leidžia daryti prielaidą, kad virusinio dgRNR genomo akumuliacijai ląstelėje pakanka padidėjusio rekombinantinio Gag baltymo biosintezės kiekio. Gag baltymas gali sąveikauti su ląstelės antivirusinės sistemos baltymais, kurie kontroliuoja viruso dgRNR kopijų skaičių (Rowley *et al.*, 2016). BY4741 kamienne, transformuotame pYAK3-LAcDs arba pYAK3-GagWT, yra padidėjęs Gag baltymo kiekis. Jis sumažina ląstelės antivirusinės sistemos baltymų kiekį, tenkantį L-A viruso nukleokapsidei, kurioje vykdoma genomo replikacija arba transkripcija. Kitas galimas paaiškinimas galėtų būti susijęs su greitu viruso genomo pakavimu. Yra nustatyta, kad viruso koduojamas sulietinis Gag-Pol baltymas, susirišęs su koduojančią L-A viruso genomo grandine, inicijuoja nukleokapsidės susidarymą (Ribas *et al.*, 1994b). Taigi, esant dideliame laisvų Gag baltymo molekulių kiekiui ląstelėje, nukleokapsidė gali būti sudaroma žymiai greičiau, tokiu būdu viruso replikacija pagreitėja ir dėl to stebima dgRNR genomo replikacijos stimuliacija.



3.8 pav. Rekombinantinių ScV-LA-1 tipo baltymus koduojančių genų raiška BY4741 kamiene ir koduojamų baltymų biosintezės įtaka natyviame L-A virusui ląstelėje. A) Baltyminiai geliai – skirtingų ScV-LA-1 viruso baltymus koduojančių genų raiška BY4741 kamiene (viršutinės nuotraukos, dešinėje nuotraukoje frakcionuotas 10 kartų skiestas mėginys, norint pademonstruoti Gag-CFH viruso sintezės lygį) ir išskirta suminė RNR iš šių kamienu (apatinės nuotraukos); B) ScV-LA-1 viruso, baltymus koduojančių genų raiškos kasetės pYAK3 raiškos vektoriuje. P<sup>TEF1</sup> – TEF1 promotorius. T<sup>CYC1</sup> – CYC1 terminatorius, žaliai pažymėta Gag domeną koduojanti dalis, geltonai – Pol domeną, raudonai – ribosominis rėmelio poslinkio regionas, CFH – žymi afininį inkarą sudarytą iš FLAG ir His afininį inkarų; C) Gag ir sulietinio Gag-Pol transliuojamos baltymų sekos 644–680 a.r. rėmelio poslinkio regione (šiam regione persidengia viruso Gag ir Pol domenų koduojančios sekos).

L-A viruso atviro skaitymo rėmeliai, koduojantys Gag ir Gag-Pol baltymus, turi bendrą 108 bp konservatyvų ribosominio rėmelio poslinkio regioną. Šis regionas, priklausomai nuo to, kuris baltymas yra transliuojamas, koduoja du fizikocheminėmis savybėmis besiskiriančius polipeptidus. Vykstant Gag baltymo transliacijai, Gag C-galą (644-680 a.r.) sudaro hidrofobinės ir neigiamai įkrautos aminorūgštys, o transliacijos metu įvykus ribosominiam rėmelio poslinkiui – transliuojamo Gag-Pol sulietinio baltymo Gag domeno C-galą (644-680 a.r.) sudaro polinės ir teigiamai įkrautos aminorūgštys (3.8 pav. C). Toks aminorūgščių pasiskirstymas Gag ir sulietinio Gag-Pol baltymo 644-680 motyve ir ypatingai aukštas sekos konservatyvumas tarp skirtingų L-A virusų variantų leidžia daryti prielaidą, kad motyvas turi svarbią paskirtį

viruso replikacijos ir/arba transliacijos cikluose. Norėdami patikrinti šia hipotezę, sukonstravome pYAK3-Gag $\Delta$  plazmidę, kuri koduoja Gag baltymą su C-gale pašalintomis 34 a.r. (toliau Gag $\Delta$ ). Atlikus suminės RNR iš mielių ląstelių, transformuotų pYAK3-Gag $\Delta$  plazmide, analizę, nustatėme, kad Gag $\Delta$  baltymo sintezė slopina natyvaus dgRNR L-A viruso genomo replikaciją (3.8 pav. A). Remiantis gautais duomenimis galime daryti prielaidą, kad L-A viruso ribosominio rėmelio poslinkio regiono koduojamas motyvas yra būtinas natyvaus L-A dgRNR viruso genomo replikacijai.

Norėdami patikrinti Gag baltymo toleranciją ir gebėjimą skatinti dgRNR viruso genomo akumuliaciją, esant prie baltymo C-galo prilietai afininiam inkarui, sukonstravome pYAK3-Gag+CFH plazmidę. Ši plazmidė koduoja pilno ilgio Gag baltymą (1-680 a.r.) prie kurio prilietas 23 a.r. ilgio fragmentas, sudarytas iš FLAG (a.r. seka DYKDDDDK) ir HIS (6  $\times$  His) afininių inkarų (3.8 pav. B). Šia plazmide transformavus BY4741 kamieną, buvo stebima koduojamo baltymo sintezė (3.8 pav. A). Išgryninus suminę nukleorūgščių frakciją, buvo stebimas natyvaus L-A viruso genomo replikacijos skatinimas (3.8 pav. A). Apibendrinant galime daryti išvadą, kad padidėjus pilno ilgio Gag baltymo kiekiui ląstelėje, vyksta natyvaus L-A viruso dgRNR genomo kopijų akumuliacija ir būtina to sąlyga – ribosominio rėmelio poslinkio koduojami motyvai (3.8 pav. C). Kol kas nėra aišku, ar Gag baltymo hidrofobinis ir neigiamai įkrautas C-galas, ar polinis ir teigiamai įkrautas sulietinio Gag-Pol baltymo Gag domeno C-galas, kuris sintetinamas įvykus ribosominiam rėmelio poslinkiui, yra būtinas natyvaus viruso genomo akumuliacijai. Teoriškai abu variantai gali būti transliuojami, esant tik pilno ilgio Gag baltymą koduojančiai sekai, nes Gag baltymą koduojančiame atviro skaitymo rėmelyje yra seka, kuri natyviame viruse sudaro pseudomazgą, dėl kurio vyksta ribosominis rėmelio poslinkis (Lopinski *et al.*, 2000). Tokiu būdu gali būti transliuojami dvejų tipų Gag baltymai, turintys arba hidrofobinį, arba hidrofilinį C-galą. Norint tiksliai nustatyti, kuris koduojamas motyvas yra atsakingas už natyvaus viruso genomo kopijų akumuliaciją, reiktų sumodeliuoti tokias koduojančias sekas,

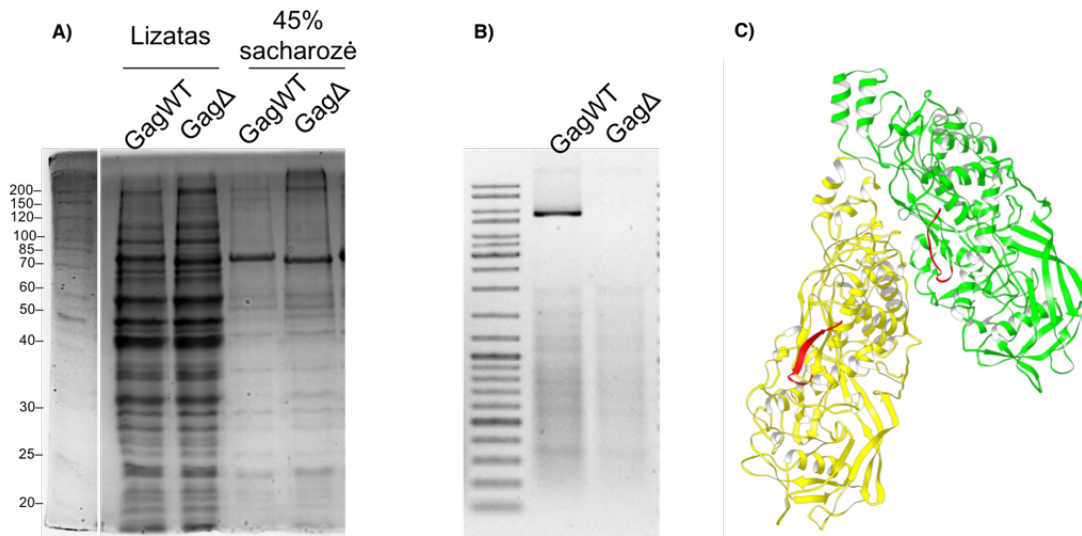
kurios įvykus jų transkripcijai nesudarytų pseudomazgo struktūros ir todėl nevyktų ribosominis rėmelio poslinkis transliacijos metu.

### **3.2.2 ScV-LA-1 viruso nukleokapsidės ir virusinių dalelių gryninimas**

Norint įvertinti sukonstruotų plazmidžių koduojamų baltymų (3.2.1 skyrius) gebėjimą sudaryti į virusus panašias daleles, buvo atliekamas aukštos molekulinės masės baltyminių kompleksų išskyrimas ultracentrifuguojant. Skystame azote sutrynus ląsteles ir pašalinus ląstelių nuolaužas, aukštos molekulinės masės dariniai frakcionuojami centrifuguojant 45 % sacharozės gradientu. Po ultracentrifugavimo kamiene, kuriame buvo vykdoma pilno ilgio Gag baltymo raiška, stebimas žymus Gag baltymo kiekio padidėjimas (3.9 pav. A), o išskyrus nukleorūgštis iš baltyminio preparato, mėginyje nustatytas viruso dgRNR genomas (3.9 pav. B). Tuo tarpu kamiene, kuriame vykdyta GagΔ baltymo raiška, nustatyta, kad jame formuojasi virusinės RNR neturinčios virusinės dalelės (3.9 pav. A ir B) – šio baltymo biosintezė ląstelėje pašalina L-A viruso genomą.

Remiantis gautais rezultatais, manome, kad Gag baltymo C-galas yra atsakingas už sąveiką su Gag-Pol sulietiniu baltymu. Literatūroje minima, kad iš Gag baltymo pašalinus C-galą, formuojamos tokio pačios struktūros virusinės dalelės, kaip ir pilno ilgio Gag baltymo (Fujimura *et al.*, 1992). Esant GagΔ baltymo pertekliui ląstelėje, jis galimai sudaro asimetrinius dimerus su natyvaus L-A viruso koduojamais Gag baltymais, taip suformuodamas virusines daleles, neturinčias Gag-Pol sulietinio baltymo. Literatūroje minima, kad Gag baltyme pašalinus C-galą 33 a.r., toks baltymas neformuoja virusinių dalelių su Gag-Pol sulietiniu baltymu (Ribas ir Wickner, 1998). To pasekmė – natyvaus L-A viruso genomo eliminavimas iš ląstelės, kadangi nėra užtikrintas Gag-Pol įtraukimas į kapsidę. Tuo tarpu esant pilno ilgio Gag baltymo pertekliui, vyksta natyvaus L-A viruso replikacijos skatinimas. Rekombinantinis pilno ilgio Gag baltymas, C-galą turintis už sąveiką atsakingą seką, gali formuoti asimetrinius dimerus su Gag-Pol baltymu, taip

užtikrindamas virusinių dalelių su inkorporuotu Gag-Pol sulietiniu baltymu susidarymą ir tolesnę viruso replikaciją bei transkripciją.



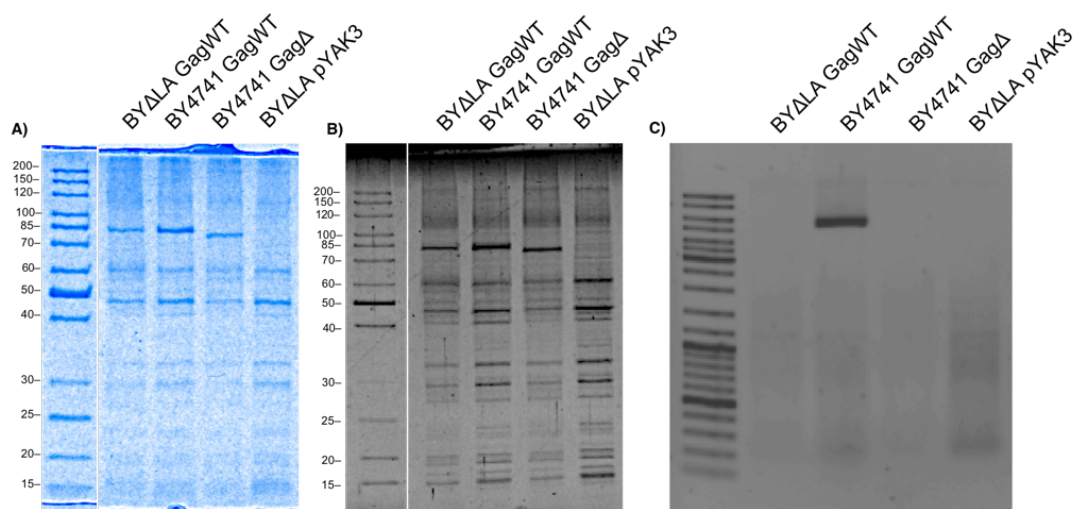
3.9 pav. L-A viruso nukleokapsidės ir kitų aukštos molekulinės masės darinių gryninimas ir asimetrinio Gag baltymo dimero struktūra. A) Baltyminis gelis: lizatas – baltyminiai mėginiai prieš ultracentrifugavimą, 45 % sacharozės – baltyminiai mėginiai po ultracentrifugavimo. LAcDs – BY4741 kamienas transformuotas pYAK3-LAcDs plazmide, GagΔ – BY4741 transformuotas pYAK3-GagΔ plazmide. B) Nukleorūgštys, išskirtos iš baltyminių mėginių po ultracentrifugavimo; C) Gag asimetrinio dimero struktūra (pdb archyvas: 1M1C). Geltonai ir žaliai pažymėti Gag baltymo monomerai sudarantys asimetrinį homodimerą, raudinai pažymėtos 641–651 padėtyse esančios Gag baltymo aminorūgštys.

### 3.2.3 ScV-LA-1 viruso baltymų sąveikos su ląstelės baltymais tyrimas

Norėdami identifikuoti ląstelės-šeimininko baltymus, sąveikaujančius su L-A viruso koduojamais baltymais ir virusiniu dgRNR genomu, BY4741 kamieno pagrindu sukonstravome keturis *S. cerevisiae* kamienus. BY4741 GagWT – BY4741 kamienas, transformuotas pYAK3-GagWT plazmide. Šiame kamiene stebima aukšta Gag baltymo raiška ir padidėjęs dgRNR L-A viruso genomo kopijų skaičius (3.8 pav. A ir 3.10 pav.); BYΔLA GagWT – BYΔLA kamienas, transformuotas pYAK3-GagWT plazmide. BYΔLA kamienas sukonstruotas transformavus jį pYAK3-GagΔ plazmide, kurios koduojamas GagΔ baltymas eliminuoja BY4741 kamiene esantį viruso genomą. Iš gauto kamieno pašalinta pYAK3-GagΔ plazmidė (plazmidės pašalinimą atliko L. Aitmanaitė), tokiu būdu gaunamas mielių kamienas,

neturintis virusinės kilmės genetinės medžiagos; BY4741 GagΔ – BY4741 kamienas, transformuotas pYAK3-GagΔ plazmide; BYΔLA pYAK3 – BYΔLA kamienas, transformuotas tuščiu pYAK3 baltymų raiškos vektoriumi. Iš šių kamienų sacharozės gradientu išgryninome aukštos molekulinės masės ląstelinius kompleksus (3.10 pav. A ir B). Kompleksus sudarantys baltymai identifikuoti, atlikus LC-MS/MS proteominę analizę (proteominę analizę atliko Dr. A. Kaupinis ir Dr. M. Valius, VU GMC BChI Proteomikos centre).

Keturiuose mėginiuose proteominės analizės metu identifikuoti 864 unikalūs baltymai. Iš tolimesnės analizės pašalinti baltymai, identifikuoti BYΔLA pYAK3 kamienne. Šis kamienas neturi jokios L-A viruso kilmės genetinės medžiagos ir atliekant palyginamąją proteominę analizę nustatyti baltymai traktuojami kaip su virusu nesąveikaujantys aukštos molekulinės masės baltyminiai kompleksai. Likę 329 identifikuoti baltymai paskirstomi į tris sąveikos grupes: su Gag baltymu sąveikaujančių, su Gag baltymo C-galu sąveikaujančių ir su viruso nukleokapsidės vidaus struktūromis sąveikaujančių baltymų grupės.



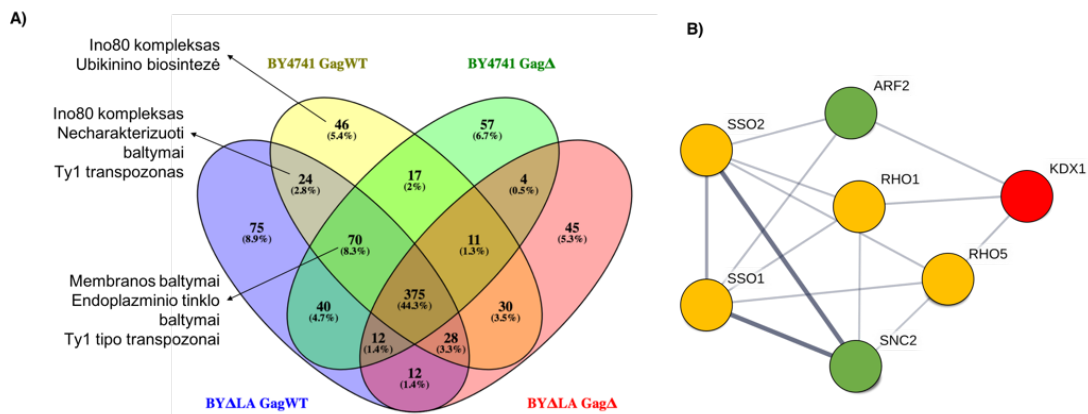
3.10 pav. Proteominei analizei naudotų mėginių baltyminė ir nukleorūgščių sudėtys. A) Baltyminis gelis dažytas PageBlue™ dažų; B) Baltyminis gelis dažytas SYPRO™ Ruby dažų; C) nukleorūgščių išgrynintos iš mėginių po ultracentrifugavimo.

Su Gag baltymu sąveikaujančiais baltymais laikomi tie, kurie sutampa kiekviename proteome, nustatytame iš BY4741 GagWT, BYΔLA GagWT ir



BY4741 GagΔ kamienų paruoštų mėginių. Į šią grupę patenka tie baltymai, kurie galimai sąveikauja su Gag baltymo formuojama kapside. Identifikuota 70 tokių baltymų (3.11 pav. A). Tarp šių baltymų nustatyti 52 susiję su membranomis baltymai, tarp kurių 35 baltymai yra susiję su endoplazminiu tinklu. Taip pat identifikuoti keturi Ty1 transpozono Gag-Pol baltymai (YER138C, YDR365W-B, YBL005B-W ir YNL284C-A).

Su Gag baltymo C-galu sąveikaujančiais baltymais laikomi tie, kurie nustatyti BY4741 GagWT ir BYΔLA GagWT, tačiau neidentifikuoti BYΔLA GagΔ kamienų proteomuose (3.11 pav. A). Nustatyti 24 tokią sąlygą tenkinantys baltymai. Tarp šių baltymų nustatyti trys Ino80 komplekso baltymai (ARP8, IES1 ir INO80). Likę baltymai neturi bendrų funkcinų bruožų. Dalies identifikuotų baltymų molekulinė funkcija ląstelėje nežinoma. Kaip ir su Gag baltymų sąveikaujančių baltymų grupėje, identifikuotas Ty1 transpozono Gag-Pol baltymas (YPR137C-B).



3.11 pav. Palyginamoji proteominė analizė ir sąsajos su transkriptomines analizės duomenimis. A) Veno diagrama pavaizduoti keturiuose tirtuose kamienuose identifikuoti aukštos molekulinės masės baltyminiai dariniai ir jų sąryšiai. Rodyklėmis išskirtos trys su L-A viruso koduojamais baltymais ar nukleorūgštimis sąveikaujančių baltymų grupės; B) Su KDX1 baltymų sąveikaujančių baltymų tinklas (tinklas sudarytas remiantis <https://string-db.org/> duomenų bazės 10.5 versija). Žaliai pažymėti su L-A virusų galimai sąveikaujantys baltymai, identifikuoti proteominės analizės metu; Raudonai pažymėtas KDX1 baltymas, kurio koduojamo geno raiška nesant virusui padidėja; Geltonai pažymėti baltymai, galimai dalyvaujantis sąveikoje tarp KDX1 baltymo ir su virusu sąveikaujančių baltymų.

Su viruso nukleokapsidės vidaus struktūromis sąveikauja tie baltymai, kurie aptikti tik BY4741 GagWT kamienne (3.11 pav. A). Pastarasis kamienas yra

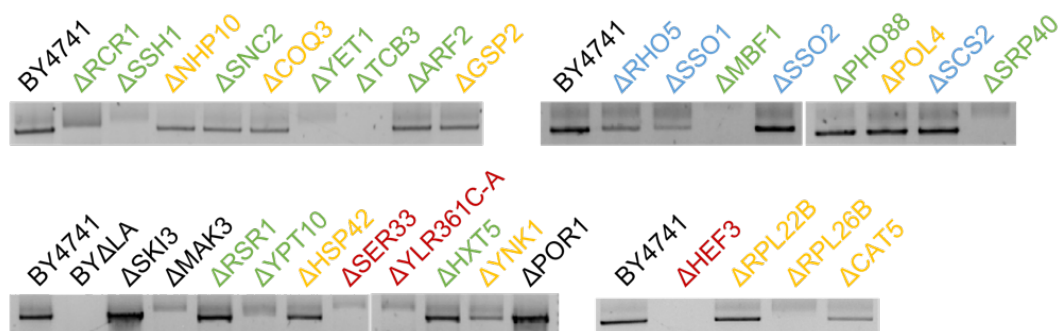
vienintelis, kuriame vyksta dgRNR viruso replikacija. Atmetus baltymus, sutampančius su kituose kamienuose identifikuotais, laikome, kad likę baltymai galimai sąveikauja su LA viruso sulietinio GagPol baltymo Pol domenu ir/arba dgRNR viruso genomu. Iš viso šiai grupei priskirti 46 baltymai. Tarp šių baltymų identifikuoti keturi baltymai, sudarantys Ino80 kompleksą (IES3, IES5, NHP10 ir TAF14), taip pat su ubikinono biosinteze susijusių baltymų grupė (COQ3, COQ5, COQ6, COQ11 ir CAT5). Likusiems baltymams bendrų funkcinių ar molekulinų bruožu neaptikta.

Ankstesniuose tyrimuose nustatėme, kad L-A tipo viruso buvimas ar nebuvimas ląstelėje keičia daugelio ląstelės genų raišką (Lukša *et al.*, 2017). Pasirinkę genus, kurių raiška tarp mielių, turinčių L-A virusą ir neturinčių, skiriasi daugiau negu keturis kartus, atlikome sąveikos tinklų analizę, ieškant bendrų determinančių su identifikuotais su L-A virusu sąveikaujančiais ląstelės-šeimininko baltymais. Nustatėme patikimą sąveikos tinklą su KDX1 baltymu (3.11 pav. B), kurį koduojančio geno raiška, esant pašalintam L-A virusui, padidėja apie 12 kartų. KDX1 baltymas yra baltymų kinazė, kuri esant ląstelės stresui, susijusiam su ląstelės sienelės pažaidomis, aktyvuoja streso atsako baltymus, fosforilindama už šių baltymų koduojamų genų raišką atsakingus transkripcijos faktorius (Chang *et al.*, 2013; García *et al.*, 2004). Nustatėme, kad sąveikoje tarp KDX1 ląstelės-šeimininko baltymų gali dalyvauti penki tarpiniai baltymai: SSO1 ir SSO2 – t-SNARE baltymai, SCS2 v-SNARE baltymas ir du GTP surišantys RAS-šeimos baltymai RHO1 ir RHO5. Šie baltymai taip pat buvo įtraukti į tolimesnei analizei naudojamų baltymų grupę, kurie gali turėti įtakos L-A viruso replikacijai.

### **3.2.4 Šeimininko baltymų įtaka L-A viruso replikacijai**

Iš proteominės analizės metu identifikuotų baltymų, kurie galimai sąveikauja su L-A koduojamais virusiniais baltymais (3.2.2 skyrius), pasirinkome 27 baltymus-kandidatus (žr. Priedas 1). Norėdami įvertinti šių baltymų poveikį L-A viruso replikacijai, atlikome BY4741 kamieno pagrindu sukonstruotų kamienų, kuriuose yra pašalinti pavieniai, baltymus koduojantys

atviro skaitymo rėmeliai, analizę. Išgryninus suminę RNR, buvo palygintas dgRNR L-A viruso kiekis su kamienais, kurių dgRNR kopijų pokytis esant tam tikro geno pašalinimui yra žinomas. Palyginimui naudojami kamieniai: BY4741 – turintis L-A dgRNR virusą; BY $\Delta$ LA – kamienas, kuriame eliminuotas L-A virusas; BY4741  $\Delta$ SKI3 – kamienas, kuriame pašalintas SKI3/XRN1 baltymą koduojantis genas: remiantis literatūros duomenimis, šio geno delecija stimuliuoja dgRNR viruso replikaciją (Masison *et al.*, 1995); BY4741  $\Delta$ MAK3 – kamienas, kuriame pašalintas N-galo acetiltransferazės katalitinį subvienetą koduojantis genas: šis baltymas yra būtinas L-A viruso replikacijai, o jo delecija slopina viruso replikaciją (Tercero *et al.*, 1993); BY4741  $\Delta$ POR1 – kamienas, kuriame pašalintas mitochondrijos poriną koduojantis genas: remiantis literatūros duomenimis, šio geno delecija stimuliuoja L-A viruso replikaciją (Dihanich *et al.*, 1989).



3.12 pav. Su L-A virusu sąveikaujančių ląstelės-šeimininko baltymus koduojančių genų delecijų įtaka natyvaus dgRNR viruso replikacijai. Kamieniai pavadinti pagal delectuoto geno koduojamo baltymo pavadinimą. Delecinių kamienų pavadinimų spalva parinkta pagal delectuoto geno koduojamo baltymo priklausymą vienai iš trijų išskirtų ląstelės-šeimininko baltymų grupių: žalia – su Gag baltymų sąveikaujančių baltymų-kandidatų grupė, geltona – su Pol domenu ir/arba dgRNR genomu sąveikaujanti baltymų-kandidatų grupė, raudona – su Gag baltymo C-galu sąveikaujančių baltymų-kandidatų grupė. Mėlyna spalva pažymėti jungtinę proteomikos ir transkriptomikos duomenų analizę atliekant identifikuoti baltymai.

Atlikus analizę 15-oje tirtų kamienų nustatėme, kad konkretaus geno pašalinimas moduliuoja dgRNR L-A viruso kiekį pokytį ląstelėje. Keturiuose kamieniuose buvo stebimas dgRNR L-A viruso genomo kopijų skaičiaus sumažėjimas, tuo tarpu likusiuose buvo stebimas visiškas viruso eliminavimas

(3.11 pav.). Natyvaus L-A viruso sumažėjimas stebėtas esant SSO1, RHO5, YNK1 ir CAT5 baltymus koduojančių genų iškritoms. SSO1 ir RHO5 baltymai identifikuoti, atliekant proteominės ir transkriptomines sąveikos tinklo analizę. Abu šie baltymai galimai yra reguliuojami KDX1 baltymų kinazės. Stebima dgRNR viruso replikacijos represija gali būti susijusi su ląstelinio signalo perdavimo sutrikimais, kas duoda užuominą į tai, kad ląstelė-šeimininkas gali nežinomu būdu koordinuoti L-A viruso replikaciją. Likę du baltymai, kuriuos koduojančių genų iškritos mažina dgRNR kiekį, nustatyti su viruso nukleokapsidės vidaus struktūromis sąveikaujančių baltymų grupėje. Šie baltymai yra YNK1 – nukleozidų difosfat-kinazė, dalyvaujanti DNR pažaidų taisyme (Yang *et al.*, 2009) ir CAT5 – mitochondrinis baltymas. Su viruso nukleokapsidės vidaus struktūromis sąveikaujančių baltymų grupėje nustatytas RPL26B, kurį koduojančio geno iškrita slopina natyvaus L-A viruso replikaciją. RPL26B – ribosominis baltymas, kuris yra vienas iš 60S ribosomos subvienetą sudarančių baltymų. Remiantis literatūros duomenimis, šis baltymas nedaro įtakos nei mielių ląstelių augimui, nei daro didelę įtaką ribosomų susirinkimui ir veiklai (Babiano *et al.*, 2012). Tačiau atlikus RPL26B baltymo sekų palyginimą tarp visų *Saccharomyces sensu stricto* mielių nustatėme, kad šio baltymo sekos yra ypatingai konservatyvios – identiškos. Aukštas sekų konservatyvumas įprastai yra susijęs su ypatingai konservatyvia baltymo funkcija ląstelėje. Mes manome, kad šis baltymas, sąveikaudamas su virusinio genomo konservatyviomis vietomis (rėmelio poslinkio regionas, pakavimo signalas – konservatyvios (identiškos) sekos tarp visų žinomų L-A virusų) ir/arba su Gag-Pol virusinio baltymo Pol domenu, dalyvauja viruso replikacijos cikle.

Likę 10 baltymų, kurių koduojančių genų delecija lemia natyvaus L-A viruso replikacijos slopinimą, yra iš su Gag baltymu sąveikaujančių ir su Gag baltymo C-galu sąveikaujančių grupių. Penki iš šių baltymų literatūroje apibūdinami kaip su endoplazmidiniu tinklu ir transportu ląstelėje susiję baltymai: RCR1, TCB1, SSH1, YET1 ir YPT1. Trys iš šių baltymų sąveikauja

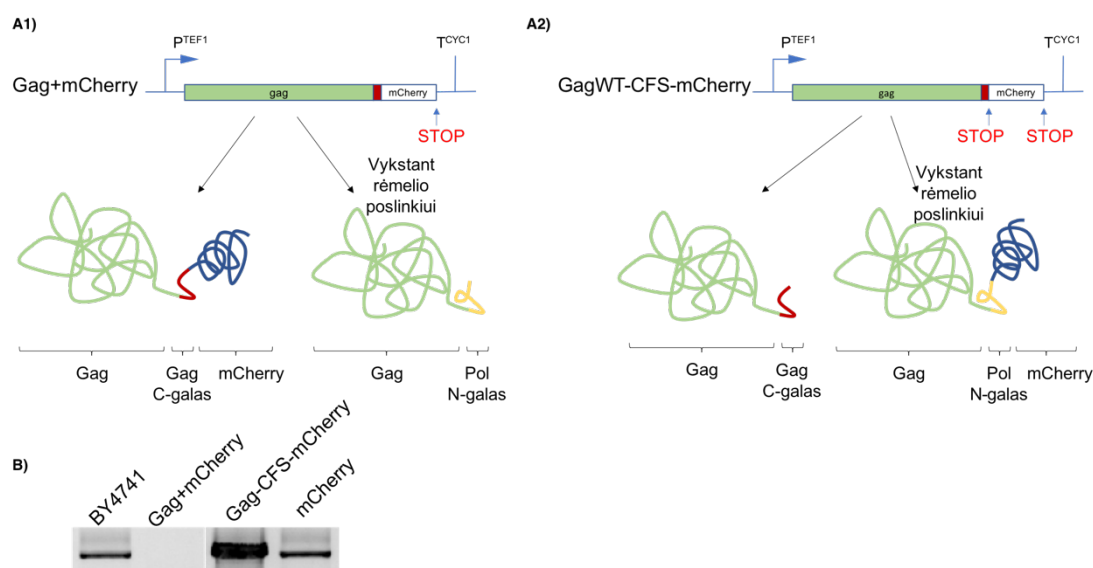
su nukleorūgštimis: HEF3 – transliacijos elongacijos faktorius, MBF1 – transkripcijos koaktivatorius, SRP40 – RNR surišantis baltymas. Be išvardintų baltymų, dar dviejų baltymų nebuvimas ląstelėje nebeužtikrina dgRNR L-A viruso replikacijos: SER33 – fosfoglicerato dehidrogenazė ir nežinomos funkcijos baltymas YKL361C-A. Pastarojo baltymo homologus aptikome tik tai *Saccharomycetaceae* šeimoje.

### 3.2.5 ScV-LA-1 koduojamų baltymų lokalizacijos ląstelėje tyrimas

Dauguma RNR virusų savo replikaciją bei virusinių dalelių surinkimą atlieka ląstelės-šeimininkės membranose, suformuodamos daugiabaltyminius kompleksus, žinomus kaip virusų fabrikai (angl. *virus factories*) ar viruso replikacijos kompleksai (angl. *viral replication complex*) (Nagy ir Pogany, 2012; de Castro *et al.*, 2013). Nustačius, kad nemaža dalis su Gag sąveikaujančių baltymų, kurių pašalinimas iš ląstelės eliminuoja dgRNR viruso genomą, yra susiję su endoplazminiu tinklu ir transportu ląstelėje, buvo nuspręsta patikrinti Gag baltymo sudaromų virusinių dalelių lokalizaciją ląstelėje. Norėdami tai įvertinti, prie Gag baltymo priliesome raudonai fluorescuojantį baltymą (mCherry). Baltymas prijungtas dviem skirtingais būdais. Pirmuoju būdu mCherry prie Gag baltymo C-galo prijungiamas taip, kad vykstant šio konstrukto transliacijai sintetinamas pilno ilgio Gag baltymas su C-gale prijungtu mCherry baltymu (toliau Gag+mCherry) (3.13 pav. A1). Antruoju būdu prie Gag baltymo mCherry prijungiamas už jo koduojamo STOP kodono (3.13 pav. A2). Vykstant pastarosios konstrukcijos informacinės RNR transliacijai, sintetinamas pilno ilgio Gag baltymas. Transliacijos metu įvykus ribosominiam rėmelio poslinkiui (angl. *ribosomal frameshift*), vyksta Gag baltymo, C-gale turinčio Pol domeno N-galo motyvą, sulieto su mCherry baltymu (3.13 pav. A2) sintezė (Gag-CFS-mCherry). Remiantis literatūra, rėmelio poslinkio dažnis siekia 1,8 % (Dinman *et al.*, 1991).

Atliekant šių dviejų konstrukcijų raiškos BY4741 kamiene tyrimus nustatyta, kad vykstant Gag+mCherry baltymo sintezei dgRNR L-A virusas iš ląstelių yra eliminuojamas (3.13 pav. B). Tuo tarpu vykdam

Gag-CFS-mCherry baltymo sintezės eksperimentą, stebimas L-A viruso dgRNR genomo replikacijos stimuliavimas (3.13 pav. B). Pastarasis rezultatas buvo tikėtasis, kadangi 98 % atveju vykdoma pilno ilgio Gag baltymo raiška, tuo tarpu Gag-CFS-mCherry teoriškai sintetinamas tik ~2 % atveju. Svarbu paminėti, kad vykstant tik mCherry baltymo sintezei, L-A dgRNR genomo kiekis ląstelėje nekinta, lyginant su L-A dgRNR kiekiu raiškos vektoriumi transformuotame kamiene. Kolokalizacijos analizei naudojamas BYER kamienas, kuriame prie Sec61 baltymo C-galo prilietas žaliai fluorescuojantis baltymas. Sec61 baltymas yra vienas dažniausiai naudojamų endoplazminio tinklo žymenų *S. cerevisiae* rūšies mielėse (Schmid *et al.*, 2006).

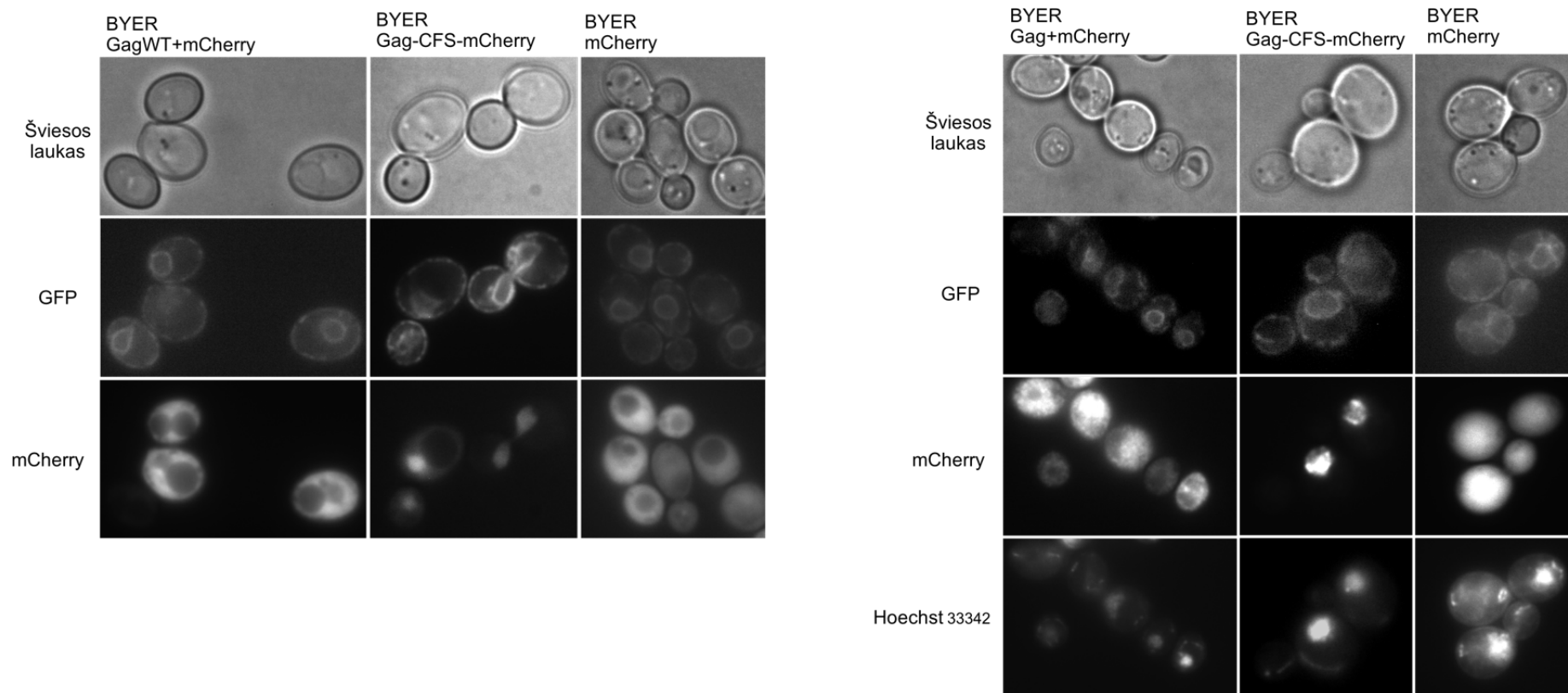


3.13 pav. Genetinių konstrukcijų, koduojančių skirtingais būdais prie Gag baltymo prilietą mCherry fluorescuojantį baltymą, schemas ir poveikis natyvaus L-A viruso dgRNR genomo replikacijai. A1) Gag baltymo su C-gale prilieto mCherry genetinė schema ir transliuojami baltymai; A2) Gag baltymo C-gale už STOP kodono prilieto mCherry sulietinio baltymo genetinė schema ir transliuojami baltymai; B) Gag+mCherry ir Gag-CFS-mCherry koduojamų baltymų poveikis natyvaus L-A viruso dgRNR genomo replikacijai.

Nustatėme, kad Gag+mCherry baltymas lokalizuotas citoplazmoje. Ši lokalizacija stebima tiek gyvų (3.14 pav. A), tiek fiksuotų (3.14 pav. B) ląstelių fluorescencinės mikroskopijos metu. Ši lokalizacija sutampa su literatūroje aprašyta Gag baltymo lokalizacija (Dihanich *et al.*, 1989). Stebimas natyvaus dgRNR LA viruso genomo eliminavimas greičiausiai vyksta tokiu pat

principu, kaip ir Gag $\Delta$  baltymo raiškos atveju (3.2.2 skyrius). Mes manome, kad Gag-Pol baltymas negali sąveikauti su rekombinantinio Gag+mCherry baltymo Gag domeno C-galu dėl prie jo esančio prilieto mCherry domeno. Literatūroje aprašyta, kad priliejus prie Gag baltymo C-galo nedidelės molekulinės masės baltymą, toks chimerinis baltymas formuoja į virusus panašias daleles (Powilleit *et al.*, 2007). Taigi Gag+mCherry baltymas sudaro virusines daleles, į kurias inkorporuojamas ir natyvaus L-A viruso koduojamas Gag baltymas (kaip pademonstruota Gag $\Delta$  baltymo atveju (3.2.2 skyrius), virusinio genomo nepakuojančių virusinių dalelių susidarymui Gag baltymo C-galas nėra reikalingas). Tokiu būdu Gag-Pol baltymui nebelieka tinkamų Gag baltymų virusinių dalelių susidarymui, kuriuose galėtų vykti viruso genomo replikacija.

Atliekant Gag-CFS-mCherry baltymo lokalizacijos tyrimą nustatyta, kad šis baltymas lokalizuotas branduolyje (3.14 pav.). Branduolio lokalizacija patvirtinta, endogenines ląstelės nukleorūgštis (genominę DNR ir mitochondrinę DNR) nudažius fluorescuojančiu dažu Hoechst 33342 (3.14 pav. B). Gag-CFS-mCherry baltymas nuo Gag+mCherry baltymo skiriasi tik rėmelio poslinkio regione koduojamų aminorūgščių seka (3.8 pav. C), tuo tarpu jų lokalizacija ląstelėje kardinaliai skiriasi. Remiantis gautais rezultatais darome prielaidą, kad C-gale esantis motyvas, kuris transliuojamas įvykus ribosominiam rėmelio poslinkiui transliacijos metu, nežinomu būdu nukreipia tokį Gag baltymą į branduolį. Proteolitinio mCherry baltymo nuskėlimo nuo Gag baltymo scenarijus, kuomet nuskeltas mCherry baltymas dėl savo mažo dydžio pasyvios pernašos būdu pernešamas į branduolį ir jame kaupiasi, yra mažiau tikėtinas, nes tokiu atveju esant tik mCherry baltymo sintezei turėtumėme stebėti jo lokalizaciją branduolyje. Gyvoje ląstelėje mCherry baltymas stebimas visose ląstelės vietose, išskyrus vakuolę, ir yra pasklidęs po visą ląstelę fiksuotose ląstelėse (3.14 pav.).



3.14 pav. Gag baltymo variantų lokalizacijos ląstelėje tyrimas. A) Gyvų ląstelių fluorescencinė analizė; B) Fiksuotų ląstelių fluorescencinė analizė. GagWT+mCherry – ląstelės transformuotos plazmide, koduojančia L-A viruso Gag baltymą su prie C-galo prilietu mCherry; GagWT-CFS-mCherry – ląstelės transformuotos plazmide, kuri koduoja Gag pilno ilgio baltymą ir Gag baltymą su prie C-galo prilietu mCherry baltymu, kuris yra transliuojamas tik įvykus ribosominiam rėmelio poslinkiui. mCherry – ląstelių lokalizacija naudojant U-MWG filtrą, GFP – U-MWIBA filtrą, Hoechst33342 – U-WU filtrą.



### 3.3 Rezultatų aptarimas

Šio darbo tiriamasis objektas – *Totiviridae* šeimos virusai ir jų palydovai, aptinkami *Saccharomyces sensu stricto* mielėse. Darbe pademonstruota, kad *Totiviridae* šeimos dgRNR L-A virusai yra paplitę tarp *Saccharomyces sensu stricto* mielių bei kad jų kintamumas koreliuoja su šeimininko genomo kintamumu (3.1.1 ir 3.1.2 skyriai). Analizuodami L-A viruso genomų sekas nustatėme, kad juose yra fragmentų, pasižyminčių identiškumu tarp visų žinomų virusų, o atskiros sritys pasižymi ypatingai dideliu variabilumu. Nustatėme, kad labiausiai kintami L-A viruso Gag baltymą koduojančių sekų regionai yra išsidėstę viruso kapsidės išorėje, tuo tarpu viruso kapsidės vidų sudarančios aminorūgštys pasižymi ypač dideliu konservatyvumu (3.1.3 skyrius). Mes manome, kad toks kapsidės paviršiuje stebimas variabilumas yra viruso prisitaikymo prie ląstelės-šeimininko koduojamų baltymų kintamumo išraiška. Konservatyvūs regionai yra kritinės viruso sritys, dalyvaujančios replikacijos cikle. Mes pademonstravome, kad vienas tokių regionų, Gag ir Pol atviro skaitymo rėmelio persiklojimo regionas, yra ypatingai svarbus dgRNR viruso replikacijos užtikrinimui (3.2.1 ir 3.2.2 skyriai). Taip pat pademonstravome, kad šis regionas galimai yra susijęs su Gag baltymo translokacija į branduolį (3.2.5 skyrius) bei nustatėme tris šeimininko baltymus, kurie galimai sąveikauja su šiuo regionu ir yra būtini viruso replikacijai ir/arba transliacijai (3.2.3 ir 3.2.4 skyriai). Konkretus mechanizmas, kaip Gag baltymo C-galas užtikrina viruso replikaciją ir ar šiame procese dalyvauja su C-galus sąveikaujantys ląstelės baltymai, turėtų paaiškėti papildomų tyrimų metu.

RNR virusai savo replikaciją bei virusinių dalelių surinkimą atlieka ląstelės-šeimininkės membranose – viruso replikacijos kompleksuose (Nagy ir Pogany, 2012; de Castro *et al.*, 2013). Pastaraisiais metais gauta daug informacijos apie RNR virusų sąveiką su ląstelės branduolio struktūromis (Rawlinson ir Moseley, 2015). DgRNR virusų sąsaja su membranomis pademonstruota tikrai *Reoviridae* šeimai priskiriamų virusų atveju (Fernández

de Castro *et al.*, 2014; Fernández de Castro *et al.*, 2015; Romero-Brey ir Bartenschlager, 2016). Šiame darbe gauti duomenys, kad dalis ląstelės-šeimininko baltymų, sąveikaujančių su viruso kapside ir būtinų viruso replikacijai užtikrinti, susiję su endoplazminiu tinklu (3.2.3 ir 3.2.4 skyriai) ir kad viruso Gag baltymas gali būti lokalizuotas branduolyje (3.2.5 skyrius), atveria naujus horizontus L-A viruso ciklo ląstelėje tyrimams. Remiantis gautais rezultatais darome prielaidą, kad L-A virusas replikacijos kompleksus sudaro endoplazminiame tinkle, kuriuose vykdo savo biogenezę.

*S. paradoxus* rūšyje nuskaitėme dviejų unikalių dgRNR palydovų genomų sekas (3.1.5 skyrius). Patvirtinome, kad vienas iš jų koduoja biocidiniu aktyvumu prieš kitas mieles pasižymintį baltymą bei pasiūlėme, kodėl galimai kito dgRNR palydovo koduojamas baltymas nepasižymi biocidiniu aktyvumu prieš kitas mieles (3.1.5 skyrius). Atlikę *de novo* mielių transkriptomų surinkimą, juose identifikavome dgRNR L-A viruso ir jo M-palydovo nuorašus. Didėjant mielių RNR sekoskaitos duomenų kiekiui, ypatingai gamtinių kamienų su geografine ir kilmės nuorodomis, bus galima įvertinti skirtingų L-A virusų ir jų M palydovų paplitimą bei šio paplitimo ir kilmės dėsningumus. Būtent taip išanalizavę dažniausiai naudojamus laboratorinius *S. cerevisiae* mielių rūšies kamienus, juose aptikome išskirtinai ScV-LA-1 viruso variantą (3.1.1 skyrius). Šis atradimas yra ypatingai svarbus, nes ląstelėje esant L-A virusui, transkriptominės ar proteominės analizės duomenys gali būti klaidingai interpretuojami: stebimi genų raiškos pokyčiai nebūtinai gali būti susiję vien su tiriamu procesu, tačiau ir su viruso kiekio ir būvio pasikeitimu ląstelėje.

Nustatytas EVE-M28 endogeninis virusinis elementas atveria perspektyvą plataus masto EVE elementų, kurių kilmė *Totiviridae* virusų M palydovai, tyrimams. Mes manome, kad šio EVE elemento atsiradimas chromosomoje yra galimai susijęs su transpozonų vykdoma integracija. Remiantis *Saccharmyces sensu stricto* genomų palyginiais nustatėme, kad EVE-M28 elementas aptinkamas tik tai *S. paradoxus* mielių rūšies Europos populiacijoje. Jo seka

nukleorūgščių lygmenyje bei koduojamo baltymo seka pasižymi ypatingai aukštu panašumu su M28 dgRNR palydovo koduojamu kileriniu toksinu, kas leidžia daryti prielaidą, kad šis integracijos įvykis evoliuciniu požiūriu įvyko neseniai. Tuo tarpu kiti *Saccharomyces sensu stricto* mielių M palydovų koduojamų baltymų homologai, aptinkami kitų mielių rūšių chromosomose, pasižymi reikšmingu panašumu tik analizuojant jų koduojamų baltymų sekas. Vis tik nagrinėjant šių homologų genetinę aplinką, taip pat identifikuojama transpozonų fragmentų apsuptis, tačiau ji yra ne tokia akivaizdi, kaip EVE-M28 atveju ir reikalauja papildomų tyrimų patvirtinimui. Ateities tyrimai turėtų patikslinti turimus duomenis apie EVE elementus mielėse: ar visi stebimi dgRNR palydovo EVE elementai mielėse yra susiję su transpozonų aktyvumu ir kokią funkciją jie atlieka mielių ląstelėje.

## IŠVADOS

1. Išvystytas metodas, skirtas pilno ilgio dgRNR viruso genomo sekų nuskaitymui, kurį pritaikius atrasti 8 nauji *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* virusai.
2. L-A dgRNR virusų genomo sekų kintamumas skirtinguose *Saccharomyces sensu stricto* kamienuose reikšmingai koreliuoja su šeimininko genomo kintamumu ir nurodo virusų ir ląstelės koevoliucijos galimybę.
3. Identifikuoto *S. paradoxus* endogeninio virusinio elemento EVE-M28 formavimasis galimai susijęs su mielių endogeninių retrotranspozonų aktyvumu.
4. ScV-LA-1 viruso koduojamo Gag baltymo C-galinis motyvas yra būtinas virusinių nukleokapsidžių, galinčių užtikrinti dgRNR virusinio genomo replikaciją, susidarymui.
5. Nustatyta 15 naujų L-A viruso šeimininko baltymų, moduliuojančių dgRNR replikacijos lygį, tarp kurių 13 sąveikauja su L-A viruso koduojamais baltymais, o du susiję su signalo perdavimu ląstelėje.
6. ScV-LA-1 viruso koduojamo GagPol baltymo Gag domeno C-galinis motyvas yra Gag-CFS-mCherry baltymo translokacijos į branduolį determinantė.

# MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

## Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta straipsniuose

1. **Konovalovas, A.**, Servienė, E., Serva, S. (2016) Genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus L-A-28. *Genome Announcements*. **4**(3), 3–4.
2. Lukša, J., Ravoitytė, B., **Konovalovas, A.**, Aitmanaitė, L., Butenko, A., Yurchenko, V., Serva, S., Servienė, E. (2017) Different Metabolic Pathways Are Involved in Response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and M Viruses. *Toxins*. **9**(8), 233.
3. Grybchuk, D., Akopyants, N.S., Kostygov, A.Y., **Konovalovas, A.**, Lye, L.F., Dobson, D.E., Zangger, H., Fasel, N., Butenko, A., Frolov, A.O., Votýpka, J., d'Avila-Levy, C.M., Kulich, P., Moravcová, J., Plevka, P., Rogozin, I.B., Serva, S., Lukeš, J., Beverley, S.M., Yurchenko, V. (2018) Viral discovery and diversity in trypanosomatid protozoa with a focus on relatives of the human parasite *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **115**(3), E506–E515.
4. Vepškaitė-Monstavičė, I., Lukša, J., **Konovalovas, A.**, Ežerskytė, D., Stanevičienė, R., Strazdaitė-Žielenė, Ž., Serva, S., Servienė, E. Crossing the helper-satellite virus specificity border evidenced by the *Saccharomyces paradoxus* K66 killer system. *Viruses* (rankraštis pateiktas spausdinimui).

## Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta tezėse

1. **Konovalovas, A.**, Miglė, S., Servienė, E., Serva, S. (2016) Does yeast virus possess specificity towards replication of satellite virus? *FEBS Journal*. **283** (Special Issue), 146.

## Disertacijoje pateikta medžiaga pristatyta tarptautinėse konferencijose

1. **A. Konovalovas**, M. Survilaitė, E. Servienė, S. Serva. Evolutionary relationship of ubiquitous *Saccharomyces cerevisiae* dsRNA viruses. *XIV International Lithuanian Biochemical Society International Conference*. 2016 Birželio 28-30, Druskininkai, Lietuva. (*Thermo Fisher Scientific apdovanojimas už geriausią stendinį pranešimą*)
2. L. Aitmanaitė, **A. Konovalovas**, E. Servienė, S. Serva. Healing the yeast from L-A virus(es). *XIV International Lithuanian Biochemical Society International Conference*. 2016 Birželio 28-30, Druskininkai, Lietuva.
3. J. Lukša, I. Vepškaitė-Monstavičė, R. Stanevičienė, Ž. Strazdaitė-Žielenė, A. Žilakauskis, **A. Konovalovas**, S. Serva, E. Servienė. Persistence of killer viruses in natural environment, *7<sup>th</sup> EMBO Meeting: Advancing the life sciences*, 2016 m. Rugsėjo 10-13, Manheimas, Vokietija.
4. **A. Konovalovas**, A. Žilakauskis, I. Vepškaitė-Monstavičė, E. Servienė, S. Serva. Evolutionary relationship of ubiquitous *Saccharomyces cerevisiae* dsRNA viruses. *8<sup>th</sup> EMBO Conference: From Functional Genomics to Systems Biology*. 2016 m. Lapkričio 12-15, Heidelbergas, Vokietija.
5. **A. Konovalovas**, L. Aitmanaitė, I. Vepškaitė-Monstavičė, R. Stanevičienė, E. Servienė, S. Serva. New Double-stranded RNA Viruses from *Saccharomyces sensu stricto*. *28<sup>th</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology*. 2017 rugpjūčio 27 d. – rugsėjo 1 d., Praha, Čekija.

6. L. Aitmanaitė, **A. Konovalovas**, P. Medvedevas, E. Servienė, S. Serva. Complex relationships between yeast totiviruses. *XV International Lithuanian Biochemical Society International Conference*. 2017 Birželio 26-29, Dubingiai, Lietuva.

## **FINANSINĖ PARAMA**

Lietuvos Mokslo Taryba finansavo Mokslininkų grupių projektą MIP-035/2014 ir Nacionalinės mokslo programos „Agro-, miškų ir vandens ekosistemų tvarumas“ projektą SIT-7/2015.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Afgan, E., Baker, D., van den Beek, M., Blankenberg, D., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Eberhard, C., Grüning, B., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Von Kuster, G., Rasche, E., Soranzo, N., Turaga, N., Taylor, J., Nekrutenko, A., Goecks, J. (2016) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic acids research*. **44**(W1), W3–W10.
2. Almeida, P., Gonçalves, C., Teixeira, S., Libkind, D., Bontrager, M., Masneuf-Pomarède, I., Albertin, W., Durrens, P., Sherman, D.J., Marullo, P., Todd Hittinger, C., Gonçalves, P., Sampaio, J.P. (2014) A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum*. *Nature Communications*. **5**(May).
3. Angebault, C., Djossou, F., Abélanet, S., Permal, E., Soltana, M. Ben, Diancourt, L., Bouchier, C., Woerther, P.L., Catzeflis, F., Andremont, A., D'enfert, C., Bougnoux, M.E. (2013) *Candida albicans* is not always the preferential yeast colonizing humans: A study inwayampi amerindians. *Journal of Infectious Diseases*. **208**(10), 1705–1716.
4. Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajihō, H., Hoshino, S.I., Katada, T. (2001) Ski7p G protein interacts with the exosome and the ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO Journal*. **20**(17), 4684–4693.
5. Arroyo-López, F.N., Pérez-Torrado, R., Querol, A., Barrio, E. (2010) Modulation of the glycerol and ethanol syntheses in the yeast *Saccharomyces kudriavzevii* differs from that exhibited by *Saccharomyces cerevisiae* and their hybrid. *Food Microbiology*. **27**(5), 628–637.
6. Babiano, R., Gamalinda, M., Woolford, J.L., de la Cruz, J. (2012) *Saccharomyces cerevisiae* Ribosomal Protein L26 Is Not Essential for Ribosome Assembly and Function. *Molecular and Cellular Biology*. **32**(16), 3228–3241.
7. Barros, M.H., da Cunha, F.M., Oliveira, G.A., Tahara, E.B., Kowaltowski, A.J. (2010) Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*. **131**(7–8), 494–502.
8. Becher, P.G., Flick, G., Rozpedowska, E., Schmidt, A., Hagman, A., Lebreton, S., Larsson, M.C., Hansson, B.S., Piškur, J., Witzgall, P., Bengtsson, M. (2012) Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Functional Ecology*. **26**(4), 822–828.
9. Bejarano, E.R., Khashoggi, a, Witty, M., Lichtenstein, C. (1996) Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**(2), 759–764.
10. Belyi, V.A., Levine, A.J., Skalka, A.M. (2010) Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS pathogens*. **6**(7), e1001030.
11. Bill, C.A., Summers, J. (2004) Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101**(30), 11135–11140.
12. Bing, J., Han, P.J., Liu, W.Q., Wang, Q.M., Bai, F.Y. (2014) Evidence for a far east asian origin of lager beer yeast. *Current Biology*. **24**(10), R380–R381.



13. Blanc, A., Goyer, C., Sonenberg, N. (1992) The coat protein of the yeast double-stranded RNA virus L-A attaches covalently to the cap structure of eukaryotic mRNA. *Molecular and cellular biology*. **12**(8), 3390–8.
14. 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), 2664–74.
15. Blumenthal, T., Carmichael, G.G. (1979) RNA replication: function and structure of Qbeta-replicase. *Annual review of biochemistry*. **48**, 525–48.
16. Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. **30**(15), 2114–20.
17. Bostian, K.A., Elliott, Q., Bussey, H., Bum, V., Smith, A.I., Tipper, D.J. (1984) Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: Multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell*. **36**(3), 741–751.
18. Bostian, K.A., Sturgeon, J.A., Tipper, D.J. (1980) Encapsidation of yeast killer double-stranded ribonucleic acids: Dependence of M on L. *Journal of Bacteriology*. **143**(1), 463–470.
19. Botstein, D., Fink, G.R. (2011) Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics*. **189**(3), 695–704.
20. Boynton, P.J., Greig, D. (2014) The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast (Chichester, England)*. **31**(12), 449–62.
21. Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast (Chichester, England)*. **14**(2), 115–32.
22. Breinig, F., Sendzik, T., Eisfeld, K., Schmitt, M.J. (2006) Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**(10), 3810–3815.
23. Brown, J.T., Bai, X., Johnson, A.W. (2000) The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *Rna*. **6**(3), 449–457.
24. Bruenn, J. (2012) Genes from Double-Stranded RNA Viruses in the Nuclear Genomes of Fungi. *Biocommunication of Fungi*. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 71–83.
25. Bruenn, J.A., Warner, B.E., Yerramsetty, P. (2015) Widespread mitovirus sequences in plant genomes. *PeerJ*. **3**, e876.
26. Brysch-Herzberg, M., Seidel, M. (2017) Distribution patterns of *Saccharomyces* species in cultural landscapes of Germany. *FEMS yeast research*. **17**(5), 1–28.
27. Buser, C.C., Newcomb, R.D., Gaskett, A.C., Goddard, M.R. (2014) Niche construction initiates the evolution of mutualistic interactions M. Bonsall, sud. *Ecology Letters*. **17**(10), 1257–1264.
28. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*. **10**, 421.
29. Castón, J.R., Trus, B.L., Booy, F.P., Wickner, R.B., Wall, J.S., Steven, A.C. (1997) Structure of L-A virus: A specialized compartment for the transcription and

- replication of double-stranded RNA. *Journal of Cell Biology*. **138**(5), 975–985.
30. de Castro, I.F., Volonté, L., Risco, C. (2013) Virus factories: biogenesis and structural design. *Cellular microbiology*. **15**(1), 24–34.
  31. Chang, M., Kang, H.J., Baek, I.J., Kang, C.M., Park, Y.S., Yun, C.W. (2013) Kdx1 regulates RCK1 gene expression by interacting with Rlm1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **435**(3), 350–355.
  32. Cheng, R.H., Caston, J.R., Wang, G.J., Gu, F., Smith, T.J., Baker, T.S., Bozarth, R.F., Trus, B.L., Cheng, N., Wickner, R.B. (1994) Fungal virus capsids, cytoplasmic compartments for the replication of double-stranded RNA, formed as icosahedral shells of asymmetric Gag dimers. *Journal of molecular biology*. **244**(3), 255–8.
  33. Chong, J.L., Chuang, R.Y., Tung, L., Chang, T.H. (2004) Ded1p, a conserved DExD/H-box translation factor can promote yeast L-A virus negative-strand RNA synthesis in vitro. *Nucleic Acids Research*. **32**(6), 2031–2038.
  34. Crochu, S., Cook, S., Attoui, H., Charrel, R.N., De Chesse, R., Belhouchet, M., Lemasson, J.-J., de Micco, P., de Lamballerie, X. (2004) Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *The Journal of general virology*. **85**(Pt 7), 1971–80.
  35. Daugherty, M.D., Malik, H.S. (2012) Rules of Engagement: Molecular Insights from Host-Virus Arms Races. *Annual Review of Genetics*. **46**(1), 677–700.
  36. Dignard, D., Whiteway, M., Germain, D., Tessier, D., Thomas, D.Y. (1991) Expression in yeast of a eDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Production*. **7**, 127–136.
  37. Dihanich, M., Van Tuinen, E., Lambris, J.D., Biocenter, B.M. (1989) Accumulation of Viruslike Particles in a Yeast Mutant Lacking a Mitochondrial Pore Protein. *Molecular and Cellular Biology*. **9**(3), 1100–1108.
  38. Dinman, J.D., Icho, T., Wickner, R.B. (1991) A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **88**(1), 174–178.
  39. Drinnenberg, I.A., Fink, G.R., Bartel, D.P. (2011) Compatibility with killer explains the rise of RNAi-deficient fungi. *Science*. **333**(6049), 1592.
  40. Drinnenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R., Bartel, D.P. (2009) RNAi in budding yeast. *TL - 326. Science (New York, N.Y.)*. **326** VN-(5952), 544–550.
  41. Dufresne, P.J., Thivierge, K., Cotton, S., Beauchemin, C., Ide, C., Ubalijoro, E., Laliberté, J.F., Fortin, M.G. (2008) Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. *Virology*. **374**(1), 217–227.
  42. Duggal, N.K., Emerman, M. (2012) Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. *Nature Reviews Immunology*. **12**(10), 687–695.
  43. Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*. **32**(5), 1792–7.
  44. Edskes, H.K., Ohtake, Y., Wickner, R.B. (1998) Mak21p of *Saccharomyces cerevisiae*, a homolog of human CAATT-binding protein, is essential for 60 S ribosomal subunit biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. **273**(44), 28912–28920.

45. Elde, N.C., Child, S.J., Geballe, A.P., Malik, H.S. (2009) Protein kinase R reveals an evolutionary model for defeating viral mimicry. *Nature*. **457**(7228), 485–489.
46. Enard, D., Cai, L., Gwennap, C., Petrov, D.A. (2016) Viruses are a dominant driver of protein adaptation in mammals. *eLife*. **5**, 3–5.
47. Esteban, R., Wickner, R.B. (1986) Three different M1RNA-containing viruslike particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: in-vitro M1 double stranded RNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **6**(5), 1552–1561.
48. Fernández de Castro, I., Zamora, P.F., Ooms, L., Fernández, J.J., Lai, C.M.-H., Mainou, B.A., Dermody, T.S., Risco, C. (2015) Correction for Fernández de Castro et al., Reovirus Forms Neo-Organelles for Progeny Particle Assembly within Reorganized Cell Membranes. *mBio*. **6**(1), 2529.
49. Fernández de Castro, I., Zamora, P.F., Ooms, L., Fernández, J.J., Lai, C.M.-H., Mainou, B.A., Dermody, T.S., Risco, C. (2014) Reovirus forms neo-organelles for progeny particle assembly within reorganized cell membranes. *mBio*. **5**(1).
50. Feschotte, C. (2008) Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nature Reviews Genetics*. **9**(5), 397–405.
51. Feschotte, C., Gilbert, C. (2012) Endogenous viruses: Insights into viral evolution and impact on host biology. *Nature Reviews Genetics*. **13**(4), 283–296.
52. Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., Bateman, A. (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic acids research*. **44**(D1), D279-85.
53. Frank, A.C., Wolfe, K.H. (2009) Evolutionary capture of viral and plasmid DNA by yeast nuclear Chromosomes. *Eukaryotic Cell*. **8**(10), 1521–1531.
54. Fruhmann, G., Seynnaeve, D., Zheng, J., Ven, K., Molenberghs, S., Wilms, T., Liu, B., Winderickx, J., Franssens, V. (2017) Yeast buddies helping to unravel the complexity of neurodegenerative disorders. *Mechanisms of ageing and development*. **161**(Pt B), 288–305.
55. Fujimura, T., Esteban, R. (2012) Cap snatching of yeast L-A double-stranded RNA virus can operate in Trans and requires viral polymerase actively engaging in transcription. *Journal of Biological Chemistry*. **287**(16), 12797–12804.
56. Fujimura, T., Esteban, R. (2010) Yeast double-stranded RNA virus L-A deliberately synthesizes RNA transcripts with 5'-diphosphate. *Journal of Biological Chemistry*. **285**(30), 22911–22918.
57. Fujimura, T., Esteban, R., Esteban, L.M., Wickner, R.B. (1990) Portable encapsidation signal of the L-A double-stranded RNA virus of *S. cerevisiae*. *Cell*. **62**(4), 819–828.
58. 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.
59. Fujimura, T., Ribas, J.C., Makhov, A.M., Wickner, R.B. (1992) Pol of gag-pol fusion protein required for encapsidation of viral RNA of yeast L-A virus. *Nature*. **359**(6397), 746–749.
60. Fujimura, T., Wickner, R.B. (1988) Gene overlap results in a viral protein having an RNA binding domain and a coat protein domain. *Cell*. **55**, 663–671.

61. Gancarz, B.L., Hao, L., He, Q., Newton, M.A., Ahlquist, P. (2011) Systematic identification of novel, essential host genes affecting bromovirus RNA replication. *PLoS ONE*. **6**(8).
62. García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J.M., Francois, J., Nombela, C., Arroyo, J. (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. **279**(15), 15183–95.
63. Gayevskiy, V., Goddard, M.R. (2016) *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces arboricola* reside in North Island native New Zealand forests. *Environmental Microbiology*. **18**(4), 1137–1147.
64. Geuking, M.B., Weber, J., Dewannieux, M., Gorelik, E., Heidmann, T., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., Hangartner, L. (2009) Recombination of retrotransposon and exogenous RNA virus results in nonretroviral cDNA integration. *Science*. **323**(5912), 393–396.
65. Gibson, B., Liti, G. (2015) *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast (Chichester, England)*. **32**(1), 17–27.
66. Gilbert, D.G. (1980) Dispersal of yeasts and bacteria by *Drosophila* in a temperate forest. *Oecologia*. **46**(1), 135–137.
67. Gilbert, L.A., Horlbeck, M.A., Adamson, B., Villalta, J.E., Chen, Y., Whitehead, E.H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H.L., Bassik, M.C., Qi, L.S., Kampmann, M., Weissman, J.S. (2014) Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*. **159**(3), 647–61.
68. Goddard, M.R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R.C., Jun, C. (2010) A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: Evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environmental Microbiology*. **12**(1), 63–73.
69. Goddard, M.R., Greig, D. (2015) *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? *FEMS yeast research*. **15**(3).
70. Gonçalves, P., Valério, E., Correia, C., de Almeida, J.M.G.C.F., Sampaio, J.P. (2011) Evidence for divergent evolution of growth temperature preference in sympatric *Saccharomyces* species. *PloS one*. **6**(6), e20739.
71. Goto, K., Fukuda, H., Kichise, K., Kitano, K., Hara, S. (1991) Cloning and nucleotide sequence of the KHS killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and biological chemistry*. **55**(8), 1953–8.
72. Goto, K., Iwase, T., Kichise, K., Kitano, K., Totuka, A., Obata, T., Hara, S. (1990a) Isolation and properties of a chromosome-dependent khr killer toxin in *saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Biological Chemistry*. **54**(2), 505–509.
73. Goto, K., Iwatuki, Y., Kitano, K., Obata, T., Hara, S. (1990b) Cloning and nucleotide sequence of the KHR killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and biological chemistry*. **54**(4), 979–84.
74. Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*. **29**(7), 644–652.
75. Grant, B.J., Rodrigues, A.P.C., ElSawy, K.M., McCammon, J.A., Caves, L.S.D.

- (2006) Bio3d: An R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics*. **22**(21), 2695–2696.
76. Grybchuk, D., Akopyants, N.S., Kostygov, A.Y., Konovalovas, A., Lye, L.-F., Dobson, D.E., Zangger, H., Fasel, N., Butenko, A., Frolov, A.O., Votýpka, J., d'Avila-Levy, C.M., Kulich, P., Moravcová, J., Plevka, P., Rogozin, I.B., Serva, S., Lukeš, J., Beverley, S.M., Yurchenko, V. (2018) Viral discovery and diversity in trypanosomatid protozoa with a focus on relatives of the human parasite *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **115**(3), E506–E515.
  77. Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F., Sakaguchi, K. (1981) Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *Journal of bacteriology*. **145**(1), 382–90.
  78. Hafren, A., Hofius, D., Ronnholm, G., Sonnewald, U., Makinen, K. (2010) HSP70 and Its Cochaperone CPIP Promote Potyvirus Infection in *Nicotiana benthamiana* by Regulating Viral Coat Protein Functions. *The Plant Cell*. **22**(2), 523–535.
  79. Hayman, G.T., Bolen, P.L. (1991) Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. *Current genetics*. **19**(5), 389–93.
  80. van Hoof, A., Staples, R.R., Baker, R.E., Parker, R. (2000) Function of the ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA. *Molecular and cellular biology*. **20** VN-r(21), 8230–8243.
  81. Horie, M., Honda, T., Suzuki, Y., Kobayashi, Y., Daito, T., Oshida, T., Ikuta, K., Jern, P., Gojobori, T., Coffin, J.M., Tomonaga, K. (2010) Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature*. **463**(7277), 84–87.
  82. Hsu, C.L., Stevens, A. (1993) Yeast cells lacking 5'--&gt;3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. *Molecular and Cellular Biology*. **13**(8), 4826–4835.
  83. Huh, W.-K.K., Falvo, J. V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., K, O.E. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*. **425**(6959), 686–691.
  84. Hurst, L.D. (2002) The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *Trends in genetics : TIG*. **18**(9), 486.
  85. Hyodo, K., Okuno, T. (2014) Host factors used by positive-strand RNA plant viruses for genome replication. *Journal of General Plant Pathology*. **80**(2), 123–135.
  86. Icho, T., Wickner, R.B. (1989) The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *Journal of Biological Chemistry*. **264**(12), 6716–6723.
  87. Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M. (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*. **21**(11), 947–962.
  88. Jiang, Y., Serviène, E., Gal, J., Panavas, T., Nagy, P.D. (2006) Identification of essential host factors affecting tombusvirus RNA replication based on the yeast Tet promoters Hughes Collection. *Journal of virology*. **80**(15), 7394–7404.
  89. Käll, L., Krogh, A., Sonnhammer, E.L.L. (2007) Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*. **35**(SUPPL.2), 429–432.

90. Katoh, K., Standley, D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*. **30**(4), 772–780.
91. Katzourakis, A., Gifford, R.J. (2010) Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS genetics*. **6**(11), e1001191.
92. Konovalovas, A., Serviené, E., Serva, S. (2016) Genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus L-A-28. *Genome Announcements*. **4**(3), 3–4.
93. Kushner, D.B., Lindenbach, B.D., Grdzlishvili, V.Z., Noueir, A.O., Paul, S.M., Ahlquist, P. (2003) Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**(26), 15764–9.
94. Langland, J.O., Cameron, J.M., Heck, M.C., Jancovich, J.K., Jacobs, B.L. (2006) Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses. *Virus research*. **119**(1), 100–10.
95. Libkind, D., Hittinger, C.T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., Sampaio, J.P. (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**(35), 14539–44.
96. Liti, G. (2015) The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. *eLife*. **4**, 1–9.
97. Liti, G., Barton, D.B.H., Louis, E.J. (2006) Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *saccharomyces*. *Genetics*. **174**(2), 839–850.
98. Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I.J., Bergman, C.M., Bensasson, D., O’Kelly, M.J.T., van Oudenaarden, A., Barton, D.B.H., Bailes, E., Nguyen, A.N., Jones, M., Quail, M.A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., Louis, E.J. (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*. **458**(7236), 337–41.
99. Liti, G., Nguyen Ba, A.N., Blythe, M., Müller, C.A., Bergström, A., Cubillos, F.A., Dafnis-Calas, F., Khoshraftar, S., Malla, S., Mehta, N., Siow, C.C., Warringer, J., Moses, A.M., Louis, E.J., Nieduszynski, C.A. (2013) High quality *de novo* sequencing and assembly of the *Saccharomyces arboricolus* genome. *BMC genomics*. **14**(1), 69.
100. 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.
101. Liu, H., Fu, Y., Li, B., Yu, X., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G. (2011) Widespread Horizontal Gene Transfer from Circular Single-stranded DNA Viruses to Eukaryotic Genomes.
102. Lopes, C.A., Barrio, E., Querol, A. (2010) Natural hybrids of *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* share alleles with European wild populations of *Saccharomyces kudriavzevii*: RESEARCH ARTICLE. *FEMS Yeast Research*. **10**(4), 412–421.
103. Lopinski, J.D., Dinman, J.D., Bruenn, J.A. (2000) Kinetics of Ribosomal Pausing during Programmed -1 Translational Frameshifting. *Molecular and Cellular Biology*. **20**(4), 1095–1103.
104. Louis, E.J. (2016) Historical Evolution of Laboratory Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Protocols*. **2016**(7), pdb.top077750.

105. Lukša, J., Ravoitytė, B., Konovalovas, A., Aitmanaitė, L., Butenko, A., Yurchenko, V., Serva, S., Servienė, E. (2017) Different Metabolic Pathways Are Involved in Response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and M Viruses. *Toxins*. **9**(8), 233.
106. Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L. (1997) Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews*. **10**(3), 369–400.
107. Masison, D.C., Blanc, A., Ribas, J.C., Carroll, K., Sonenberg, N., Wickner, R.B. (1995) Decoying the cap- mRNA degradation system by a double-stranded RNA virus and poly(A)- mRNA surveillance by a yeast antiviral system. *Molecular and cellular biology*. **15**(5), 2763–71.
108. 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.
109. Meškauskas, A., Čitavičius, D. (1992) The K2-type killer toxin- and immunity-encoding region from *Saccharomyces cerevisiae*: structure and expression in yeast. *Gene*. **111**, 135–139.
110. Meyerson, N.R., Sawyer, S.L. (2011) Two-stepping through time: Mammals and viruses. *Trends in Microbiology*. **19**(6), 286–294.
111. Miller, S., Krijnse-Locker, J. (2008) Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nature Reviews Microbiology*. **6**(5), 363–374.
112. Mine, A., Takeda, A., Taniguchi, T., Taniguchi, H., Kaido, M., Mise, K., Okuno, T. (2010) Identification and characterization of the 480-kilodalton template-specific RNA-dependent RNA polymerase complex of red clover necrotic mosaic virus. *Journal of virology*. **84**(12), 6070–81.
113. Mitchell, P., Tollervey, D. (2000) Musing on the structural organization of the exosome complex. *Nature Structural Biology*. **7**(10), 843–846.
114. Mnaimneh, S., Davierwala, A.P., Haynes, J., Moffat, J., Peng, W.T., Zhang, W., Yang, X., Pootoolal, J., Chua, G., Lopez, A., Trochesset, M., Morse, D., Krogan, N.J., Hiley, S.L., Li, Z., Morris, Q., Grigull, J., Mitsakakis, N., Roberts, C.J., Greenblatt, J.F., Boone, C., Kaiser, C.A., Andrews, B.J., Hughes, T.R. (2004) Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell*. **118**(1), 31–44.
115. Morais, P.B., Hagler, A.N., Rosa, C.A., Mendonca-Hagler, L.C., Klaczko, L.B. (1992) Yeasts associated with *Drosophila* in tropical forests of Rio de Janeiro, Brazil. *Canadian journal of microbiology*. **38**(11), 1150–5.
116. Muller, L.A.H., Lucas, J.E., Georgianna, D.R., McCusker, J.H. (2011) Genome-wide association analysis of clinical vs. nonclinical origin provides insights into *Saccharomyces cerevisiae* pathogenesis. *Molecular Ecology*. **20**(19), 4085–4097.
117. Nagy, P.D., Pogany, J. (2012) The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nature Reviews Microbiology*. **10**(2), 137–149.
118. Naitow, H., Tang, J., Canady, M., Wickner, R.B., Johnson, J.E. (2002) L-a virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mrna decapping mechanism. *Nature Structural Biology*. **9**(10), 725–728.
119. Naumov, G.I., James, S.A., Naumova, E.S., Louis, E.J., Roberts, I.N. (2000) Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**(5), 1931–1942.

120. Naumov, G.I., Naumova, E.S., Masneuf-Pomarède, I. (2010) Genetic identification of new biological species *Saccharomyces arboricolus* Wang et Bai. *Antonie van Leeuwenhoek*. **98**(1), 1–7.
121. Naumova, G., Naumova, T. (1973) Comparative genetics of yeasts. XIII, Comparative study of *Saccharomycetes*-killers from different collections. *Genetika*. **9**, 140–145.
122. Nemeroff, M.E., Bruenn, J.A. (1987) Initiation by the yeast viral transcriptase in vitro. *Journal of Biological Chemistry*. **262**(14), 6785–6787.
123. Nguyen, H.-V., Gaillardin, C. (2005) Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species. *FEMS yeast research*. **5**(4–5), 471–83.
124. Nguyen, H.-V., Legras, J.-L., Neuvéglise, C., Gaillardin, C. (2011) Deciphering the Hybridisation History Leading to the Lager Lineage Based on the Mosaic Genomes of *Saccharomyces bayanus* Strains NBRC1948 and CBS380T L. N. Rusche, sud. *PLoS ONE*. **6**(10), e25821.
125. Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., Von Haeseler, A., Minh, B.Q. (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. **32**(1), 268–274.
126. Nishikiori, M., Dohi, K., Mori, M., Meshi, T., Naito, S., Ishikawa, M. (2006) Membrane-bound tomato mosaic virus replication proteins participate in RNA synthesis and are associated with host proteins in a pattern distinct from those that are not membrane bound. *Journal of virology*. **80**(17), 8459–68.
127. Ohtake, Y., Wickner, R.B. (1995) Yeast virus propagation depends critically on free 60S ribosomal subunit concentration. *Molecular and Cellular Biology*. **15**(5), 2772–2781.
128. Panavas, T., Serviène, E., Brasher, J., Nagy, P.D. (2005) Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**(20), 7326–7331.
129. Park, C.M. -M, Bruenn, J.A., Ganesa, C., Flurkey, W.F., Bozarth, R.F., Koltin, Y. (1994) Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin KP4. *Molecular Microbiology*. **11**(1), 155–164.
130. Parker, R. (2012) RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **191**(3), 671–702.
131. Peris, D., Sylvester, K., Libkind, D., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., Alexander, W.G., Hittinger, C.T. (2014) Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. *Molecular Ecology*. **23**(8), 2031–2045.
132. Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freel, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, J., Istace, B., Lebrigand, K., Barbry, P., Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., Liti, G., Schacherer, J. (2018) Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*. **556**(7701), 339–344.
133. Petranovic, D., Tyo, K., Vemuri, G.N., Nielsen, J. (2010) Prospects of yeast systems biology for human health: integrating lipid, protein and energy metabolism. *FEMS yeast research*. **10**(8), 1046–59.
134. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory



- research and analysis. *Journal of computational chemistry*. **25**(13), 1605–12.
135. Pfeiffer, P., Radler, F. (1984) Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. *Archives of microbiology*. **137**(4), 357–61.
  136. Polevoda, B., Sherman, F. (2001) NatC N $\alpha$ -terminal Acetyltransferase of Yeast Contains Three Subunits, Mak3p, Mak10p, and Mak31p. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(23), 20154–20159.
  137. Potgieter, A.C., Page, N.A., Liebenberg, J., Wright, I.M., Landt, O., van Dijk, A.A. (2009) Improved strategies for sequence-independent amplification and sequencing of viral double-stranded RNA genomes. *Journal of General Virology*. **90**(6), 1423–1432.
  138. 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).
  139. Ramírez, M., Velázquez, R., López-Piñero, 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*. **9**(9), 9090292.
  140. Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., López-Piñero, A., Ribas, J.C. (2015) A new wine *Torulaspora delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. *Frontiers in Microbiology*. **6**(SEP), 1–12.
  141. Rawlinson, S.M., Moseley, G.W. (2015) The nucleolar interface of RNA viruses. *Cellular microbiology*. **17**(8), 1108–20.
  142. Reuter, M., Bell, G., Greig, D. (2007) Increased outbreeding in yeast in response to dispersal by an insect vector. *Current Biology*. **17**(3), 81–83.
  143. Ribas, J., Fujimura, T., Wickner, R.B. (1994a) A cryptic RNA-binding domain in the Pol region of the L-A double-stranded RNA virus Gag-Pol fusion protein. *Journal of virology*. **68**(9), 6014–20.
  144. Ribas, J., Fujimura, T., Wickner, R.B. (1994b) Essential RNA binding and packaging domains of the Gag-Pol fusion protein of the L-A double-stranded RNA virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. **269**(45), 28420–28428.
  145. Ribas, J.C., Wickner, R.B. (1998) The Gag domain of the Gag-Pol fusion protein directs incorporation into the L-A double-stranded RNA viral particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. **273**(15), 9306–9311.
  146. Ridley, S.P., Sommer, S.S., Wickner, R.B. (1984) Superkiller mutations in *Saccharomyces cerevisiae* suppress exclusion of M2 double-stranded RNA by L-A-HN and confer cold sensitivity in the presence of M and L-A-HN. *Molecular and cellular biology*. **4**(4), 761–70.
  147. Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., Séraphin, B. (1999) IN THE LABORATORY A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **17**(October), 7–9.
  148. Rinaldi, T., Dallabona, C., Ferrero, I., Frontali, L., Bolotin-Fukuhara, M. (2010) Mitochondrial diseases and the role of the yeast models. *FEMS yeast research*. **10**(8), 1006–22.
  149. Rodríguez-Cousiño, N., Esteban, R. (2017) Relationships and evolution of doublestranded RNA totiviruses of yeasts inferred from analysis of L-A-2 and L-BC variants in wine yeast strain populations. *Applied and Environmental Microbiology*.

83(4).

150. Rodríguez-Cousiño, N., Gómez, P., Esteban, R. (2013) L-A-lus, a new variant of the L-A totivirus found in wine yeasts with klus killer toxin-encoding mlus double-stranded RNA: Possible role of killer toxin-encoding satellite RNAs in the evolution of their helper viruses. *Applied and Environmental Microbiology*. **79**(15), 4661–4674.
151. 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), 9–11.
152. 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), 1822–1832.
153. Romero-Brey, I., Bartenschlager, R. (2016) The Favorite Intracellular Niche for Viral Replication and Assembly. *Viruses*. **8**.
154. 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), 1–27.
155. Sampaio, J.P., Gonçalves, P. (2008) Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Applied and environmental microbiology*. **74**(7), 2144–52.
156. Scannell, D.R., Zill, O.A., Rokas, A., Payen, C., Dunham, M.J., Eisen, M.B., Rine, J., Johnston, M., Hittinger, C.T. (2011) The Awesome Power of Yeast Evolutionary Genetics: New Genome Sequences and Strain Resources for the *Saccharomyces sensu stricto* Genus. *G3 & Genes|Genomes|Genetics*. **1**(1), 11–25.
157. Schmid, M., Jaedicke, A., Du, T.G., Jansen, R.P. (2006) Coordination of Endoplasmic Reticulum and mRNA Localization to the Yeast Bud. *Current Biology*. **16**(15), 1538–1543.
158. Schmitt, M.J., Breinig, F. (2002) The viral killer system in yeast: From molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*. **26**(3), 257–276.
159. Schmitt, M.J., Breinig, F. (2006) Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature reviews. Microbiology*. **4**(3), 212–221.
160. Schmitt, M.J., Neuhausen, F. (1994) Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of Virology*. **68**(3), 1765–1772.
161. Schmitt, M.J., Poravou, O., Trenz, K., Rehfeldt, K. (1997) Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-*Candida* activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. *Journal of virology*. **71**(11), 8852–5.
162. Schmitt, M.J., Tipper, D.J. (1990) K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. **10**(9), 4807–4815.
163. Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. **9**(7), 671–5.
164. Serva, S., Nagy, P.D. (2006) Proteomics analysis of the tombusvirus replicase: Hsp70 molecular chaperone is associated with the replicase and enhances viral RNA replication. *Journal of virology*. **80**(5), 2162–2169.

165. Serviène, E., Jiang, Y., Cheng, C.-P., Baker, J., Nagy, P.D. (2006) Screening of the yeast yTHC collection identifies essential host factors affecting tombusvirus RNA recombination. *Journal of virology*. **80**(3), 1231–41.
166. Serviène, E., Shapka, N., Cheng, C.P., Panavas, T., Phuangrat, B., Baker, J., Nagy, P.D. (2005) Genome-wide screen identifies host genes affecting viral RNA recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**(30), 10545–10550.
167. Shah Nawaz-ul-Rehman, M., Martinez-Ochoa, N., Pascal, H., Sasvari, Z., Herbst, C., Xu, K., Baker, J., Sharma, M., Herbst, A., Nagy, P.D. (2012) Proteome-wide overexpression of host proteins for identification of factors affecting tombusvirus RNA replication: an inhibitory role of protein kinase C. *Journal of virology*. **86**(17), 9384–95.
168. Sicard, D., Legras, J.L. (2011) Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus - Biologies*. **334**(3), 229–236.
169. Sniegowski, P.D., Dombrowski, P.G., Fingerman, E. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS yeast research*. **1**(4), 299–306.
170. Sommer, S.S., Wickner, R.B. (1982) Yeast L dsRNA consists of at least three distinct RNAs; evidence that the non-Mendelian genes [HOK], [NEX] and [EXL] are on one of these dsRNAs. *Cell*. **31**(2 Pt 1), 429–41.
171. Stefanini, I., Dapporto, L. (2012) Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**(33), 13398–13403.
172. Strobe, P.K., Skelly, D.A., Kozmin, S.G., Mahadevan, G., Stone, E.A., Magwene, P.M., Dietrich, F.S., McCusker, J.H. (2015) The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen. *Genome Research*. **125**(5), 762–774.
173. Sweeney, J.Y., Kuehne, H.A., Sniegowski, P.D. (2004) Sympatric natural *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* populations have different thermal growth profiles. *FEMS Yeast Research*. **4**(4–5), 521–525.
174. Takeshita, D., Tomita, K. (2010) Assembly of Q $\beta$  viral RNA polymerase with host translational elongation factors EF-Tu and -Ts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**(36), 15733–8.
175. Takeshita, D., Tomita, K. (2012) Molecular basis for RNA polymerization by Q $\beta$  replicase. *Nature Structural and Molecular Biology*. **19**(2), 229–238.
176. Tang, J., Naitow, H., Gardner, N.A., Kolesar, A., Tang, L., Wickner, R.B., Johnson, J.E. (2005) The structural basis of recognition and removal of cellular mRNA 7-methyl G „caps“ by a viral capsid protein: a unique viral response to host defense. *Journal of molecular recognition : JMR*. **18**(2), 158–68.
177. Taylor, D.J., Ballinger, M.J., Zhan, J.J., Hanzly, L.E., Bruenn, J.A. (2014) Evidence that ebolaviruses and cuevaviruses have been diverging from marburgviruses since the Miocene. *PeerJ*. **2**, e556.
178. Taylor, D.J., Bruenn, J. (2009) The evolution of novel fungal genes from non-retroviral RNA viruses. *BMC Biology*. **7**(1), 1–11.
179. Tercero, J.C., Dinman, J.D., Wickner, R.B. (1993) Yeast MAK3 N-acetyltransferase recognizes the N-terminal four amino acids of the major coat protein (gag) of the L-A

- double-stranded RNA virus. *Journal of Bacteriology*. **175**(10), 3192–3194.
180. Tercero, J.C., Wickner, R.B. (1992) MAK3 encodes an N-acetyltransferase whose modification of the L-A gag NH<sub>2</sub>terminus is necessary for virus particle assembly. *Journal of Biological Chemistry*. **267**(28), 20277–20281.
  181. Toh, E.A., Guerry, P., Wickner, R.B. (1978) Chromosomal superkiller mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. **136**(3), 1002–1007.
  182. Tomita, K. (2014) Structures and functions of Q $\beta$  replicase: Translation factors beyond protein synthesis. *International Journal of Molecular Sciences*. **15**(9), 15552–15570.
  183. Wang, Q.M., Liu, W.Q., Liti, G., Wang, S.A., Bai, F.Y. (2012) Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Molecular Ecology*. **21**(22), 5404–5417.
  184. Wickner, R.B. (1996) Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews*. **60**(1), 250–65.
  185. Wickner, R.B., Fujimura, T., Esteban, R. (2013) Viruses and Prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Virus Research*. **86**, 1–36.
  186. Wickner, R.B., Kryndushkin, D., Shewmaker, F., McGlinchey, R., Edskes, H.K. (2018) Study of Amyloids Using Yeast. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. **1779**, 313–339.
  187. Wilke, C.O., Sawyer, S.L. (2016) At the mercy of viruses. *eLife*. **5**.
  188. Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Véronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T.R., Wysocki, R., Yen, G.S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M., Davis, R.W. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science (New York, N.Y.)*. **285**(5429), 901–6.
  189. Worsham, P.L., Bolen, P.L. (1990) Killer toxin production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. *Current genetics*. **18**(1), 77–80.
  190. Yang, M., Jarrett, S.G., Craven, R., Kaetzl, D.M. (2009) YNK1, the yeast homolog of human metastasis suppressor NM23, is required for repair of UV radiation- and etoposide-induced DNA damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **660**(1–2), 74–78.

## PRIEDAI

Priedas 1. Baltymai galimai sąveikaujantys su L-A virusu.

Baltymo pavadinimas	Dydis (kDa)	Aprašas	Sąveikos su virusu grupė	Geno iškrytos poveikis viruso replikacijai
SNC2	12.95	v-SNARE baltymas	Su Gag baltymu	Pokytis nestebimas
MBF1	16.39	RNR polimerazės II transkripcijos koaktyvatorius	Su Gag baltymu	Replikacija nevyksta
ARF2	20.64	Ras šeimos GTPazė, dalyvaujanti pernašos pūslelių formavimesi	Su Gag baltymu	Pokytis nestebimas
PHO88	21.12	Baltymas dalyvaujantis baltymų nukreipime į endoplazminį tinklą	Su Gag baltymu	Pokytis nestebimas
YPT10	21.82	Rab baltymų šeimai priskiriamas, GTP surišantis baltymas	Su Gag baltymu	Replikacija nevyksta
YET1	23.44	Nežinomos funkcijos baltymas. Lokalizuojasi endoplazminiame tinkle šalia ribosomų, žmogaus BAP31 baltymo homologas	Su Gag baltymu	Replikacija nevyksta
RCR1	23.87	Endoplazminio tinklo membranos baltymas	Su Gag baltymu	Replikacija nevyksta
RSR1	30.37	Ras superšeimai priskiriamas GTP surišantis baltymas	Su Gag baltymu	Pokytis nestebimas
SRP40	40.99	Branduolėlyje aptinkamas su RNR sąveikaujantis baltymas, struktūriškai panašus į žiurkių Nopp140 baltymą	Su Gag baltymu	Replikacija nevyksta
SSH1	53.28	Baltymas, dalyvaujantis baltymų translokacijoje	Su Gag baltymu	Replikacija nevyksta
HXT5	66.21	Heksozės transporteris	Su Gag baltymu	Pokytis nestebimas
TCB3	170.97	Endoplazminio tinklo membranos baltymas	Su Gag baltymu	Replikacija nevyksta
YLR361C-A	11.04	Nežinomos funkcijos baltymas	Su Gag baltymo C-galu	Replikacija nevyksta
SER33	51.16	3-fosfoglicerato dehidrogenazė ir alfa-ketogluterato reduktazė	Su Gag baltymo C-galu	Replikacija nevyksta
HEF3	115.80	Tik grybuose aptinkamas transliacijos elongacijos faktorius EF-3	Su Gag baltymo C-galu	Replikacija nevyksta
RPL22B	13.82	60S ribosomos subvieneto baltymas	Su nukleokapside	Pokytis nestebimas

RPL26B	14.23	60S ribosomos subvieneto baltymas	Su nukleokapside	Replikacija nevyksta
YNK1	17.16	Nukleozid-difosfato kinazė	Su nukleokapside	Replikacijos slopinimas
NHP10	23.84	INO80 komplekso baltymas	Su nukleokapside	Pokytis nestebimas
GSP2	24.97	GTP surišantis baltymas. Dalyvuoja koordinuojant branduolio organizaciją; dalyvuoja RNR molekulių brendime ir transportavime	Su nukleokapside	Pokytis nestebimas
CAT5	26.04	Mitochondrijos vidinės membranos baltymas, pasižymintis monoooksigenazės aktyvumu, dalyvuoja ubikinono biosintezėje	Su nukleokapside	Replikacijos slopinimas
COQ3	36.31	O-metiltransferazė	Su nukleokapside	Pokytis nestebimas
HSP42	42.79	Mažas karščio šoko baltymas, turintis šaperono aktyvumą	Su nukleokapside	Pokytis nestebimas
POL4	67.48	Nuo DNR priklausoma DNR polimerazė, dalyvaujanti dvigrandininių DNR trūkių reparacijoje, vykstant nehomoginiam galų sujungimu	Su nukleokapside	Pokytis nestebimas
SCS2	26.91	Endoplazminio tinklo membranos baltymas	Sąveika su KDX1 baltymu	Pokytis nestebimas
SSO1	33.09	t-SNARE baltymas	Sąveika su KDX1	Replikacijos slopinimas
RHO5	36.80	Ras baltymų šeimai priskiriama GTPazė	Sąveika su KDX1	Replikacijos slopinimas
XRN1	175.45	5'→3' egzozonukleazė	Žinomas geno delecijos poveikis L-A viruso replikacijai	Replikacijos stimuliavimas
MAK3	20.45	Katalitinis NatC N-galo baltymų acetiltransferazės subvienetas	Žinomas geno delecijos poveikis L-A viruso replikacijai	Replikacijos slopinimas
POR1	30.42	Porinas, aptinkamas mitochondrijose	Žinomas geno delecijos poveikis L-A viruso replikacijai	Replikacijos stimuliavimas

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui prof. dr. Sauliui Servai už pasiūlytą disertacinio darbo temą, pasitikėjimą ir pagalbą ruošiant šią disertaciją bei turiningas mokslines diskusijas. Dėkoju visiems kolegoms iš laboratorijos už jų geranoriškus pasiūlymus bei malonų bendradarbiavimą.

Esu dėkingas dr. Elenai Servienei už suteiktus mielių kamienus ir plazmides, už pateiktas pastabas ir patarimus. Taip pat noriu padėkoti GTC Genetikos laboratorijos kolektyvui už produktyvų bendradarbiavimą.

Esu dėkingas prof. dr. Editai Sužiedelienei bei visai Biochemijos ir Molekulinės biologijos katedrai už visokeriopą pagalbą atliekant eksperimentus.

Esu dėkingas Dr. Algirdui Kaupiniui ir Dr. Mindaugui Valiui už proteominę analizę.

Esu dėkingas prof. dr. Kęstučiui Sužiedeliui už pasidalinimą mCherry baltymą koduojančia plazmide. Dėkoju dr. Vyacheslav Yurchenko ir dr. Danyil Grybchuk už vertingas diskusijas bei galimybę pademonstruoti, kad šio darbo metu išvystyta dgRNR klonavimo strategija gali būti sėkmingai pritaikyta ne tik mielių dgRNR virusų tyrimuose.

Taip pat dėkoju dr. Laurai Kalinienei ir dr. Eglei Lastauskienei už kritišką šios disertacijos skaitymą ir komentarus.

Esu dėkingas savo žmonai, kurios kantrybė ir supratimas padėjo ruošiant šią disertaciją.

Aleksandras Konovalovas,  
Vilnius, 2018