



**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

**EMILIJA VASILIŪNAITĖ**

**Poliomos virusų paieška, genomų sekų nustatymas ir analizė Europoje sugautų  
graužikų mėginiuose**

Genetikos magistro studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas VU GMC

Biotechnologijos institute

Eukariotų genų inžinerijos skyriuje

Vadovė

Habil. Dr. Alma Gedvilaitė

Konsultantas

Dr. Albertas Timinskas



Vilnius, 2020

## Turinys

<b>SANTRUMPŲ SARAŠAS</b> .....	<b>4</b>
<b>IVADAS</b> .....	<b>7</b>
<b>1 LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....	<b>9</b>
1.1 Poliomos virusai .....	9
1.2 Poliomos virusų taksonomija .....	11
1.3 Naujų poliomos virusų paieška .....	14
1.3.1 Poliomos virusų paieškos ir tyrimų svarba .....	14
1.3.2 Poliomos virusų paieškos metodai .....	17
1.4 Poliomos virusų genomai.....	21
1.4.1 Poliomos virusų geno struktūra .....	21
1.4.2 PyV geno papildomi ir alternatyvūs skaitymo rėmeliai bei splaisingo variantai.....	23
1.5 Poliomos virusų infekcinis ciklas.....	25
1.5.1 Virus patekimas į ląstelę .....	25
1.5.2 Transkripcija, replikacija ir viriono susirinkimas .....	27
1.6 Poliomos virusų viriono struktūra .....	28
1.7 Žmogaus poliomos virusai .....	29
1.8 Poliomos virusai ir ligos.....	31
1.9 Poliomos virusų zoonozės .....	34
1.10 Poliomos virusų kilmė ir filogenezė.....	35
1.11 Poliomos virusų ir jų šeimininkų koevoliucija.....	38
1.12 Graužikai ir jų poliomos virusai .....	40
<b>2 MEDŽIAGOS IR METODAI</b> .....	<b>43</b>
2.1 Medžiagos .....	43
2.1.1 Tirpalai DNR skyrimui ir gryninimui .....	43
2.1.2 Reagentai DNR elektroforezei .....	43
2.1.3 Reagentai fermentinėms reakcijoms .....	43
2.1.4 Tirpalai <i>E. coli</i> bakterijų ir <i>S. cerevisiae</i> mielių kompetentinių ląstelių paruošimui...	43
2.1.5 Tirpalai baltymų skyrimui iš mielių ląstelių ir jų gryninimui .....	44
2.1.6 Reagentai baltymų elektroforezei poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis .	44
2.1.7 Molekulinės masės standartai .....	45
2.1.8 Bakterijų ir mielių kamienai .....	45
2.1.9 Plazmidiniai vektoriai .....	45
2.1.10 Naudoti oligonukleotidai.....	45
2.1.11 Bakterijų ir mielių auginimo terpės .....	47
2.1.12 Virusinės DNR išskyrimui naudoti tirpalai.....	47
2.1.13 Reagentų gamintojai .....	48
2.2 Laboratoriniai metodai .....	50
2.2.1 Kompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių paruošimas .....	50
2.2.2 Kompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių transformacija.....	50
2.2.3 Plazmidinės DNR išskyrimas iš <i>E. coli</i> ląstelių.....	50
2.2.4 Plazmidinės DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis .....	51
2.2.5 Lipnių DNR fragmentų galų bukinimas.....	51

2.2.6	DNR susiuvimas .....	52
2.2.7	DNR koncentracijos ir nukleotidų sekos nustatymas .....	52
2.2.8	DNR elektroforezė agarozės gelyje .....	52
2.2.9	DNR deproteinizavimas fenolio-chloroformo-izoamilo alkoholio mišiniu.....	52
2.2.10	DNR nusodinimas .....	53
2.2.11	DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio .....	53
2.2.12	Virusinės DNR išskyrimas.....	53
2.2.13	Virusinės DNR nusodinimas ir padauginimas .....	54
2.2.14	Polimerazės grandininė reakcija .....	55
2.2.15	Mielių auginimas ir heterologinių baltymų sintezės indukcija .....	56
2.2.16	Heterologinių baltymų sintezę vykdančių mielių klonų atrinkimas .....	56
2.2.17	Heterologinių baltymų išskyrimas iš mielių ląstelių ir gryninimas .....	57
2.2.18	Baltymų dializė .....	58
2.2.19	Baltymų NDS-PAGE ir poliakrilamidinio gelio dažymas.....	58
2.2.20	Į virusus panašių dalelių stebėjimas elektroniniu mikroskopu .....	58
2.2.21	Buferinių tirpalų, terpių, laboratorinių priemonių sterilinimas.....	58
2.3	Bioinformatiniai ir statistiniai metodai.....	59
2.3.1	Poliomos virusams specifinių heksanukleotidinių pradmenų kūrimas .....	59
2.3.2	Nepadaugintos, Phi29 ir EquiPhi29 padaugintos DNR panaudojimo PyV paieškai efektyvumo palyginimas dviejų proporcijų z testu.....	60
2.3.3	PyV T antigenų splaisingo vietų nustatymas .....	61
2.3.4	Sekų palyginimai ir filogenetinės analizės.....	61
2.3.5	Viruso ir šeimininko koevoliucijos analizė JANE programa.....	61
<b>3</b>	<b>REZULTATAI.....</b>	<b>63</b>
3.1	Poliomos virusams specifinių heksanukleotidinių pradmenų kūrimas ir jų efektyvumo tikrinimas.....	63
3.2	Poliomos virusų paieška graužikų mėginiuose .....	66
3.2.1	Poliomos virusų paieška <i>Microtus</i> genties pelėnų inkstų mėginiuose.....	66
3.2.2	Poliomos virusų paieška <i>Apodemus</i> genties pelių mėginiuose .....	73
3.2.3	Poliomos virusų paieška <i>Rattus</i> genties žiurkių mėginiuose .....	74
3.3	Žiurkių RnorPyV1 ir RatPyV2 VP1 sintezė mielėse ir VPD gryninimas.....	79
<b>4</b>	<b>REZULTATŲ APTARIMAS .....</b>	<b>81</b>
	<b>IŠVADOS.....</b>	<b>87</b>
	<b>SANTRAUKA .....</b>	<b>88</b>
	<b>SUMMARY .....</b>	<b>89</b>
	<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS .....</b>	<b>90</b>
	<b>PRIEDAI.....</b>	<b>101</b>
	<b>PADĖKA.....</b>	<b>117</b>

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- AflaPyV1 – *Apodemus flavicollis* poliomos virusas;
- ALT – alternatyvus T antigenas (angl. *alternative T-antigen*);
- ALTO – alternatyvaus T antigeno atviras skaitymo rėmelis (angl. *alternative T open reading frame*);
- APyV – paukščių poliomos virusas (angl. *Aves polyomavirus 1*);
- aps./min – apsisukimai per minutę;
- ar. – aminorūgštis;
- ASR – atviras skaitymo rėmelis (angl. *open reading frame, ORF*);
- BKPyV – BK žmogaus poliomos virusas (angl. *BK polyomavirus; Human polyomavirus 1*);
- CsCl – cezio chloridas;
- CVPyV – paprastojo pelėno poliomos virusas 1 (angl. *common vole polyomavirus; Microtus arvalis polyomavirus 1*);
- dg – dvigrandinė (DNR, RNR);
- DNRazė – deoksiribonukleazė;
- dNTP – deoksiribonukleozidtrifosfatai;
- DTT – ditionitritolis;
- EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis;
- EGIS – Eukariotų genų inžinerijos skyrius (Biotechnologijos institute, Gyvybės mokslų centre);
- ET – endoplazminis tinklas;
- HaPyV – žiurkėno poliomos virusas (angl. *Hamster polyomavirus; Mesocricetus auratus polyomavirus 1*);
- HPyV 6, 7, 9, 10– šeštas, septintas, devintas, dešimtas, dvyliktas žmogaus poliomos virusai (angl. *human polyomaviruses 6, 7, 9, 10*);
- Hsp70 – 70 kDa karščio šoko baltymas (angl. *70 kilodalton heat shock protein*);
- ICTV – Tarptautinis Virusų Taksonomijos Komitetas (angl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*);
- JCPyV – JC žmogaus poliomos virusas (angl. *John Cunningham polyomavirus; Human polyomavirus 2*);
- kDa – kilodaltonas;
- KES – krūtinės ertmės skystis;
- KIPyV – Karolinskos Instituto žmogaus poliomos virusas (angl. *Karolinska Institute polyomavirus; Human polyomavirus 3*);
- LB – Luria-Bertani mitybinė terpė;

LCDV – žuvų virusinė limfocistinę ligą sukeliantis virusas (angl. *iridovirus lymphocystis disease virus*);

LIPyV – Liono IARC žmogaus poliomos virusas (angl. *Lyon IARC polyomavirus; Human polyomavirus 14*);

LTag – didysis T (vėžinis) antigenas (angl. *large tumour antigen*);

MCPyV – žmogaus poliomos virusas (angl. *Merkel cell polyomavirus; Human polyomavirus 5*);

ME – minimalios evoliucijos (filogenetinio medžio kūrimo algoritmas) (angl. *minimum evolution*);

MHC I – I klasės didysis suderinamumo kompleksas (angl. *major histocompatibility complex*);

MPyV – pelių poliomos virusas (angl. *Mus musculus polyomavirus 1*);

MPtV – pelių pneumotropinis virusas (angl. *mouse pneumotropic virus; Mus musculus polyomavirus 2*);

mTag – vidurinis T antigenas (angl. *middle tumour antigen*);

MWPyV – Malavio žmogaus poliomos virusas (angl. *Malawi polyomavirus; Human polyomavirus 10*);

NANA –N-acetilneuramininė (sialo) rūgštis;

NCBI – The National Center for Biotechnology Information duomenų bazė;

NDS – natrio dodecilsulfatas;

NH<sub>4</sub>Ac – amonio acetatas;

NJ – kaimynų sujungimo algoritmas (angl. *neighbor-joining*);

NJPyV – Niu Džersio žmogaus poliomos virusas (angl. *New Jersey polyomavirus; Human polyomavirus 13*);

NKKR – nekoduojantis kontrolės regionas (angl. *non-coding control region, NCCR*);

NLS – nukreipimo į branduolį seka (angl. *nuclear localization signal, NLS*);

OBD – prie Ori besijungiantis motyvas (angl. *origin binding domain*)

Ori – replikacijos iniciacijos seka (angl. *origin of replication*);

PEG – polietilenglikolis;

PyV – poliomos virusas (-ai);

PML – progresyvi daugiažidininė leukoencefalopatija (angl. *progressive multifocal leukoencephalopathy*);

PMSF – fenilmetansulfonilfluoridas;

PP2A – baltymų fosfatazė 2A (angl. *Protein phosphatase 2A*);

RatPyV2 – *Rattus norvegicus* poliomos virusas 2;

REazė – restrikcijos endonukleazė;

RnorPyV1 – *Rattus norvegicus* poliomos virusas 1;

RNRazė – ribonukleazė;

sTag – mažasis T antigenas (angl. *small tumour antigen*);

STLPyV – Sent Luiso žmogaus poliomos virusas (angl. *St. Louis polyomavirus*; *Human polyomavirus 11*);

SV40 – beždžionių poliomos virusas (angl. *Simian vacuolating virus 40*; *Macaca mulatta polyomavirus 1*);

TAE – Tris-acetato-EDTA buferinis tirpalas;

TEMED – N, N, N', N' –tetrametilendiaminas;

TMB – 3, 3', 5, 5' –tetrametilbenzidinas;

Tris – tris(hidroksimetil)aminometanas;

TSPyV – trichodysplasia spinulosa žmogaus poliomos virusas (angl. *trichodysplasia spinulosa – associated polyomavirus*; *Human polyomavirus 8*);

TV – transkripcijos veiksnys;

UV – ultravioletas;

vg – viengrandinė (DNR, RNR);

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas;

VP1 – pagrindinis struktūrinis PyV kapsidės baltymas (angl. *viral protein-1*);

VP2, VP3 – antraeiliai poliomos virusų kapsidės baltymai (angl. *viral protein-2,3*);

VPD – į virusus panašios dalelės (angl. *virus-like particle(s)*, *VLP(s)*);

WUPyV – Vašingtono universiteto žmogaus poliomos virusas (angl. *Washington University polyomavirus*, *Human polyomavirus 4*);

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas;

ŽPyV – žmogaus poliomos virusas (-ai) (angl. *human polyomavirus(es)* – *HPyV(s)*).

## IVADAS

Manoma, kad šiuo metu žinomi virusai sudaro vos 0,005 % tikros virusų įvairovės (Geoghegan ir Holmes, 2017). Vis dėlto, net ir tokia maža ištirtų virusų dalis yra susijusi su didele praėjusio amžiaus biologijos ir medicinos mokslų pažangos dalimi, todėl sunku net įsivaizduoti, kokie atradimai dar laukia toliau tyrinėjant virusų pasaulį (McGrath ir kt., 2004). Virusų paieškai ir analizei taikomi įvairūs metodai, nuo auginimo ląstelių kultūrose iki naujos kartos sekoskaitos, priklausomai nuo tiriamo viruso savybių ir tyrimo tikslų (Conceição-Neto ir kt., 2015). Skačiuojama, kad daugiau nei 70 % visų žmones infekuojančių virusų yra zoonozinės kilmės, o didžiausi zoonozinių virusų rezervuarai – šikšnosparniai, primatai ir graužikai. Zoonoziniai virusai sukėlė daug didelių pastarojo meto epidemijų – gripo, ŽIV, koronavirusų, prognozuojama, kad tokių epidemijų bus dar ne viena (Olival ir kt., 2017). Tai dar viena priežastis tirti virusų įvairovę – didesnis informacijos apie egzistuojančius virusus kiekis ir virusų paplitimo bei evoliuciniai tyrimai zoonozes pernešančiuose gyvūnuose gali padėti nuspėti zoonozinių epidemijų įvykius ir gal net užkirsti jiems kelią.

Poliomos virusai (PyV) yra maži, neturintys apvalkalėlio dvigrandinės DNR virusai, infekuojantys žinduolius, paukščius ir žuvis. XX a. antroje pusėje PyV, ypač SV40, smarkiai prisidėjo prie molekulinės biologijos ir genų inžinerijos vystymosi. Šiuo metu daugiausiai dėmesio skiriama PyV žmonėms sukeliama patologijų tyrimams, PyV siejami su vėžiniais susirgimais, inkstų, odos, nervų sistemos, kvėpavimo takų ligomis, nors jų pasireiškimas paprastai stebimas tik imuniteto sutrikimais pasižyminčiuose individuose. Paprastai poliomos virusai evoliucionuoja lėtai, panašiu greičiu kaip ir jų šeimininkai, ir geba šeimininką keisti tik retais atvejais, tad zoonozė PyV mažai būdinga. Šiuo metu žinomi du PyV zoonozės atvejai – beždžionių SV40 virusas ir kirstukų *Sorex araneus* PyV gebėjo paplisti žmonių populiacijose.

Šiuo metu yra patvirtinta virš 100 PyV rūšių, iš jų 88 infekuoja žinduolius ir tik 9 – graužikus, t. y. šiuo metu graužikų, sudarančių 40 % visos žinduolių įvairovės, PyV įvairovė yra menkai reprezentuota. Graužikai yra įdomus ir patogus tyrimų objektas – jie pasižymi gausa ir įvairove, yra plačiai paplitę, be to, yra daugybės zoonozių šaltinis. Graužikų PyV rūšių ir/arba populiacijų tyrimai gali padėti daugiau sužinoti apie PyV evoliuciją ir ją lemiančius kodivergencijos su šeimininku bei šeimininko keitimo įvykius, todėl šio tyrimo metu buvo atliekama Europoje sugautų pelių, pelėnų ir žiurkių PyV paieška. Kadangi PyV DNR tiriamuose mėginiuose yra labai mažai, dažniausiai vienas iš PyV paieškos etapų yra mėginių DNR padauginimas grandinės išstūmimo metodu, naudojant Phi29 polimerazę. Šis metodas leidžia praturtinti mėginį PyV DNR, tačiau atsitiktinės reakcijos metu padauginama ne tik PyV, bet ir visa kita mėginyje esanti DNR,

todėl šio tyrimo metu buvo mėginama padidinti PyV DNR praturtinimo efektyvumą jos padauginimo Phi29 polimeraze metu.

**Darbo tikslas:**

Atlikti poliomos virusų paiešką *Microtus*, *Apodemus* ir *Rattus* genčių graužikų mėginiuose, nustatyti aptiktų PyV genomų sekas ir jas išanalizuoti.

**Uždaviniai:**

1. Sukurti PyV specifinius heksanukleotidinius pradmenis PyV DNR kiekio praturtinimo efektyvumui padidinti jos padauginimo Phi29 polimeraze metu ir ištirti jų efektyvumą.
2. Atlikti poliomos virusų paiešką *Microtus* genties pelėnų mėginiuose, nustatyti ir išanalizuoti aptiktų PyV genomų sekas ir atlikti tarppopuliacinę filogenetinę analizę.
3. Atlikti poliomos virusų paiešką *Apodemus* genties pelių mėginiuose, nustatyti ir išanalizuoti aptiktų PyV genomų sekas.
4. Atlikti poliomos virusų paiešką *Rattus* genties žiurkių mėginiuose, nustatyti ir išanalizuoti aptiktų PyV genomų sekas.
5. Mielių ląstelėse susintetinti RnorPyV1 ir RatPyV2 VP1 baltymus ir išgryninti jų formuojamas VPD.



# 1 LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Poliomos virusai

Poliomos virusai (PyV) yra maži (40–45 nm skersmens), neturintys apvalkalėlio dvigrandinės DNR virusai. Jie priklauso *Polyomaviridae* šeimai, kuri patenka į I-ąją (dgDNR virusai) virusų grupę pagal D. Baltimorės virusų klasifikaciją. Šiuo metu yra patvirtintos 102 PyV rūšys, infekuojančios žinduolius, paukščius ir žuvis (ICTV, talk.ictvonline.org). Poliomos virusai būdingiausi žinduoliams: daugiausia patvirtintų PyV rūšių rasta primatuose (25), šikšnosparniuose (24), žmonėse (13), graužikuose (9). Poliomos virusai yra aptikti ir kituose žinduoliuose – alpakose, arkliuose, barsukuose, delfinuose, drambliuose, jaučiuose, pandose, meškėnuose, šunyse ir kt. Devynios PyV rūšys aptiktos paukščiuose, 5 – žuvyse (ICTV, Cituota: 2020-04-17).

Pirmasis poliomos virusas MPyV (angl. *Murine polyomavirus*) buvo atrastas pelėse 1950–1953 m. Ludwik Gross tyrė iš leukemija sergančių pelių organų paruošto filtrato gebėjimą sukelti leukemiją kitos linijos pelėms. Preparatas, paruoštas sumaišius sergančių pelių homogenizuotas kepenis, blužnį, žarnaplėvės auglius ir periferines limfines liaukas, buvo filtruojamas ir suleidžiamas sveikoms naujagimėms pelėms po oda. Devynioms iš 84 paveiktų pelių išsivystė leukemija, o 15-ai aplink kaklą išsivystė didelis kiekis seilių liaukų auglių. Iš 54 kontrolinių pelių, kurios buvo inokuliuotos pakaitintais (68 °C 30 min) ekstraktais, tik vienai pelei išsivystė gimdos kaklelio navikas. Autorius iškėlė hipotezę, kad leukemija sergančios pelės nešioja du karščiu inaktyvuojamus kancerogeniškus agentus, vieną – sukeltantį leukemiją, kitą – sukeltantį seilių liaukų karcinomą. Nors Gross manė, kad vėžio sukėlėjas yra virusinės kilmės, savo darbuose jį vadino „agentu“, siekdamas išvengti tuo metu mokslo pasaulyje vyravusio kritiško požiūrio į virusų gebėjimą sukelti vėžį žinduoliams (Gross, 1953). Vėžinius pelių paausinių seilių liaukų susirgimus sukeltantį agentą stebėjo ir apie jo virusinę kilmę svarstė ir paraleliai dirbusi Sarah Stewart, tačiau virusą, kaip tikėtiną šių susirgimų priežastį, įvardino tik 1958 m. Virusas naujagimėms pelėms sukėlė daug įvairių tipų auglių, todėl autorė su kolegėmis jį pavadino poliomos virusu: graikų poly + oma = daug auglių (Stewart ir kt., 1958). Pelių poliomos viruso atradimas pateikė neginčijamą įrodymą apie virusų gebėjimą sukelti vėžinius susirgimus žinduoliams ir padėjo pagrindą kitų onkogeninių žinduolių virusų paieškai ir tyrimams (Morgan, 2014).

Pirmasis primatų poliomos virusas buvo atrastas dviejų rūšių makakų (*Macaca fascicularis* ir *Macaca mulatta*) inkstų ląstelių kultūrose (Sweet ir Hilleman, 1960). Šis

virusas nesukėlė jokių citopatologijų ir buvo nepastebimas savo šeimininko – makakos – ląstelių kultūrose, todėl buvo identifikuotas tik juo paveikus kitos genties beždžionių (*Cercopithecus aethiops*) ląstelių kultūras. Virusas buvo pavadintas beždžionių vakuolės sudarančiu virusu 40, SV40 (angl. *simian vacuolating virus 40*), nes viruso paveiktos *Cercopithecus aethiops* ląstelės pasižymėjo dideliu kiekiu vakuolių. Atlikus tyrimus su graužikais, buvo nustatyta, kad makakų inkstų ląstelių kultūrų ekstraktai, suleisti žiurkėnams, jiems sukelia auglius (iš 154 paveiktų žiurkėnų, 109 išsivystė navikai) (Eddy ir kt., 1961). Šie augliai skyrėsi nuo sukeliama MPyV. Detalesni tyrimai leido nustatyti, kad auglius sukėlė SV40 virusas (Eddy ir kt., 1962). Atlikus intracerebralinę viruso ekstrakto injekciją naujagimiams žiurkėnams, 4 iš 9 gyvūnų išsivystė ependimomos (smegenų navikai) (Kirschstein ir Gerber, 1962). SV40 buvo antras virusas po MPyV, kurio inokuliacija didžiąjai daliai naujagimių žiurkėnų sukėlė auglių atsiradimą.

Pirmieji žmogaus poliomos virusai (ŽPyV) JC ir BK buvo atrasti 1971 m. nepriklausomai vienas nuo kito ir pavadinti pagal pacientų, kuriuose buvo aptikti, inicialus. JC poliomos virusas buvo išskirtas iš paciento J. C., sirgusio Hodžkino limfoma (angl. *Hodgkin's lymphoma*), smegenų, jam mirus dėl išsivysčiusios progresuojančios daugiažidininės leukoencefalopatijos (angl. *progressive multifocal leucoencephalopathy, PML*) (Padgett ir kt., 1971). BK poliomos virusas buvo išskirtas iš paciento, kuriam po inkstų persodinimo išsivystė šlapimtakių obstrukcija dėl susidariusių granuliuotų darinų, šlapimo (Gardner ir kt., 1971).

Nuo pirmojo poliomos viruso atradimo pelėse 1953 m., beveik tris dešimtmečius buvo manoma, kad PyV infekuoja tik žinduolius. 1981 m. ligotose banguotosiose papūgėlėse (*Melopsittacus undulatus*) buvo aptiktas pirmasis paukščių poliomos virusas (*Aves polyomavirus 1*, APyV) (Bernier ir kt., 1981). Po 2000-ųjų metų, tobulėjant molekuliniais tyrimų metodams, buvo aptiktos dešimtys naujų poliomos virusų. Didžioji jų dalis – žinduoliuose, 9 – paukščiuose. 2015 metais publikuotas straipsnis apie pirmąjį PyV aptiktą žuvyje, juodajame jūrų ešeryje (lot. *Centropristis striata*) (Peretti ir kt., 2015). Vėliau poliomos virusai buvo aptikti ir kitose žuvų rūšyse – šiuo metu patvirtinti 5 žuvų PyV (ICTV, talk.ictvonline.org). 2016 metais Buck ir kolegoms bioinformatiniais metodais ieškant panašių į PyV sekų duomenų bazėse, tokios sekos buvo atrastos skorpionų ir vorų genomų sekoskaitos duomenyse (Buck ir kt., 2016). Šie atradimai suteikė naujų įžvalgų apie PyV biologiją ir evoliuciją.

Kaip minėta anksčiau, 102 PyV rūšys yra pripažintos Tarptautinio virusų taksonomijos komiteto (angl. *International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV*). Beveik dar tiek pat naujų PyV rūšių paskelbta moksliniuose straipsniuose, jų genomų sekos patalpintos duomenų bazėse, tačiau šios rūšys dar oficialiai nesuklasifikuotos (Ehlers ir kt., 2019; Schulze ir kt.,

2020; Tan ir kt., 2020). Nors jau žinoma ~200 PyV rūšių, galima teigti, kad jos apima tik mažą dalį visos poliomos virusų įvairovės.

## 1.2 Poliomos virusų taksonomija

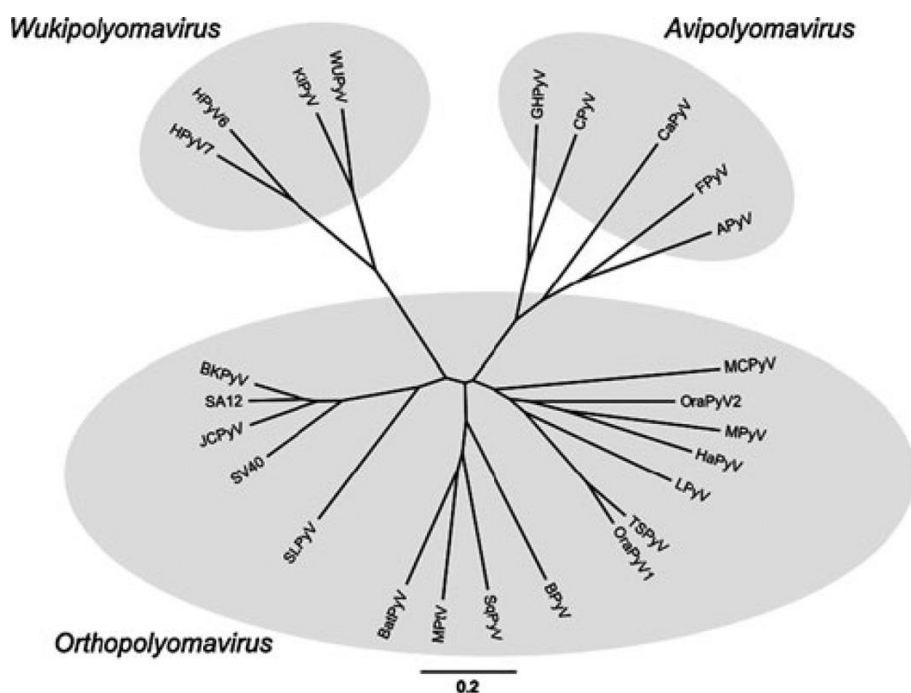
Virusų įvairovė yra daug didesnė nei kitų organizmų: skiriasi jų genetinė medžiaga (RNR ar DNR, viengrandinė ar dvigrandinė, žiedinė ar linijinė) ir jos kiekis, viruso genomai gali būti pasiskirstę keliuose segmentuose, supakuotuose į vieną arba į kelis virionus, jie infekuoja platų šeimininkų spektrą, nuo eukariotų iki kitų virusų, ir sukelia daug įvairių susirgimų. Virusai klasifikuojami pagal turimos genetinės medžiagos tipą, iRNR gamybos būdą, sukeltus susirgimus, infekuojamus šeimininkus, viruso morfologiją ar genomo panašumus, dažnai skirtingoms virusų šeimoms taikant skirtingus kriterijus. Priešingai bakterijų ar eukariotų klasifikacijai, virusai neturi jiems bendrų konservatyvių genų, pagal kuriuos būtų galima atkurti evoliucinius ryšius. Pastaruoju metu daug naujų virusinių sekų aptinkama didelio našumo sekoskaitos metodais, nieko nežinant apie šių virusų epidemiologiją ar morfologiją. Apie galimą tokių virusų klasifikaciją tenka spręsti tik pagal genomo sekas, kurios dažnai būna nepanašios į kitų virusų genomų sekas, todėl tokius virusus ypač sudėtinga priskirti kokiam nors grupei. Dėl šių priežasčių virusų klasifikacija iki šiol yra komplikauta ir nestandartizuota (Simmonds ir Aievsakun, 2018). Daugėjant informacijos, poliomos virusų klasifikacija taip pat ne kartą buvo keista ir tobulinta, o įvairūs PyV klasifikavimo aspektai vis dar svarstomi ir tobulinami.

Nuo 1966 m. virusų klasifikavimo klausimus sprendžia ICTV – Tarptautinis Virusų Taksonomijos Komitetas, kurio pagrindinis tikslas – sukurti universalią virusų klasifikavimo ir nomenklatūros sistemą. 1-oji ICTV ataskaita buvo paskelbta 1971 m., kurioje žinomi stuburinių virusai buvo suskirstyti į 19 genčių ir dvi šeimas – *Papovaviridae* ir *Picornaviridae*. Likę virusai buvo pateikti 24 grupėse, trūkstant papildomos informacijos tinkamam klasifikavimo lygiui nustatyti. *Papovaviridae* (Pa-pilomos virusas, pelių Po-liomos virusas ir beždžionių Va-kuoles sudarantis virusas, SV40) šeimai buvo priskirtos *Papillomavirus* ir *Polyomavirus* gentys (Fenner, 1976; Adams ir kt., 2015; Adams ir kt., 2017; Lefkowitz ir kt., 2018). *Polyomavirus* genčiai priklausė tuo metu žinomi pelių ir SV40 poliomos virusai. 1976 m. prie genties priskirti ir žmonių JC ir BK PyV (ICTV, talk.ictvonline.org).

1999 metais *Papovaviridae* šeima buvo išskirta į *Papillomaviridae* ir *Polyomaviridae* šeimas. Iki 2011 metų visi *Polyomaviridae* šeimos virusai buvo priskiriami vienai *Polyomavirus* genčiai. Per du pastaruosius dešimtmečius buvo atrasta ypač daug naujų PyV, todėl atsirado poreikis klasifikaciją keisti. 2011 m. *Polyomaviridae* šeimos virusus buvo pasiūlyta perskirstyti į

tris gentis remiantis trimis kriterijais: virusui būdingas šeimininkas ar šeimininkai ir viruso biologija; viruso genomo struktūra; viso genomo pilnos DNR sekos didžiausias panašumas į kitus PyV (81 % rūšims atskirti, gentims – nenustatytas).

Pagal šiuos kriterijus buvo išskirtos dvi žinduolių – *Orthopolyomavirus* ir *Wukipolyomavirus*, bei viena paukščių – *Avipolyomavirus*, gentys (Johnė ir kt., 2011). *Avipolyomavirus* genčiai priskirti visi paukščių PyV, tipiniu atstovu parinktas APyV. *Wukipolyomavirus* genties atskaitos tašku pasirinktas žmogaus KI poliomos virusas (angl. *Karolinska Institute polyomavirus*), šiai genčiai priskirti keturi žmogaus PyV: WU (angl. *Washington University polyomavirus*), KI, 6 ir 7 (pagal WU ir KI PyV sukurtas genties pavadinimas). *Orthopolyomavirus* genčiai priskirti visi likę žinduolių poliomos virusai, tipiniu atstovu pasirinktas SV40 PyV. **1.1 pav.** pateiktas klasifikacijos autorių braižytas filogenetinis medis, sudarytas pagal viso PyV genomo nukleotidų sekas. Vis dėlto, PyV akivaizdžiai išsiskiria į minėtas grupes tik skirtingoms gentims identifikuoti taikant skirtingus kriterijus: *Avipolyomavirus* genties atstovai atsiskiria remiantis ankstyvojo PyV genomo regiono nukleotidų sekomis ir virusų biologija, o *Wukipolyomavirus* – vėlyvojo regiono nukleotidų sekomis, likusius PyV priskiriant *Orthopolyomavirus* genčiai (Johnė ir kt., 2011).



**1.1 pav. Poliomos virusų filogenetinis medis, pagrįstas pilnomis genominiėmis nukleotidų sekomis**

Virusų priskyrimas naujai sukurtoms – *Orthopolyomavirus*, *Wukipolyomavirus*, *Avipolyomavirus* – gentims nurodomas patamsintais ovalais. Iš (Johnė ir kt., 2011)

Tokia klasifikacija nepriėjo dėl skirtingoms gentims taikytų skirtingų klasifikacijos kriterijų ir neatsižvelgimo į rekombinantinius poliomos virusus. Be to, paukščių poliomos virusai

buvo atskirti remiantis jų biologija, tačiau toks kriterijus netinkamas didžiąjai daliai naujai atrandamų poliomos virusų, nes paprastai yra žinoma tik jų genomo seka ir šeimininkas. 2015 m. buvo pasiūlyta patobulinta klasifikacija. Šiuo metu yra išskiriamos keturios *Polyomaviridae* šeimos gentys: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* ir *Deltapolyomavirus*, kurioms iš viso priskiriamos 93 PyV rūšys. 9 poliomos virusai kol kas nepriskirti jokiai genčiai, 5 iš jų – žuvų PyV. Ši klasifikacija paremta PyV didžiojo T antigeno aminorūgščių sekų skirtumais (Calvignac-Spencer ir kt., 2016).

Atnaujinta klasifikacija remiasi keliais pagrindiniais principais, pagal kuriuos naujai atrasti poliomos virusai priskiriami naujoms rūšims. Pirmiausia, klasifikuojamo poliomos viruso genomo seka turi būti žinoma, publikuota recenzuojamame žurnale ir viešai prieinama duomenų bazėse. Antra, viruso genomo struktūra turi atitikti poliomos virusams būdingą struktūrą, tai yra dvigrandinės DNR genomas turi turėti ankstyvąjį ir vėlyvąjį regionus, koduojančius T antigenus ir struktūrinius viruso baltymus. Šie regionai turi būti atskirti nekoduojančiomis sekomis. Trečia, turi būti žinomas šiai PyV rūšiai būdingas šeimininkas. Ketvirta, skirtumas tarp PyV didžiojo T antigeno koduojančių nukleotidų sekų ir jam artimiausio kito poliomos viruso turi būti didesnis nei 15 %. Jam esant mažesniam, PyV gali būti priskirti tos pačios rūšies skirtingiems variantams, bet ne naujai rūšiai. Esama ir išimčių, pavyzdžiui, jei lyginami virusai sukelia skirtingas ligas arba yra randami skirtingų rūšių šeimininkuose, pastarojo kriterijaus galima nepaisyti (Calvignac-Spencer ir kt., 2016).

Taip pat buvo žengtas dar vienas svarbus žingsnis poliomos virusų klasifikacijos standartizacijai – poliomos virusams buvo suteikti binominiai rūšių pavadinimai, pateikiant lotynišką šeimininko pavadinimą, pridėdant žodžius „poliomos virusas“ (angl. *polyomavirus*), ir nurodant viruso atradimo tame šeimininke eilės numerį. Tokia pavadinimų suteikimo tvarka dabar galioja visiems naujai atrandamiems PyV. Pavyzdžiui, SV40 – beždžionių vakuolės sudarančiam virusui – buvo suteiktas rūšies pavadinimas *Macaca mulatta polyomavirus 1*. Žmonių poliomos virusai buvo pavadinti Žmonių PyV 1-12 (angl. *Human polyomaviruses 1-12*), pavyzdžiui, BK ir JC poliomos virusai buvo pavadinti atitinkamai Žmogaus poliomos virusais 1 ir 2 (angl. *Human polyomavirus 1, 2*) (Calvignac-Spencer ir kt., 2016). Ilgą laiką pavadinimai naujiems virusams buvo teikiami pagal sukeltą ligą, biologiją ar net atradėjų vardus. Daugėjant žinomų virusų, toks pavadinimų teikimas tapo labai nepatogus ir dar labiau apsunkinantis ir taip komplikuoję klasifikaciją. Tiesa, toks PyV rūšių pavadinimų patobulinimas įneša šiek tiek sumaišties kalbant apie seniai atrastus ir mokslo pasaulyje gerai žinomus poliomos virusus (SV40, JC, BK), nes dabar šiuos virusus galima minėti dvejopai – naudojant *viruso* pavadinimą (SV40) arba *viruso rūšies* pavadinimą (*Macaca mulatta polyomavirus 1*), kurie smarkiai skiriasi. Vis dėlto, binominių

pavadinimų įvedimas buvo būtinas žvelgiant į ateitį ir turint omenyje, kad naujų poliomos virusų, kurių težinoma genomo seka ir šeimininkas, tik daugės (Siddell ir kt., 2020).

Iki 2019 metų, aukščiausias taksonas, kuriam priskiriami PyV, buvo *Polyomaviridae* šeima. 2019 metais ICTV paskelbė atnaujintą virusų klasifikaciją ir PyV suklasifikavo iki aukščiausio šiuo metu virusų taksonomijoje taksono – srities (angl. *Realm*). Nauja taksonomija pateikta lentelėje (1.1 lentelė.).

### 1.1 lentelė. Poliomos virusų taksonomija.

Lentelėje pateikta dabartinė poliomos virusų taksonomija, pagal 2019 m. ICTV paskelbtą atnaujinimą (ICTV, talk.ictvonline.org). Skliausteliuose prie genties pavadinimo pateiktas tai genčiai priskiriamų rūšių skaičius. Rūšies skiltyje pateikiamas tipinis genties atstovas. 9 PyV nepriskiriami jokiai genčiai.

<b>Sritis (Realm)</b>		<i>Monodnaviria</i>	
<b>Karalystė (Kingdom)</b>		<i>Shotokuvirae</i>	
<b>Tipas (Phylum)</b>		<i>Cossaviricota</i>	
<b>Klasė (Class)</b>		<i>Papovaviricetes</i>	
<b>Eilė (Order)</b>		<i>Sepolyvirales</i>	
<b>Šeima (Family)</b>		<i>Polyomaviridae</i>	
<b>Gentis (Genus)</b>			
<i>Alphapolyomavirus</i> (44)	<i>Betapolyomavirus</i> (36)	<i>Deltapolyomavirus</i> (4)	<i>Gammapolyomavirus</i> (9)
<b>Rūšis (Species)</b>			
<i>Mus musculus polyomavirus 1</i> (MPyV1)	<i>Macaca mulatta polyomavirus 1</i> (SV40)	<i>Human polyomavirus 6</i> (ŽPyV6)	<i>Aves polyomavirus 1</i> (APyV)

Vis dėlto akivaizdu, kad dabartinė klasifikacija tinkamai neapibūdina PyV įvairovės. Žinomi 5 žuvų poliomos virusai nėra pakankamai artimi jokiai genčiai, taip pat į dabartinius genčių rėmus netelpa ir kai kurių žinduolių – pandos, meškėno, jaučio, delfino – PyV, be to, aptinkami ir nauji poliomos virusai, neatitinkantys dabartinių genčių kriterijų (Ehlers ir kt., 2019). Bėgant laikui ir gausėjant poliomos virusų skaičiui ir įvairovei dabartinė klasifikacija turės būti atnaujinta.

## 1.3 Naujų poliomos virusų paieška

### 1.3.1 Poliomos virusų paieškos ir tyrimų svarba

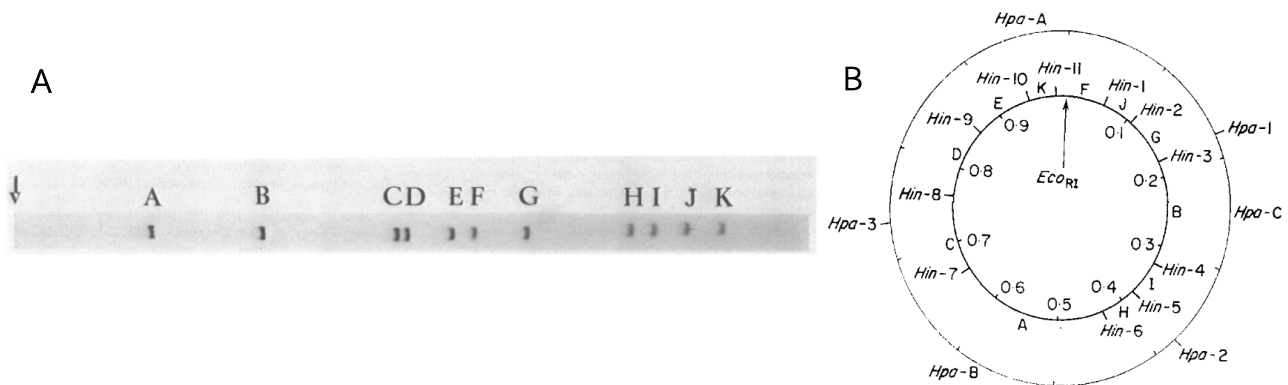
Poliomos virusai – ypač SV40 – kartu su kitais nedideliais onkogeniniais DNR virusais buvo vienu svarbiausiu XX a. antros pusės molekulinės biologijos, genų inžinerijos, biotechnologijos ir vėžio tyrimų įrankiu. Tiriant SV40 buvo atrasti tokie reiškiniai kaip DNR superspiralizacija, alternatyvus iRNR splaisingas, iširta chromatino struktūra ir ląstelių vėžinės transformacijos mechanizmai, atrasti ir iširti onkogeniniai ir vėžio supresoriniai genai, eukariotų

transkripcijos mechanizmai, sugalvotas restrikcijos endonukleazių pritaikymas ir kt. Daugelis svarbių atradimų, kurie buvo padaryti tiriant SV40 poliomos virusą ar naudojant jį kaip modelinę sistemą, pateikti lentelėje (1.2 lentelė.).

**1.2 lentelė. XX a. antros pusės biologijos atradimai, kuriems pasitarnavo poliomos virusai**

Metai	Atradimas	Šaltiniai
1963–1965	SV40 DNR tyrimų metu atrandamas DNR superspiralizacijos reiškiny.	(Weil ir Vinograd, 1963; Vinograd ir kt., 1965)
1971–1973	Pirmą kartą DNR analizei panaudojama restrikcijos endonukleazė. SV40 genomus sukarpomas į 11 fragmentų naudojant iš <i>Hemophilus influenzae</i> išskirtą restrikcijos endonukleazę (1.2 pav., A). Fragmentai atskiriami tuomet menkai naudojama technika – poliakrilamido gelio elektroforeze. Per artimiausius keletą metų šis atradimas buvo pritaikytas mokslinėje praktikoje: buvo nustatyta SV40 replikacijos pradžios vieta ir genomo organizacija (ankstyvasis ir vėlyvasis transkripcijos regionai), išsiaiškinta, kad virusui būdinga dvikryptė replikacija, sudarytas pirmasis genomo restrikcijos fragmentų žemėlapis (1.2 pav., B).	(Kelly ir Smith, 1970; Danna ir Nathans, 1971; Danna ir Nathans, 1972; Danna ir kt., 1973; Brownlee, 2005)
1972	REaze EcoRI linearizuotas SV40 genomus buvo panaudotas kaip pirmasis vektorius heterologinės DNR įterpimui	(Jackson ir kt., 1972)
1968-1974	SV40 minichromosomos tyrimai suteikė daug informacijos apie chromatiną struktūrą	(Griffith, 1974)
1975	SV40 T antigenas („genas A“) – pirmasis DNR viruso genas įvardintas atsakingu už ląstelių kultūrų onkogeninę transformaciją. Tolimesni tyrimai patvirtino PyV T antigenų, kaip virusinių onkogenų, vaidmenį sukelti ląstelių linijų transformacijas	(Brugge ir Butel, 1975; Rassoulzadegan ir kt., 1982)
1977–1978	DNR sekoskaitos pradžia: nustatomos pirmosios genomines DNR sekos – SV40 PyV ir bakteriofago φX174	(Sanger ir kt., 1977; Reddy ir kt., 1978)
1978	Tiriant SV40 ankstyvąjį transkripcijos regioną aptinkamas alternatyvus iRNR splaisingas	(Berk ir Sharp, 1978)
1979	Atrandamas pirmasis tirozino kinazės aktyvumas tiriant SV40 T antigenus	(Eckhart ir kt., 1979)
1979	Atrandamas p53 baltymas – kartu su SV40 T antigenais iš transformuotų pelių ląstelių imunoprecipituojamas 54 kDa baltymas, svarstoma jo įtaka ląstelių onkogeninei transformacijai. SV40 intensyviai naudojamas onkogenezės tyrimams	(Linzer ir Levine, 1979; Javier ir Butel, 2008; DiMaio, 2019)
1981	Apibūdintas pirmasis transkripcijos stipriklis – SV40 genomo elementas, net būdamas toli nuo rekombinantinio triušio hemoglobino β1 geno promotoriaus geba 200 kartų padidinti šio geno raišką HeLa ląstelėse.	(Banerji ir kt., 1981)
1984	SV40 LTag sekoje aptiktos pirmosios nukreipimo į branduolį sekos	(Kalderon ir kt., 1984)
1984	Sukurta SV40 DNR replikacijos modelis <i>in vitro</i> – naudojamas kaip pagrindinis modelis eukariotų DNR replikacijos tyrimams. SV40 viruso DNR replikacijos tyrimais nustatyti daugelis eukariotų replikacijoje dalyvaujančių baltymų	(Li ir Kelly, 1984; Fanning ir Zhao, 2009; Sowd ir Fanning, 2012)
1988	Atrandama SV40 sąveika su retinoblastomos (Rb) baltymu, aiškinamosis Rb vėžio supresoriaus funkcijos	(DeCaprio ir kt., 1988)

1994	Naudojant SV40 DNR replikacijos <i>in vitro</i> modelį išaiškinta eukariotų DNR replikacijos šakutės struktūra	(Waga ir Stillman, 1994)
------	--	--------------------------



### 1.2 pav. Restrikcijos endonukleazių panaudojimo SV40 DNR analizei ir genomo žemėlapiui sudaryti iliustracija

**A** dalyje pavaizduoti SV40 PyV genomo fragmentai poliakrilamidiniame gelyje po hidrolizės *Hemophilus influenzae* restrikcijos endonukleaze (raidės A–K). Rodyklė žymi elektroforezės pradžios tašką. **B** dalyje pavaizduotas SV40 genomo fragmentų žemėlapis, sudarytas pagal DNR profilius, gautus hidrolizuojant šį genomą *H. Influenzae* (Hin) ir *H. Parainfluenzae* (Hpa) restrikcijos endonukleazėmis. Raidės A–K žymi po hidrolizės su *H. Influenzae*, Hpa-A–C – po hidrolizės *H. Parainfluenzae* REaze gaunamus DNR fragmentus. Hin-1–10 ir Hpa-1–3 žymi atitinkamų REazių hidrolizės vietas. EcoRI hidrolizės vieta pasirinkta kaip žiedinės molekulės atskaitos taškas. Žemėlapiio atstumo vienetai – atstumas nuo EcoRI hidrolizės vietos (pagal laikrodžio rodyklę), padalintas iš SV40 genomo ilgio. Iš (Danna ir Nathans, 1972; Danna ir kt., 1973)

PyV tyrimai smarkiai prisidėjo prie mokslo proveržio praeitame amžiuje, tačiau šių virusų tyrimai aktualūs ir dabar. Per pastaruosius du dešimtmečius poliomos virusų gretos išaugo dešimt kartų, todėl atitinkamai išaugo ir juos tiriančių mokslininkų, publikacijų kiekis. Prasiplėtė ir tyrimų kryptys. Daug dėmesio skiriama poliomos virusų į virusus panašių dalelių panaudojimo tyrimams profilaktinėms ir terapeutinėms vakcinoms, genų ar vaistų pernešimui (Roldão ir kt., 2019). Bent 7 iš šiuo metu žinomų ŽPyV buvo išskirti iš įvairių vėžinių mėginių, todėl taip pat intensyviai tiriamos ir PyV sąsajos su žmonių vėžiniais susirgimais (Prado ir kt., 2018). PyV vis tvirčiau siejami ir daugeliu kitų ligų (Moens, Krumbholz ir kt., 2017; Haque Hussain ir Sterling, 2019; Sheu ir kt., 2019). Prasiplėtus PyV rūšių skaičiui aktyviau analizuojama ir poliomos virusų kilmė bei evoliucija, svarbiu tyrimų aspektu tapo PyV gebėjimas keisti šeimnininką, rekombinuoti ar net zoonoziškai užkrėsti žmogų. Nepaisant pagausėjusių tyrimų, geriausiai ištirtas PyV vis dar yra SV40, atrastas prieš šešis dešimtmečius. Trečdalis visų poliomos virusų aptiktas žmoguje, kituose primatuose ir šikšnosparniuose, todėl labai trūksta informacijos apie kitų žinduolių, paukščių, žuvų poliomos virusus, norit patikimai analizuoti PyV biologiją, evoliuciją ir kilmę.



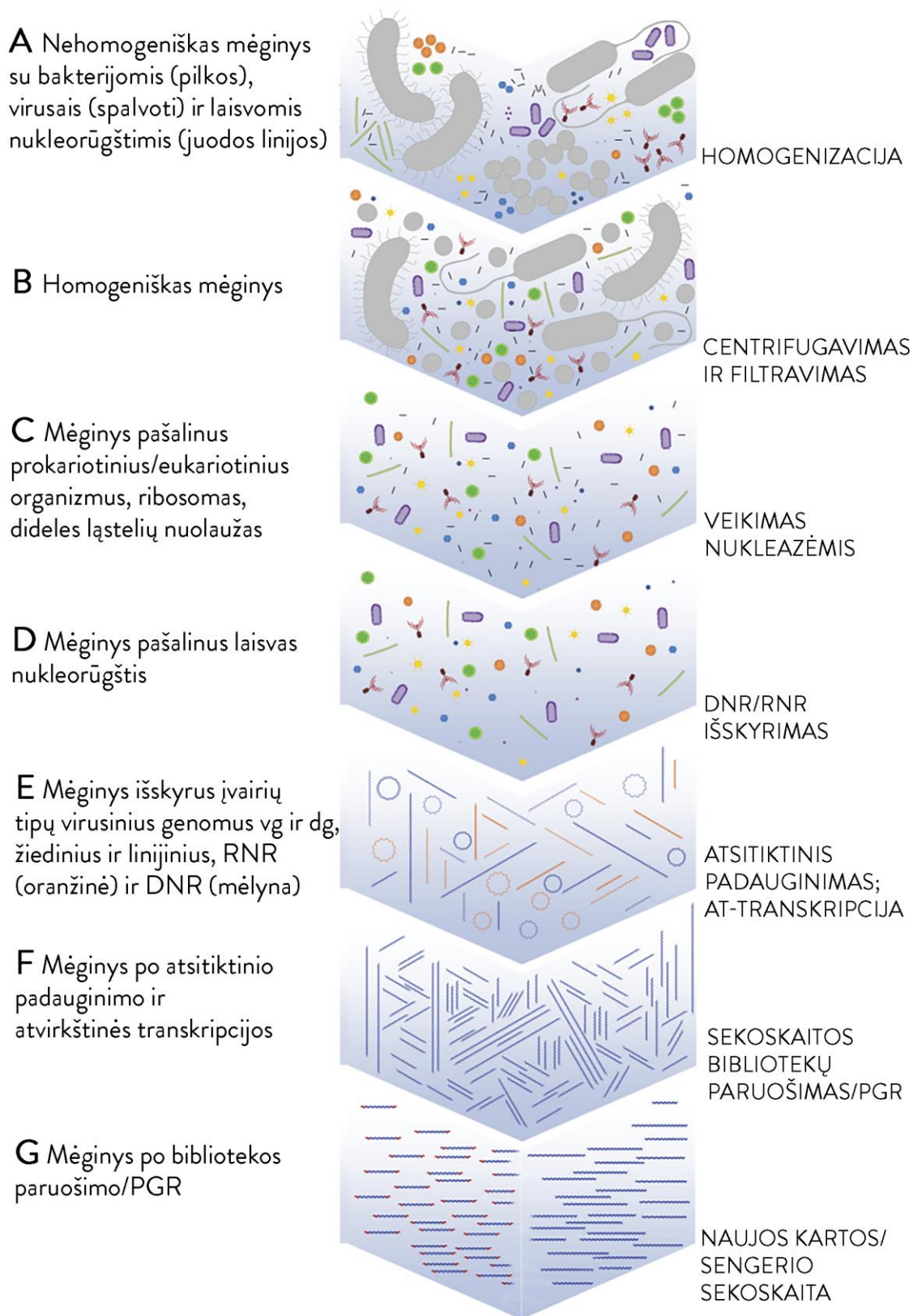
### 1.3.2 Poliomos virusų paieškos metodai

Virusai gali būti aptinkami įvairiais metodais, kurie skiriasi savo pobūdžiu, efektyvumu ir kaina. Renkantis tinkamiausią metodą svarbu įvertinti, ar bus ieškoma naujų, dar nežinomų virusų, ar bus atliekama jau žinomų virusų diagnostika. Atlikti jau žinomų virusų diagnostiką mėginuose yra paprasčiau, tam tinka imunofermentinės analizės, imunoblotingo, imunoišsodinimo, imunofluorescencijos, fluorescencinės *in situ* hibridizacijos, PGR metodai (Kiselev ir kt., 2020).

Ieškant naujų virusų ar mėginant identifikuoti dar nežinomą patogeną pasitelkiami kitokie metodai. Daugelis pirmųjų virusų buvo aptikti ir identifikuoti virusu užkrečiant ląstelių kultūrą ir stebint jo citopatologinį poveikį, naudojant „negatyvių kolonijų“ metodą (virusas užkrečia ląstelių monosluoksni, tose vietose, kuriose plinta virusas, susidaro tušti, beląsteliai plotai), virusai užkrėstose ląstelėse stebimi elektroniniu mikroskopu (Popov ir kt., 2019). Minėti būdai efektyvūs ir naudojami iki šiol, tačiau yra gan sudėtingi, brangūs, užima daug laiko ir suteikia informacijos apie viruso biologiją, bet ne apie jo molekulinę sandarą ir genomą. Be to, ne visi virusai lengvai dauginami laboratorijoje. Pastaruoju metu naujų virusų aptikimas ir identifikavimas perėjo į molekulinį lygmenį, dažniausiai siekiant aptikti viruso nukleorūgštį.

Prieš atliekant paiešką, mėginiai dažnai yra praturtinami viruso genetinė medžiaga, siekiant padidinti virusinių nukleorūgščių ir kitų nukleorūgščių (dažniausiai – šeimininko ląstelinės DNR ir RNR) santykį. Kokie praturtinimo metodai taikomi priklauso nuo viruso nukleorūgšties – RNR ar DNR – tipo, viruso dydžio, lipidinio apvalkalėlio buvimo. Praturtinimas gali būti vykdomas prieš nukleorūgščių išskyrimą ir po jo. Prieš nukleorūgščių išskyrimą dažnai taikomi metodai – filtravimas, lėtas centrifugavimas arba ultracentrifugavimas tankio gradientu ir veikimas nukleazėmis. Mėginys filtruojamas mikrofiltrais (0,2–0,45 μm), kurie nepraleidžia šeimininko ląstelių, tačiau poros yra pakankamai didelės virusinėms dalelėms prasiskverbti. Tokiu būdu, jei mėginys geros kokybės, neįvykusi ląstelių lizė, virusai su supakuota genetinė medžiaga gali būti efektyviai atskirti nuo šeimininko ląstelių ir jų nukleorūgščių. Lėto centrifugavimo metu (iki keliolikos tūkstančių aps./min) eukariotinės ląstelės ir bakterijos išsėda į nuosėdas, virusai lieka tirpioje frakcijoje. Taikant ultracentrifugavimą tankio gradientu virusai pasilieka tam tikro tankio frakcijoje, kuri surenkama. Veikiant nukleazėmis „palaidos“ nukleorūgštys suardomos, o virusinės nukleorūgštys, apsaugotos viruso kapsidės, lieka nepažeistos. Svarbu atkreipti dėmesį, kad, siekiant optimalių rezultatų, skirtingiems virusams reiktų taikyti skirtingus protokolus – pavyzdžiui, dideli virusai kaip herpio (~200 nm) ar mimivirusai (~500-700 nm) bus prarandami filtruojant mikrofiltrais, todėl, nepritaikius sąlygų, tiriamo viruso kiekį galima ir sumažinti (Hall ir kt., 2014;

Conceição-Neto ir kt., 2015; Lewandowska ir kt., 2017). Pavyzdinė mėginio praturtinimo virusais prieš nukleorūgščių išskyrimą schema pateikta **1.3 pav.**, **A-D** dalyse.



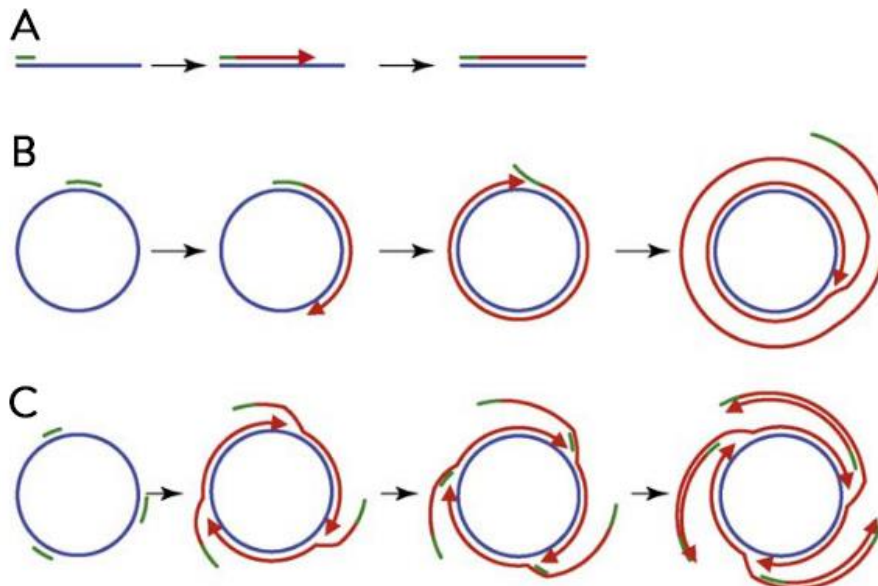
**1.3 pav. Virusų nukleorūgščių paieškos mėginiuose eiga apibendrinanti schema**  
 Parengta pagal (Conceição-Neto ir kt., 2015)

Po pirminio mėginio praturtinimo virusais, išskiriama virusinė DNR/RNR **1.3 pav., D-E**). Virusų apvalkalas ardomas proteazėmis, nukleorūgštys gali būti išskiriamos pašalinant baltymus fenolio/chloroformo metodu ir išsodinama etanolio ir druskų tirpalu, tačiau paprastai naudojami komerciniai rinkiniai su centrifuginėmis silicio kolonėlėmis ar magnetinėmis dalelėmis. Šie rinkiniai skiriasi kaina, naudojama metodika ir darbo trukme, gali būti pritaikyti konkrečiai RNR ar DNR skyrimui, šiek tiek varijuoja jų efektyvumas (Ali Suliman, 2019).

Paprastai, net ir po pirminio praturtinimo, virusinių nukleorūgščių kiekis mėginiuose nesiekia 1 % (Hall ir kt., 2014). Išskirtos nukleorūgštys gali būti toliau praturtinamos, tiesa, jei taikomasi į RNR virusus, pirmiausia reikalinga atvirkštinės transkripcijos reakcija. Efektyvus ir plačiai naudojamas praturtinimo metodas – atsitiktinis grandinės išstūmimo (riedančio rato) padauginimas, kuriam pasitelkiama bakteriofago  $\Phi 29$  (Phi29) polimerazė (**1.3 pav., E-F**). Phi29 polimerazė turi keletą svarbių savybių, kurios įgalina jos efektyvų panaudojimą. Ji geba išstumti vieną dg nukleorūgšties grandinę nenutraukdama sintezės. Dėl šios priežasties, dauginimo reakcijai vykti nereikia įprastinės PGR sąlygų – denatūracijos po kiekvieno elongacijos ciklo. Phi29 geba efektyviai sintetinti iki 24 val., šios polimerazės procesyvumas – maždaug 70 000 nukleotidų per prisijungimą, tikslumas – 1 klaida  $10^5$ – $10^6$  nt, ji turi 3'-5' egzonukleazinį klaidų taisymo aktyvumą. (Banér ir kt., 1998). Padauginimui Phi29 polimeraze naudojami atsitiktinių pradmenų mišiniai, kurių keli paskutiniai 3'-galo nukleotidai sujungti fosforotioato jungtimis, kad pradmenys būtų apsaugoti nuo minėto polimerazės egzonukleazinio aktyvumo. Naudojant egzonukleazę atsparius pradmenis, Phi29 padauginimo efektyvumas padidėja keliasdešimt kartų (Dean ir kt., 2001). Vietoj oligonukleotidinių pradmenų gali būti naudojama DNR praimazė. Į reakcijos mišinį dedama pirofosfatazės, kad būtų panaikintas reakciją slopinantis pirofosfato kaupimasis. Phi29 padauginimo metodas labai naudingas ieškant naujų nedidelį žiedinį genomą turinčių virusų, nes mažos žiedinės molekulės padauginamos daug efektyviau ir greičiau nei ilgos linijinės molekulės (pavyzdžiui, šeimininko genomine DNR) (padauginimo principas plačiau paaiškintas **1.4 pav.**), todėl yra plačiai naudojamas poliomos virusų paieškai (Johnė ir kt., 2009; Nainys ir kt., 2015; Parras-Moltó ir kt., 2018). Metodas buvo pritaikytas ir PyV padauginimui naudojant specifinius BK, TS (angl. *trichodysplasia spinulosa – associated polyomavirus*), 6, 7 ir STL (angl. *St. Louis polyomavirus*) žmogaus poliomos virusams pradmenis. Po reakcijos virusinės DNR kiekis mėginiuose padidėjo  $1 \times 10^8$  –  $1 \times 10^{10}$ , specifiniai pradmenys virusinę DNR padaugino maždaug 200 kartų geriau nei atsitiktiniai heksamerei (Rockett ir kt., 2015).

Žiedinis PyV genomus suteikia galimybę naudoti dar vieną efektyvų praturtinimo metodą – DNR egzonukleazę, kurios ardo DNR nuo laisvų jos galų. Tokiu būdu mėginyje esanti linijinė DNR bus sunaikinta, o žiedinis PyV genomus liks nepaveiktas (Schowalter ir kt., 2010;

Nainys ir kt., 2015). Šis metodas naudojamas prieš padauginimą Phi29. Vis dėlto, egzozonukleazių naudojimas rizikingas, nes mėginyje esantys PyV genomai gali būti ir linearizuoti, jei mėginys buvo laikomas netinkamomis sąlygomis, keletą kartų atšildomas ir užšaldomas. Tokiu atveju, po veikimo egzozonukleazėmis, visa PyV DNR gali būti prarasta.



#### 1.4 pav. DNR padauginimo Phi29 polimeraze variantų schemos

Mėlynos linijos žymi tikslinės DNR sekas, žalios linijos žymi oligonukleotidinius pradmenis, raudonos linijos žymi naują polimerazės susintetintą DNR. Rodyklės rodo augančius 3' DNR galus. **A** Linijinė matrica ir vienas pradmuo. Polimerazė susintetina vieną papildomą grandinę. **B** Žiedinė matrica ir vienas pradmuo. Polimerazė susintetina naują grandinę, po vieno rato pradmuo ir susintetinta grandinė yra išstumiami, o DNR sintezė tęsiasi. Tokiu būdu gaunama ilga konkatamerinė viengrandinė DNR. **C** Žiedinė matrica ir keli pradmenys. Sintezė pradeda nuo kiekvieno pradmens. DNR sintezė vykdoma taip, kaip aprašyta **B** punkte. Reakcijos mišinyje esantys pradmenys toliau jungiasi prie išstumtos grandinės ir yra naudojami kaip papildomi iniciacijos taškai DNR sintezei. Reakcijos produktai – ilgos dgDNR konkatamerinės molekulės (Johnė ir kt., 2009).

Praturtinti mėginiai gali būti naudojami PGR arba didelio našumo sekoskaitos bibliotekų ruošimui (**1.3 pav., F-G**) Didelio našumo sekoskaita turi daug privalumų – nereikia iš anksto žinoti virusų nukleorūgščių sekų, iš vieno mėginio gaunamos įvairių jame esančių virusų sekos, todėl šis metodas ypač gerai tinka atliekant didelio masto viriomas tyrimus. Naujos kartos sekoskaitos metodai sukėlė perversmą naujų virusų paieškoje, jų dėka vieno tyrimo metu gali būti aptinkami tūkstančiai įvairių virusų sekų (Tisza ir kt., 2020). Iš kitos pusės, didelio našumo sekoskaita vis dar turi nemažai trūkumų. Sekoskaitos kaina, nors vis mažėjanti, vis tiek išlieka aukšta, reikalinga brangi įranga ir apmokytas personalas; mėginių paruošimas sekoskaitai trunka ilgai (dieną ar kelias) ir yra sudėtingas, ilgai trunka ir pati sekoskaita; gauti rezultatai – gausūs, tačiau reikalauja daug darbo, programinės įrangos, kompiuterinių resursų ir bioinformatikos žinių jų tinkamai interpretacijai (Kiselev ir kt., 2020).

Dėl šių priežasčių vis dar plačiai naudojamos tradicinės PGR metodikos. Siekiant aptikti virusą, kurio sekos žinomos (diagnostikoje), galima naudoti įprastinę, o jei informacija apie sekas ribota – išsigimusių PGR. Išsigimusi PGR vykdoma ieškant panašių į jau žinomus virusų. Sukuriami pradmenys, besijungiantys prie konservatyvių taikinių su leidžiama kelių nukleotidų paklaida dėl pradmens sekoje esančių išsigimusių nukleotidų (pvz., inozino), galinčių jungtis prie skirtingų nt. (Bexfield ir Kellam, 2011). Naujų poliomos virusų paieškai naudojamas dar vienas efektyvus metodas – lizdinė išsigimusi PGR. Pagal 10 PyV konservatyvias didžiojo T antigeno ir kapsidės baltymų VP1/VP3 (angl. *viral protein-1/3*) genų sekas buvo sukurtos šešios poros išsigimusių pradmenų, naudojamų dviem PG reakcijoms. Su pirma pradmenų pora padauginamas ilgesnis fragmentas, o antrosios PGR metu prie šio padauginto fragmento viduje esančių sekų jungiasi kita pradmenų pora ir padaugina trumpesnę fragmentą. Taip galima aptikti tiek jau žinomus, tiek naujus PyV, net esant labai mažam jų kiekiui (Johnė ir kt., 2005; Nainys ir kt., 2015; Gedvilaite ir kt., 2017). Norint nustatyti, ar aptiktos sekos iš tiesų yra virusinės, PGR produktų sekos yra nustatomos Sengerio (angl. *Sanger*) sekoskaitos metodu.

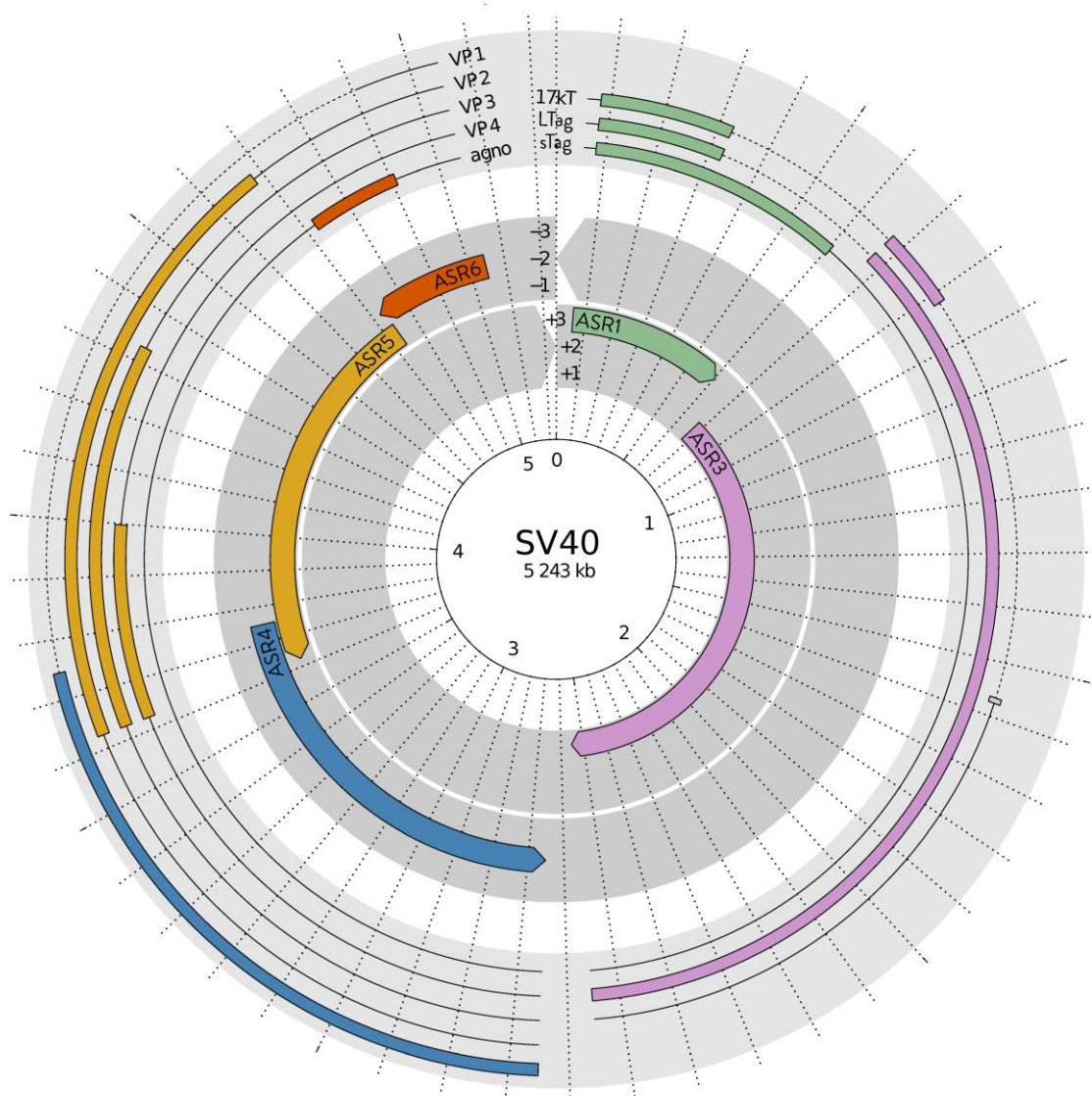
Nuskaitytos sekos yra analizuojamos ir lyginamos su esančiomis duomenų bazėse. Daugelis naujų virusų nustatomi naudojant Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programas, kurios lygina turimas sekas su duomenų bazių (pvz., The National Center for Biotechnology Information, NCBI) sekomis. Kartais nauji virusai yra pakankamai homologiški jau žinomiems, kad būtų galima juos priskirti tam tikrai grupei. Dažnai, ypač apdorojant didelio našumo sekoskaitos duomenis, naujai aptiktos sekos labai smarkiai skiriasi nuo esančių duomenų bazėse, tuomet būna sunku ar beveik neįmanoma jų priskirti kokiam nors kategorijai (Bexfield ir Kellam, 2011). Tokias sekas galima pavadinti virusų „juodąja medžiaga“. Vis dėlto, ieškoma šios problemos sprendimų, pavyzdžiui, pasitelkiant dirbtinį intelektą (Tisza ir kt., 2020).

## **1.4 Poliomos virusų genomas**

### **1.4.1 Poliomos virusų genomo struktūra**

Poliomos virusų genomas paprastai sudarytas iš ~5 kb ilgio žiedinės dvigrandinės DNR. Iš šiuo metu žinomų ŽPyV, Merkelio ląstelių PyV pasižymi didžiausiu genomu (5387 bp), o Sent Luiso poliomos virusas (STLPyV) – mažiausiu (4776 bp) genomu. Žuvyse aptiktų PyV genomų dydžiai svyruoja nuo 7369 bp (juodojo jūrų ešerio *Centropristis striata* PyV) iki 3962 bp (didžiosios gitaržuvės *Rhynchobatus djiddensis* PyV) (Moens, Krumbholz ir kt., 2017). PyV genomui būdingi konservatyvūs struktūros elementai – genomas turi du priešingomis kryptimis orientuotus, skirtingu metu transkribuojamus T antigenų (ankstyvasis) ir kapsidės baltymų

(vėlyvasis) regionus, atskirtus nekoduojančio, maždaug 500 bp dydžio kontrolės regiono – NKKR (angl. *non-coding control region, NCCR*) (Gu ir kt., 2009) (**1.5 pav.**). NKKR turi dvikryptį reguliacinį regioną, kuriame yra promotoriaus/stipriklio elementai ankstyviesiems ir vėlyviesiems viruso genams, bei Ori – virusinės DNR replikacijos pradžios seka (angl. *origin of replication*) (Fanning ir Zhao, 2009). NKKR pasižymi didžiausiu PyV sekos kintamumu, tačiau konservatyvūs LTag rišantys motyvai yra būdingi visų poliomos virusų nekoduojančiam regionui. Ankstyvasis promotorius turi TATA dėžutę, o vėlyvajam šis motyvas nebūdingas. NKKR yra kelios ląstelės



**1.5 pav. SV40 poliomos viruso genomo sandaros ir raiškos produktų schema**

Centrinė schemos dalis vaizduoja šešis egzistuojančius atvirus genomo skaitymo rėmelius (ASR). Atviri skaitymo rėmeliai pažymėti skirtingomis spalvomis. Žalia ir violetine spalva pažymėti rėmeliai, esantys ankstyvajame regione, oranžine, geltona ir mėlyna – vėlyvajame. Nekoduojantis reguliacinis regionas (NKKR) yra tarp 1 ir 6 ASR. Išorinis apskritimas vaizduoja transkriptus po splaisingo, egzoni pažymėti atitinkamai ASR. Netransliuojamas sritis ir intronus vaizduoja vientisos arba pertrauktos linijos. Atstumas tarp spindulinių ašių atitinka 100 bp. (Moen, Calvignac-Spencer ir kt., 2017)

transkripcijos faktorių prisijungimo vietos. (Atkin ir kt., 2009; Feng ir kt., 2011; Neumann ir kt., 2011).

Ankstyvasis transkripcijos regionas koduoja mažąjį (angl. *small tumour antigen, sTag*) ir didįjį T antigenus. T antigenų sekos skiriasi tarp žinduolių poliomos virusų rūšių, tačiau pagrindinių funkcinių sričių konservatyvumas yra didelis. Paprastai LTag turi du egzonus, o sTag geno raiška vyksta nuo vieno atviro skaitymo rėmelio, nevykdant splaisingo. sTag ir LTag izoformos paprastai turi persidengiančią ~80 aminorūgščių ilgio lyderinę seką.

Vėlyvasis regionas koduoja VP1, VP2 ir VP3 kapsidės baltymus. Šio regiono iRNR yra transkribuojama nuo kitos DNR grandinės, priešinga kryptimi nei ankstyvasis regionas. VP1 ir VP2 struktūriniai baltymai sintetinami nuo skirtingų informacinių RNR dėl alternatyvaus splaisingo (Moens, Krumbholz ir kt., 2017).

#### **1.4.2 PyV genomo papildomi ir alternatyvūs skaitymo rėmeliai bei splaisingo variantai**

PyV genomai pasižymi daugeliu atvirų skaitymo rėmelių, kurie koduoja papildomus baltymus arba pagrindinių baltymų variantus. Įvairūs papildomi PyV koduojami baltymai ir jų žinomos ar numanomos funkcijos pateiktos lentelėje (**1.3 lentelė**).

Ankstyvasis PyV regionas pasižymi įvairiomis T antigenų variacijomis. Manoma, kad daugelis šių baltymų dalyvauja viruso infekcinio ciklo valdyme, vėžinėje ląstelių transformacijoje. Daugiausiai ištirti čia koduojami *Alphapolyomavirus* genčiai būdingi ALTO (alternatyvus T antigeno atviras skaitymo rėmelis, angl. *alternative T open reading frame*) ir mTag (vidurinis T antigenas, angl. *middle T-antigen*) baltymai. ALTO būdingas žmogaus TS, NJ ir Merkelio ląstelių poliomos virusams. Šis ASR taip pat koduoja antrąjį mTag egzoną ir, alternatyviu skaitymo rėmeliu, persidengia su antruoju LTag egzonu (van der Meijden ir Feltkamp, 2018). mTag būdingas graužikų ir žmogaus TS ir STL PyV. SV40 PyV ankstyvajame regione koduoja ir baltymą, kurio molekulinė masė 17 kDa. Šio baltymo, pavadinto 17kT, N-galo aminorūgščių seka sutampa su LTag, o karboksi-galo ar. yra unikalios ir koduojamos kitame skaitymo rėmelyje (Zerrahn ir kt., 1993).

SV40, BK, JC ir kai kuriems kitiems poliomos virusams yra būdingas Agno baltymas, koduojamas vėlyvajame regione (Suzuki ir kt., 2010). SV40 ir paukščių poliomos viruso genomams būdingas dar vienas elementas – VP4 baltymo genas. Paukščių VP4 baltymas yra viruso kapsidės sudedamoji dalis. SV40 VP4 baltymai nėra jungiami į viruso kapsidę, tačiau yra svarbūs reguliuojant viruso genų raišką, viriono susirinkimą ir ląstelės lizę (Suzuki ir kt., 2010; Johannessen

ir kt., 2011; Sariyer ir kt., 2011). Manoma, kad jie atlieka viroporinų – mažų hidrofobinių baltymų, besioligomerizuojančių šeimininko ląstelių membranose (Nieva ir kt., 2012) – funkcijas. Viroporinai šeimininkų ląstelėse formuoja hidrofilines poras, paveikiančias įvairius viruso gyvenimo ciklo etapus, įskaitant naujų virusų išėjimą iš ląstelės (Daniels ir Hebert, 2020).

### 1.3 lentelė. Kai kurių poliomos virusų papildomų ir alternatyvių skaitymo rėmelių produktai ir funkcijos

EgouPyV1 – *Erythrura gouldiae polyomavirus 1*, HunFPyV – *Lonchura maja polyomavirus 1*; SaurPyV1 – *Sparus aurata polyomavirus 1*. Lentelė paruošta pagal (Korup-Schulz ir kt., 2017; Saribas ir kt., 2019; Daniels ir Hebert, 2020; ICTV, talk.ictvonline.org).

Baltymas	Funkcija	Poliomos virusas												
		Primatų	Pelių	Žmogaus					Paukščių			Žuvų		
		SV40	MPyV	BKPyV	JCPyV	MCPyV	TSPyV	STLPyV	APyV	EgouPyV1	HunFPyV	BassPyV	SaurPyV1	
<b>Ankstyvasis regionas</b>														
<b>MTAg</b>	Jungiasi ir aktyvuoja sarkomos (Src) šeimos baltymų tirozino kinazės priklausomai nuo baltymų fosfatazės 2A (PP2A) ir tokiu būdu stimuliuoja Src signalinį kelią ląstelių transformacijos metu; svarbus viruso evoliucijai ir prisitaikymui prie šeimininko		x											
<b>ALTO</b>	Dalyvauja viruso infekciniame cikle; svarbus viruso evoliucijai ir prisitaikymui prie šeimininko					x	x							
<b>T'135</b>	Gali dalyvauti ląstelių transformacijoje per sąveiką su naviką slopinančiais baltymais p107 ir p130				x									
<b>T'136</b>				x	x									
<b>T'165</b>					x									
<b>229T</b>								x						
<b>64kT</b>	Galimai dalyvauja ląstelių transformacijoje					x								
<b>57kT</b>						x								
<b>21kT</b>						x	x							
<b>17kT</b>		x		x										
<b>9kT</b>						x								
<b>Tiny T</b>	Lokalizuojasi tiek citoplazmoje, tiek branduolyje ir stimuliuoja Hsp70 ATFazės aktyvumą per savo DnaJ motyvą		x											



Vėlyvasis regionas												
<b>ORF1</b>	Sutrikdžius šių ASR JCPyV raišką mutantiniai virusai replikuojasi ne taip efektyviai kaip laukinio tipo, tai rodo, kad šie ASR gali atlikti svarbų reguliacinį vaidmenį viruso gyvenimo cikle.											
<b>ORF2</b>												
<b>VP4</b>	Paukščių – struktūrinis baltymas; SV40 - viroporinas, dalyvauja virusų paleidime iš ląstelės	x		x	x					x		x
<b>VP4D</b>										x		
<b>Agno</b>	Dalyvauja viruso infekciniame cikle, virionų paleidime iš ląstelės, kapsidės susirinkime. Agno baltymas išskiriamas iš jį produkuojančių ląstelių santykinai reikšmingais kiekiais ir sąveikauja su dar nenustatytais ląstelės paviršiaus komponentais. Šių procesų biologinė prasmė dar nežinoma.	x		x	x							
<b>ORF-X</b>	Nežinoma										x	x

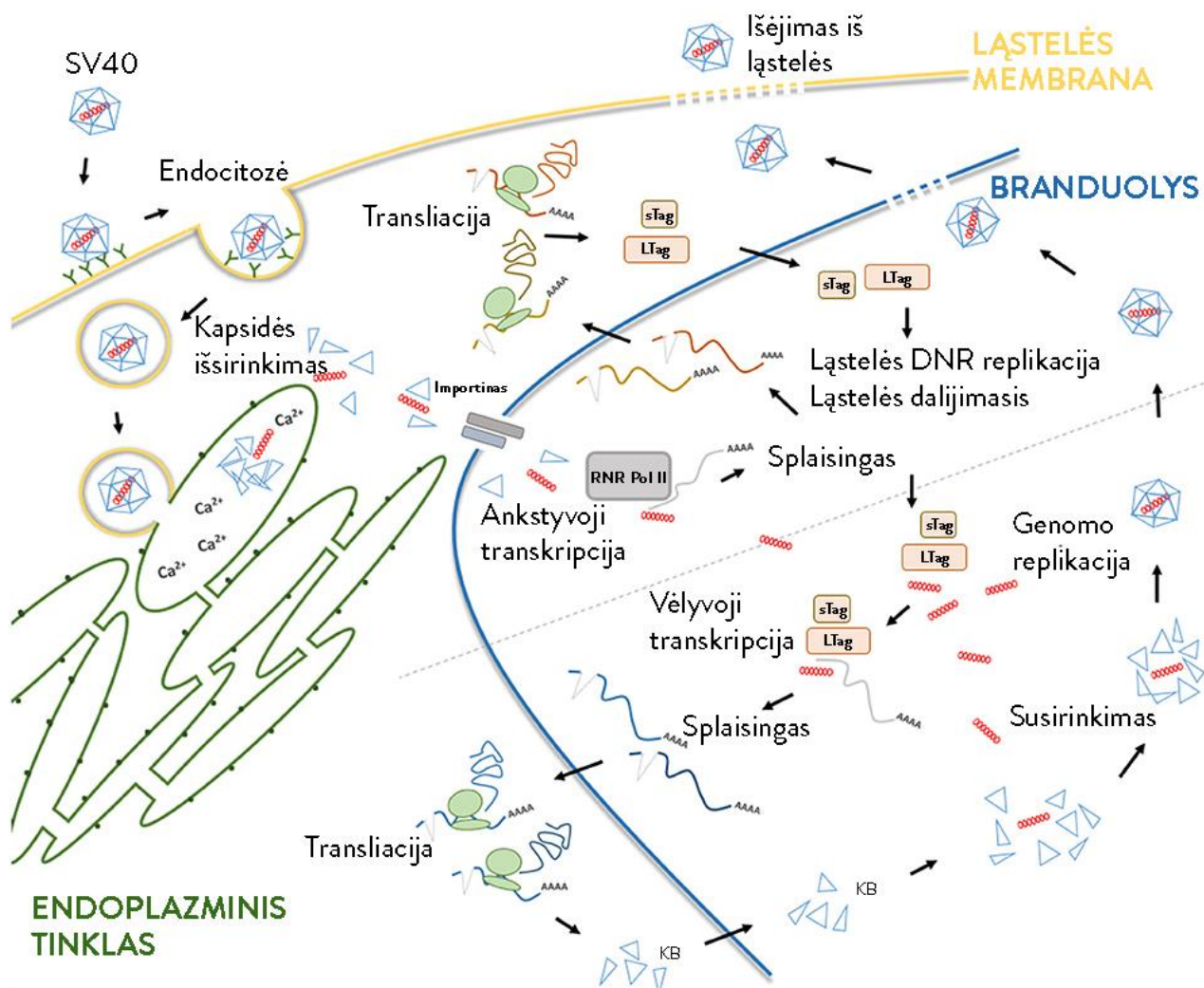
PyV koduoja ir mažąsias RNR (miRNR). Pavyzdžiui, JC, BK ir SV40 PyV koduoja miRNR LTag geno 3' gale priešinga jam kryptimi, o MCPyV ir MPyV – 5' gale, taip pat priešinga LTag genui kryptimi. Jos gali reguliuoti tiek paties viruso T antigenų, tiek šeimininko genų raišką, tačiau tikslūs jų veikimo mechanizmai dar mažai ištirti. Manoma, kad jos dalyvauja viruso ciklo reguliacijoje, ypač perėjime į latentinę infekciją. Yra žinoma, kad PyV miRNR sumažina viruso kopijų skaičių latentinės infekcijos metu natūraliame šeimininke (Lagatie ir kt., 2013; Burke ir kt., 2018).

## 1.5 Poliomos virusų infekcinis ciklas

### 1.5.1 Virusų patekimas į ląstelę

Infekuodami ląstelę, virusai pirmiausia prisijungia prie ląstelės membranos receptorių, taip sužadindami signalinius kelius. Daugelis virusų, tokių kaip ŽIV (žmogaus imunodeficitas), žmonių poliovirusas, sąveikauja tik su plazmine membrana arba endolizosomomis, poliomos virusai dar sąveikauja ir su endoplazminio tinklo (ET) membrana (Inoue ir Tsai, 2013). Unikali poliomos virusų sąveika su ET buvo nustatyta naudojant elektroninę mikroskopiją 1989 metais (Kartenbeck ir kt., 1989).

PyV paprastai patenka į ląsteles per kaveolių struktūras, esančias šeimininko plazminėje membranoje (Bhattacharjee ir Chattaraj, 2017). Kai kurie PyV geba į ląstelę patekti ne per kaveoles, nuo cholesterolio priklausomu būdu. JCPyV į ląsteles patenka per klatrino pūsleles, MCPyV – kaveolių/lipidinių plaustų endocitozės, bet ne nuo klatrino priklausomos endocitozės būdu (Becker ir kt., 2019). Endocituotos pūslelės per citoplazmą keliauja mikrovamzdeliais, kol pasiekia vėlyvąją endosomą ar kaveosomą. Iš ten virusai patenka į ET (1.6 pav.).



### 1.6 pav. SV40 poliomos viruso infekcinio ciklo schema

SV40 infekcinis ciklas prasideda viruso kapsidės pritvirtinimu prie infekuojamos ląstelės paviršiaus, virusas į ląstelę patenka per lipidinių plaustų reguliuojamą endocitozę. Virionas pūslelių transportu pernešamas iki ET, kur prasideda kapsidės irimo procesas. Atidengiamos kapsidės baltymų NLS, apirusi nukleokapsidė transportuojama į branduolį. SV40 genomams patekus į branduolį ląstelinė RNR polimerazė II vykdo ankstyvąją viruso transkripciją. Vyksta ankstyvosios iRNR splaisingas į LTag ir sTag iRNR. Šios iRNR citozolyje virsta atitinkamais baltymais. LTag ir sTag keliauja į branduolį ir įjungia ląstelių perėjimą iš G1 į S fazę. Tuo pačiu metu LTag ir sTag skatina SV40 genomo replikaciją. Perėjimas nuo ankstyvosios į vėlyvąją fazę SV40 infekcijos metu prasideda viruso DNR replikacijos pabaigoje. Po sintezės vėlyvieji viruso baltymai (kapsidės baltymai – KB) kaupiasi citoplazmoje, migruoja į branduolį ir supakuoja replikuotą virusinę DNR, sudarydami virusus. Galiausiai ląstelių lizės metu susidarę virusai išsina iš ląstelės. Pagal (Rotondo ir kt., 2019)

Inicijuojant infekciją, PyV jungiasi prie plazminės membranos receptorių, vadinamų gangliozidais (Bhattacharjee ir Chattaraj, 2017). Gangliozidai – tai glikolipidai, turintys vieną ar daugiau prie angliavandenių prijungtų sialo rūgščių (pavyzdžiui, N-acetilneuramininė rūgštis, NANA). Gangliozidai tarpusavyje dažniausiai skiriasi prijungtų sialo rūgšties liekanų kiekiu ir pozicija. Prie šių liekanų jungiasi PyV VP1 baltymas. Nuo VP1 baltymo specifiškumo priklauso, kokias ląsteles virusas geba infekuoti. Kadangi dėl pailgėjusios HI kilpos HPyV7 ir HPyV6 poliomos virusų VP1 baltymo erdvinė struktūra pakitusi, jie negali prisijungti sialo rūgšties ir greičiausiai naudoja kitokius receptorių. Kaip viruso kapsidės koreceptorius veikia ir didysis suderinamumo kompleksas I (angl. *major histocompatibility complex, MHC*).

PyV patekus į ET, ardami kapsidės disulfidiniai tilteliai ir pakeičiama VP1 baltymo konformacija, kad į išorę išlįstų VP2/3 baltymai ir virusas taptų hidrofobiškas. Jis išlaikomas tirpios būsenos, prie jo prisijungus Hsp70 (angl. *70 kilodalton heat shock protein*) šaperonams. Tuomet struktūriškai pakitęs hidrofobiškas virusas prasiskverbia pro lipidų dvisluoksnį į ET išorę. Galiausiai virusas atpalaiduojamas nuo membranos ir paleidžiamas į citozolį. Tam galimai padeda Hsp70 šaperonų sąveikos su ET membranos citozoline puse (Inoue ir Tsai, 2013). Dauguma RNR virusų replikuoja citozolyje, o DNR virusai, taip pat ir PyV, replikacijai keliauja į branduolį (Mercer ir kt., 2010) (žr. **1.6 pav.**).

### 1.5.2 Transkripcija, replikacija ir viriono susirinkimas

Pernešimui į branduolį PyV turi specifinius nukreipimo į branduolį signalus – NLS (angl. *nuclear localization signal*). Tai kelių aminorūgščių, paprastai turinčių teigiamą krūvį lizinų ar argininų, seka, esanti baltymo išorėje, padedanti jam patekti į branduolį per branduolio transporto mechanizmus. Mažos molekulės į branduolį ir iš jo gali keliauti laisvai per branduolio poras. Didesnėms nei 45 kDa molekulėms reikalingi specifiniai pernešantys baltymai – importinai (į branduolį) ir eksportinai (iš branduolio). Atidengtos NLS sekos fosforilamos kinazių ir taip tampa lengviau atpažįstamos importinų. Transportui naudojama GTP energija. ET dalinai išardytas virusas paviršiuje eksponuoja kapsidės baltymų NLS sekas, jos atpažįstamos branduolio importinų ir virionas su nukleorūgštimi pernešamas į branduolį (Bhattacharjee ir Chattaraj, 2017) (žr. **1.6 pav.**). Vis dėlto, galbūt galimi ir kitokie PyV DNR patekimo į branduolį variantai.

Į branduolį nugabenta virusinė DNR transkribuojama ir replikuojama. Pirmiausia vyksta NKKR valdoma T antigenų regiono genų raiška. Esant mažoms LTag koncentracijoms, šis baltymas užima didelio afiniškumo LTag surišimo motyvus ir kartu su ląstelių baltymais skatina ankstyvą transkripciją. LTag koncentracija didėja ir baltymas ima sąveikauti su mažesnio

afiniškumo NKKR motyvais, užkirsdamas kelią tolimesnei savo paties geno (ankstyvojo regiono) transkripcijai ir paskatindamas replikaciją bei vėlyvojo regiono transkripciją. Daugėjant viruso genomo kopijų, ląstelės represoriniai baltymai nebesugeba slopinti visų vėlyvųjų promotorių, tad vėlyvųjų genų raiška irgi ima sparčiai didėti. Replikacijai būtinas tik viruso LTag baltymas, kiti replikacijoje dalyvaujantys baltymai yra „pasiskolinami“ iš ląstelės šeimininkės (Sowd ir Fanning, 2012). DnaJ motyvas LTag N-galo dalyje bei ATFazės/helikazės aktyvumas yra būtini veiksmingai virusinės DNR replikacijai. DnaJ jungiasi prie Hsc70 šaperono, turinčio ATFazės aktyvumą. Taip stimuliuojamas pRb:E2F komplekso suardymas, leidžiantis perėjimą į S fazę. Konservatyvus DnaJ HPDKGG motyvas yra aptinkamas beveik visuose PyV. Kitas konservatyvus LTag motyvas – OBD (angl. *origin binding domain*) – sąveikauja su viruso Ori sritimi ir inicijuoja replikaciją. LTag ATFazės aktyvumas reikalingas DNR elongacijai, o helikazės aktyvumas padeda išvynioti dvigrandinę DNR spiralę ir leidžia tęstis DNR replikacijos iniciacijai (Moens, Krumbholz et al., 2017). LTag taip pat jungiasi prie naviko supresorinių baltymų p53 ir retinoblastomos šeimos baltymų ir taip skatina ląstelės perėjimą į S fazę.

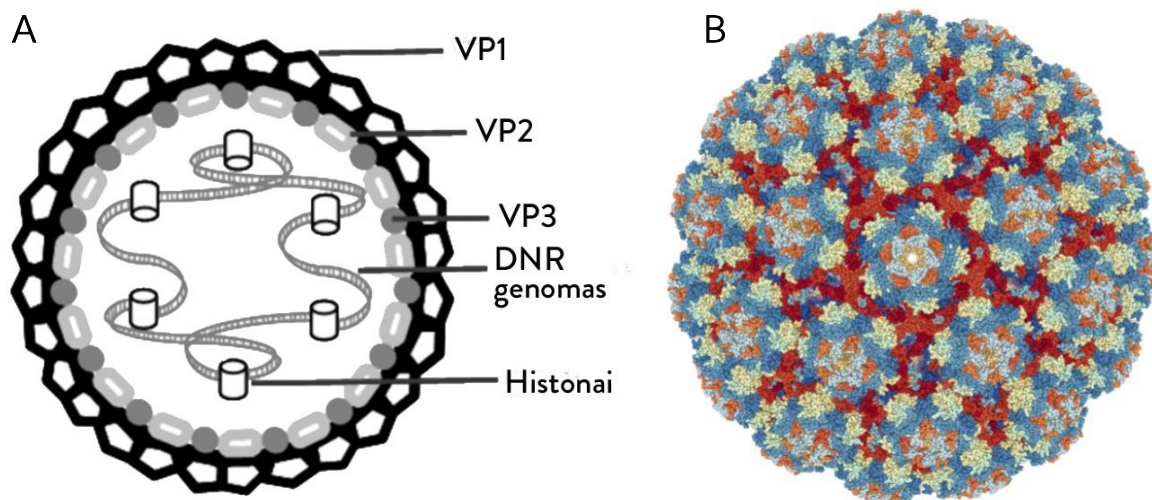
Susintetinti baltymai ir DNR kopija branduolyje susirenka į virioną (žr. **1.6 pav.**) Nauji virusai išeina iš ląstelės tiek po ląstelių lizės, tiek nesuardydami ląstelės (Moens, Krumbholz et al., 2017). Tiriamas ir anksčiau minėtų viroporinų vaidmuo.

## 1.6 Poliomos virusų viriono struktūra

Poliomos virusų virionai neturi lipidinio apvalkalo, jų kapsidė sudaryta iš trijų baltymų – VP1, VP2 ir VP3. Pagrindinis kapsidės baltymas – VP1. Virusų kapsidės viduje talpinama DNR dėl savo panašumo į chromosomą infekuotose ląstelėse vadinama minichromosoma (**1.7 pav. A**). Poliomos virusų genomai saugomi su ląsteliniiais histoniniais baltymais H2A, H2B, H3 ir H4, todėl virusinė DNR formuoja į chromatiną panašią struktūrą. Dėl į šį chromatiną neįjungiamo H1 histono, virusinė DNR nėra maksimaliai kompaktizuota (Stehle ir Harrison, 1996). Viriono skersmuo siekia 40–50 nm.

*Polyomaviridae* šeimos virusų kapsidės VP1 baltymas sudaro visą viriono išorinį sluoksnį. Viriono kapsidė sudaryta iš 72 VP1 kapsomerų, susijungiančių į  $T = 7d$  simetrijos ikosaedrinę struktūrą. Iki MPyV kapsidės struktūros nustatymo kristalografijos būdu 1982 m. (Rayment ir kt., 1982) buvo manoma, kad poliomos virusams būdingos kapsidės, susidedančios iš 12 pentamerinių ir 60 heksamerinių vienetų. Tačiau kristalografijos duomenys parodė, kad visi kapsidės dedamieji elementai kapsomerai yra pentamerai, tačiau 12 jų yra penkiavalečiai – t. y.,

jungiasi su penkiais gretimais kapsomerais, o likę 60 – heksavalenčiai – jungiasi su šešiais kaimyniniais kapsomerais (**1.7 pav. B**).



### 1.7 pav. Poliomos viruso viriono struktūros schema ir trijų dimensijų modelis

**A** VP1 baltymai išsidėsto išorėje, VP2 ir VP3 baltymai su jais sąveikauja iš vidaus. Kapsidės viduje saugoma virusinė DNR, susijungusi su histoniniais baltymais. **B** Pagal kristalografijos duomenis atkurta MPyV kapsidės erdvinė  $T = 7d$  simetrijos ikosaedrinė struktūra (Stehle ir Harrison, 1996). VP1 baltymo monomerai nuspalvinti skirtingomis spalvomis.

Kiekvienas kapsomeras sudarytas iš penkių  $\beta$ -statinaitės struktūros VP1 baltymo monomerų. VP1 baltymai tarpusavyje sąveikauja C-galu: C-galo „ranka“ įlenda į kito pentamero vidų ir sąveikauja su jo N-galu, kuris sutvirtina prisijungusią grandinę ir pasisuka link kapsidės viduje esančios DNR. Šias sąveikas sutvirtina  $Ca^{+}$  jonai ir disulfidiniai tilteliai (Ishizu ir kt., 2001). Prie kiekvieno VP1 kapsomero iš vidinės pusės jungiasi VP2 arba VP3 baltymai. Pilna VP3 baltymo ar. seka atitinka du trečdalius VP2 baltymo ar. sekos nuo C-galo. MPyV VP2 ir VP3 baltymų vienodame C-gale esanti 42 ar. seka lemia jų sąveiką su VP1 pentameriais (Barouch ir Harrison, 1994).

## 1.7 Žmogaus poliomos virusai

Šiuo metu yra žinoma 13 ŽPyV (Calvignac-Spencer ir kt., 2016). Po pirmųjų ŽPyV BK ir JC atradimo 1971 metais, naujų žmogaus poliomos virusų nebuvo atrasta beveik keturis dešimtmečius. Smarkiai patobulėjus molekulinės diagnostikos metodams 2007–2017 metais buvo atrasta 11 ŽPyV. Šie virusai literatūroje dažnai yra vadinami naujais (angl. *novel*) žmogaus poliomos virusais (žr. **1.4 lentelė**). 2013 metais žmonių kepenų mėginiuose buvo aptiktas naujas poliomos virusas, pavadintas žmogaus 12 poliomos virusu (Korup ir kt., 2013). 2017 m. PyV sekos, pasižyminčios 81–99 % identiškumu HPyV12 buvo rastos trijų rūšių kirstukų (*Sorex spp.*)

mėginiuose (Gedvilaite ir kt., 2017). Netrukus po to, 2018 metais, HPyV12 buvo pervadintas į *Sorex araneus* poliomos virusą 1 ir pašalintas iš žmonių PyV sąrašo (ICTV, talk.ictvonline.org).

ŽPyV plačiai paplitę žmonių populiacijose (**1.4 lentelė**). Manoma, kad jie plinta tiesioginio žmogaus-žmogaus kontakto metu, per užkrėtus paviršius, maistą, vandenį. Serologinis PyV paplitimas šiek tiek skiriasi įvairiose populiacijose, tačiau dauguma žmonių poliomos virusų paplitę gausiai. PyV gausiau paplitę tarp vyresnio amžiaus žmonių nei tarp vaikų, be to, vyresnio amžiaus individams būdingas serologinis atsakas didesnei PyV įvairovei. Pagal 2018 m. Nyderlanduose atliktą tyrimą, kiekvienas suaugęs žmogus vidutiniškai turėjo antikūnų prieš 9 poliomos virusus (Kamminga ir kt., 2018). Toje pačioje tiriamųjų grupėje atlikus PyV DNR paiešką, ji buvo aptikta tik 5,4 % tiriamųjų, o daugiau nei vieno PyV nukleorūgštis buvo aptikta tik 0,4 % tiriamųjų (Kamminga ir kt., 2019). Žinoma, kad JC ir BK poliomos virusais motina gali užkrėsti kūdikį dar nėštumo metu arba labai greitai po gimdymo (Boldorini ir kt., 2011), tačiau BK poliomos virusas, infekuojantis žmones labai ankstyvame amžiuje, didžiausią serologinį paplitimą pasiekia iki 40 m. amžiaus grupėje, vėlesniame amžiuje paplitimas ima mažėti. JC serologinis paplitimas stabiliai auga su tiriamųjų amžiumi (Rinaldo ir Hirsch, 2013). Serologinio paplitimo mažėjimas didėjant tiriamųjų amžiui pastebėtas ir KI, TS bei MW poliomos virusų atvejais (Kamminga ir kt., 2018). Kitų poliomos virusų serologinis paplitimas didėja didėjant tiriamųjų amžiui, pavyzdžiui, 2011 m. atliktas tyrimas parodė, kad MCPyV serologinis paplitimas tarp vaikų iki 10 metų – 45 %, 60 % tarp 10–20 metų tiriamųjų ir 81 % tarp 60–69 metų amžiaus tiriamųjų (Viscidi ir kt., 2011).

Kai kurių žmogaus poliomos virusų aptinkamas serologinis paplitimas, lyginant su kitų, labai mažas – NJPyV (5,2 %) ir LIPyV (5,9 %) (Kamminga ir kt., 2018). Kamminga ir kolegos ištyrė ir buvusio HPyV12 paplitimą – jis taip pat buvo itin žemas, serologinis atsakas aptiktas 4 % visų tiriamųjų. Tiriant japonų populiaciją, NJPyV serologinis paplitimas 1–70 metų amžiaus tiriamuosiuose siekė vos 1,8 % (Zhou ir kt., 2019). PyV, kurio DNR seka 98 % sutapo su anksčiau aptikta žmogaus LIPyV genomo seka, buvo aptiktas trijų kačių išmatų mėginiuose porą metų po šio viruso atradimo žmoguje (Fahsbender ir kt., 2019). NJPyV pirmą kartą buvo aptiktas 33 metų kasos transplantacijos pacientės, kuriai išsivystė silpnumas, tinklainės aklumas ir nekrozinės plokštelės ant veido, galvos ir rankų odos, biopsijos mėginiuose. Požymiai pacientei pasireiškė po pasitraukimo antisanitarinėmis sąlygomis iš uragano Sendės (angl. *Superstorm Sandy*) paveiktos teritorijos (Mishra ir kt., 2014). Tai yra vienintelis iki šiol aptiktas NJPyV genomas. Gali būti, kad, kaip ir HPyV12 atveju, NJ ir LI poliomos virusų pirminis šeimininkas nėra žmogus ir žmonių populiaciją šie virusai infekavo sąlyginai neseniai. Vis dėlto įdomu, kad Italijos tiriamųjų

populiacijoje HPyV12 ir NJPyV serologinis paplitimas buvo gerokai aukštesnis, nei nustatytas kitų tyrimų metu – iki 97,3 % ir 57,5 % atitinkamai (Gaboriaud ir kt., 2018).

#### 1.4 lentelė. Žmogaus poliomos virusai

Paplitimas – PyV serologinis paplitimas tarp sveikų suaugusiųjų olandų kraujo donorų pagal (Kamminga ir kt., 2018)

Rūšis	Gentis	Viruso pavadinimas	Santrumpa	Atrastas	Paplitimas, proc.
<i>Human polyomavirus 1</i>	<i>Beta</i>	BK poliomos virusas	BKPyV	<b>1971</b> (Gardner ir kt., 1971)	98,9
<i>Human polyomavirus 2</i>	<i>Beta</i>	JC poliomos virusas	JCPyV	<b>1971</b> (Padgett ir kt., 1971)	63,2
<i>Human polyomavirus 3</i>	<i>Beta</i>	Karolinskos instituto poliomos virusas	KIPyV	<b>2007</b> (Allander ir kt., 2007)	91,6
<i>Human polyomavirus 4</i>	<i>Beta</i>	Vašingtono universiteto poliomos virusas	WUPyV	<b>2007</b> (Gaynor ir kt., 2007)	98,9
<i>Human polyomavirus 5</i>	<i>Alpha</i>	Merkelio ląstelių poliomos virusas	MCPyV	<b>2008</b> (Feng ir kt., 2008)	81,9
<i>Human polyomavirus 6</i>	<i>Delta</i>	Žmogaus poliomos 6 virusas	HPyV6	<b>2010</b> (Schowalter ir kt., 2010)	83,8
<i>Human polyomavirus 7</i>	<i>Delta</i>	Žmogaus poliomos 7 virusas	HPyV7	<b>2010</b> (Schowalter ir kt., 2010)	71,7
<i>Human polyomavirus 8</i>	<i>Alpha</i>	Trichodysplasia spinulosa poliomos virusas	TSPyV	<b>2010</b> (van der Meijden ir kt., 2010)	79,6
<i>Human polyomavirus 9</i>	<i>Alpha</i>	Žmogaus poliomos 9 virusas	HPyv9	<b>2011</b> (Scuda ir kt., 2011)	19,2
<i>Human polyomavirus 10</i>	<i>Delta</i>	Malavio poliomos virusas	MWPyV	<b>2012</b> (Siebrasse ir kt., 2012)	99,5
<i>Human polyomavirus 11</i>	<i>Delta</i>	Sent Luiso poliomos virusas	STLPyV	<b>2013</b> (Lim ir kt., 2013)	64,8
<i>Human polyomavirus 13</i>	<i>Alpha</i>	Naujojo Džersio poliomos virusas	NJPyV	<b>2014</b> (Mishra ir kt., 2014)	5,2
<i>Human polyomavirus 14</i>	<i>Alpha</i>	Liono IARC poliomos virusas	LIPyV	<b>2017</b> (Gheit ir kt., 2017)	5,9

#### 1.8 Poliomos virusai ir ligos

ŽPyV yra randami daugelio žmonių plaučiuose, virškinamajame trakte, ant odos, šlapime ir išmatose, tačiau sveikiems žmonėms jie paprastai nesukelia klinikinių simptomų. Ligos

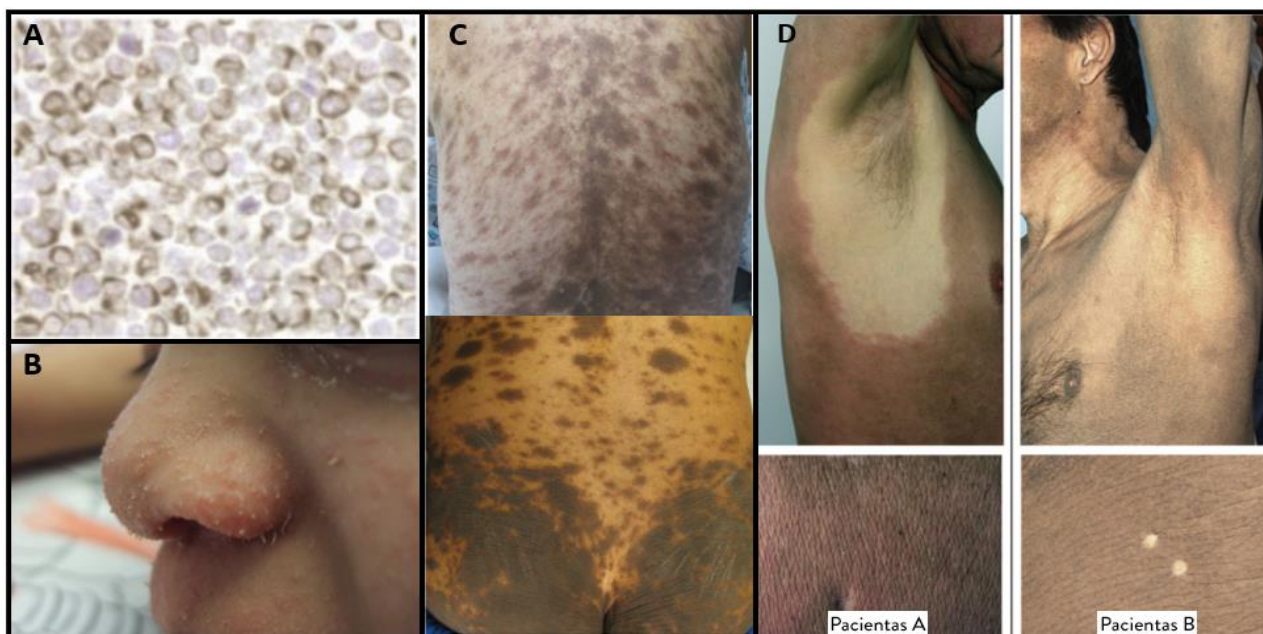
apraškos atsiranda pacientams, turintiems susilpnėjusį ar pakitusį imunitetą – sergant AIDS, vėžiu, kitomis imunitetą pažeidžiančiomis ligomis ar esant tam tikrai organizmo būklei, pavyzdžiui, nėštumui, vartojant imunitetą silpninančius vaistus po organų transplantacijos. Vis dėlto, pastaruoju metu vis daugiau kalbama apie PyV poveikį žmonių sveikatai ir randama vis daugiau poliomos virusų sąsajų su įvairiomis ligomis.

Pirmą kartą poliomos virusų keliamą grėsmę žmonių sveikatai buvo susirūpinta dar 1960 m., atradus primatų SV40 poliomos virusą. Virusas buvo aptiktas makakų inkstų ląstelių kultūrose, kurios buvo naudojamos poliomiolito ir kitoms vakcinoms gaminti. Net 10–30 % visų poliomiolito vakcinų JAV, gamintų makakų inkstų ląstelių kultūrose, turėjo SV40 viruso priemaišų (Sweet ir Hilleman, 1960) ir jomis 1955–1963 metais buvo paskiepyti 98 milijonai JAV gyventojų (90 % visų vaikų ir 60 % suaugusiųjų). Buvusioje Sovietų Sąjungoje, Rytų Europoje, kai kuriose Azijos ir Afrikos šalyse SV40 užterštos vakcinos galimai buvo naudojamos iki 1978 m., nes buvo pasirinktas neveiksmingas metodas SV40 deaktyvacijai (Cutrone ir kt., 2005). Paskiepytieji buvo galimai užkrėsti SV40 (Shah ir Nathanson, 1976), todėl atsirado poreikis ištirti SV40 poveikį žmonėms. Įvairių tyrimų metu nustatyta, kad skirtingose žmonių populiacijose antikūnų prieš SV40 turi iki 20 % tiriamųjų (Rotondo ir kt., 2019). Buvo nustatytos žmogaus ląstelių transformacijos *in vitro*, jas infekavus SV40 (Shein ir Enders, 1962; Koprowski ir kt., 1963; Ponten ir kt., 1963). Šios ląstelės, implantuotos nepagydomai sergantiems savanoriams, sukėlė auglių augimą (Jensen ir kt., 1963). Vėliau SV40 DNR, RNR, baltymai ir anti-SV40 antikūnai buvo rasti įvairių žmogaus auglių tipų – ependimomos, smegenų gyslinio audinio, mezoteliomos, osteosarkomos ir sarkomos, krūties vėžio, limfomos, leukemijos ir kitų – mėginiuose, tačiau realus SV40 poliomos kancerogeniškas poveikis žmogui iki šiol nėra patvirtintas (Carbone ir kt., 1997; Dang-Tan ir kt., 2004; Bouvard ir kt., 2012; Rotondo ir kt., 2019). Svarstomos ir SV40 sąsajos su inkstų ligomis bei išsėtine skleroze, tačiau tokias sąsajas patvirtinančių duomenų trūksta (Rotondo ir kt., 2019).

Pirmieji žmogaus PyV – JC ir BK – buvo atrasti sunkiai sergančiuose pacientuose. Šių PyV sukeltos ligos nebuvo vėžinės – JCPyV sukėlė progresuojančią daugiažidininę leukoencefalopatiją, o BK poliomos virusas – šlapimtakio obstrukciją (Gardner ir kt., 1971; Padgett ir kt., 1971; Assetta ir Atwood, 2017; Pietropaolo ir kt., 2018). Kol kas su konkrečiomis ligomis susieti keturi iš naujų ŽPyV – MCPyV, TSPyV, HPyV7 ir HPyV6. Kitų PyV sąsajos su ligomis taip pat svarstomos. MCPyV sukelia agresyvią odos vėžio formą – Merkelio ląstelių karcinomą (Feng ir kt., 2008) (**1.8 pav. A**). TSPyV sukelia Trichodysplasia spinulosa – labai retą odos ligą, pasireiškiančią imunosupresijos sąlygomis. Ligai būdingi požymiai – keratino išaugų bei folikulinių mazgelių susidarymas veido srityje, odos sustorėjimas (Matthews ir kt., 2011) (**1.8 pav. B**). 2015 m. su klinikiniais požymiais buvo susietas ir HPyV7. Dviem pacientams, kuriems po plaučių



persodinimo buvo taikoma imunosupresinė terapija, ant nugaros išsivystė niežtinčios sukietėjusios rudos spalvos plokštelės ir epidermio hiperplazija (Ho ir kt., 2015) (**1.8 pav. C**). 2016 metų gruodį buvo nustatyta ir HPyV6 sąsaja su odos pakitimais. HPyV6 buvo aptiktas dviejų vyrų, kenčiančių nuo niežtinčių, gausių bėrimų, mėginiuose. Įdomu, kad vienas iš pacientų tyrimo metu nebuvo imunosupresuotas, tačiau nedaug laiko prieš tyrimą buvo keletą kartų hospitalizuotas dėl įvairių infekcijų. HPyV6 ir HPyV7 sukeltus odos pakitimus buvo pasiūlyta apibūdinti kaip niežtinčią diskeratotinę dermatozę (Nguyen ir kt., 2016; Sheu ir kt., 2019) (**1.8 pav. D**). 2016 m WU ir KI poliomos virusai buvo susieti su kvėpavimo takų ligomis (Dehority ir kt., 2016; Siebrasse ir kt., 2016). Bent 7 iš šiuo metu žinomų ŽPyV – Ts, 6, 7, MC, JC, BK ir MW – buvo išskirti iš įvairių vėžinių mėginių, tačiau svarių įrodymų dėl vežinio susirgimo kilmės turima tik MCPyV atveju (Prado ir kt., 2018). Iki šiol visi nustatyti PyV susirgimai pasireiškia tik pacientui esant imunosupresijos arba sutrikusio imuniteto būsenoje.



### 1.8 pav. Poliomos virusų sukeltų susirgimų pasireiškimo iliustracijos

**A** Merkelio ląstelių karcinoma – agresyvus odos vėžys, sukiamas MCPyV. Nuo kitų mažų apvalialąstelių vėžių atskiriamas pagal citokeratino 20 markerius. Nuotraukoje citokeratino 20 dažymas, padidinimas 40×(Feng ir kt., 2008). **B** Trichodysplasia spinulosa – su imunosupresija siejama liga, sukeliama TSPyV. Būdingos smulkios keratininės išaugos ant veido, ausų odos (Matthews ir kt., 2011). **C** Ant pacientų nugaros išsivystę niežtinčios sukietėję rudos spalvos bėrimai, sukelti HPyV7 infekcijos (Ho ir kt., 2015). **D** Ištinisiai, ilgalaikiai HPyV6 sukelti bėrimai, išsivystę pacientams A, kuriam nebuvo taikoma imunosupresija, ir B, kuriam imunosupresija buvo taikoma po inkstų/kepenų persodinimo (Nguyen ir kt., 2016).

Gyvūnams poliomos virusai taip pat geba sukelti įvairius susirgimus. PyV buvo aptikti žuvies auksaspalvio sparo (*Sparus aurata*), sergančio žuvų limfocistine liga, mėginiuose (López-Bueno ir kt., 2016), ir didžiojoje gitaržuvėje (*Rhynchobatus djiddensis*), turinčioje daugybinius odos pažeidimus (Buck ir kt., 2016). Neaišku, ar PyV yra šių susirgimų priežastis. Paukščių poliomos

virusai nuo pat savo atradimo buvo žinomi kaip sukeliantys sunkias ligas. Pirmasis paukščių PyV APyV 1981 m. buvo aptiktas tiriant didelį banguotųjų papūgėlių jauniklių mirtingumą, jaunikliai pasižymėjo išsipūtusiu pilveliu, nuplikimu. Buvo nustatyta, kad jauniklių ligą sukelia poliomos virusas (Bernier ir kt., 1981). Vėliau labai panašia genomo seka (99 % panašumas) ir panašiais klinikiniais požymiais pasižymintis virusas aptiktas ir kituose papūginių bei žvirblinių būrių paukščiuose (Johnė ir Müller, 2007). Žasų hemoraginis poliomos virusas (angl. *goose hemorrhagic polyomavirus*, GHPV) sukelia žasų hemoraginį nefritą ir enteritą (Corrand ir kt., 2011). Kiti paukščių poliomos virusai taip pat siejami su paukščių ligomis (Moens, Krumbholz ir kt., 2017).

Žinduolių poliomos virusai taip pat sukelia ligas savo šeimininkams. Meškėnų poliomos virusas meškėnams sukelia smegenų auglius, daugelis žinduolių PyV – jūrų liūto, delfino, afrikinio dramblio, arklių, galvijų – buvo aptikti būtent sergančiuose gyvūnuose (Moens, Krumbholz ir kt., 2017), tačiau reikalingi išsamesni tyrimai, patvirtinantys šių susirgimų ir PyV priežastinį ryšį. Žiurkių PyV 2 (angl. *Rattus norvegicus polyomavirus 2*) laboratorinėms su X chromosoma susijusiu sunkiu imunonepakankamumu pasižyminčioms (X-SCID) žiurkėms sukėlė išplitusią įterptinių kūnelių ligą, lėmusią kvėpavimo takų ir inkstų sistemų pažeidimus (Rigatti ir kt., 2016). Žiurkėnų poliomos virusas sukelia limfomas laboratoriniams bei naminiams Siriniams žiurkėnams (*Mesocricetus auratus*) (Muñoz ir kt., 2013; Salas ir Kotschwar, 2014; Moens, Krumbholz ir kt., 2017). Pneumotropinis pelių poliomos virusas pelėms sukelia plaučių pažeidimus (Kilham ir Murphy, 1953). Primatų poliomos virusai paprastai sukelia besimptomės infekcijas, tačiau gali sukelti ligas imunosupresuotiems gyvūnams, pavyzdžiui, SV40 sukelia PML rezus makakoms, infekuotoms beždžionių imunodeficito virusu (Moens, Krumbholz ir kt., 2017).

### **1.9 Poliomos virusų zoonozės**

Gyvūnų patogenai gali būti ir žmonių infekcijų šaltinis (Cleveland ir kt., 2001), nes didelė dalis žmones infekuojančių virusų yra zoonoziniai ir gali būti perduodami iš gyvūnų žmonėms (Taylor ir kt., 2001). 2017 m. publikuotame tyrime buvo analizuotos zoonozinės sąsajos naudojant duomenis apie 754 žinduolių rūšis iš 15 būrių (14 % pasaulinės žinduolių įvairovės) ir 586 unikalias virusų rūšis (buvo analizuotas kiekvienas pripažintas virusas, rastas žinduoliuose). Iš 586 tirtų žinduolių virusų 263 (44,8 %) buvo aptikti žmonėse. Iš jų 75 yra išimtinai žmogaus virusai ir 188 (71,5 %) zoonoziniai – t. y., virusai, kurie buvo bent kartą aptikti žmonėse ir bent kartą kitoje žinduolių rūšyje. Didžiausiu tokių virusų skaičiumi pasižymėjo šikšnosparniai, primatai ir graužikai (Olival ir kt., 2017).

Zoonozinių virusų pavyzdžiai yra ŽIV, Ebola virusai, taip pat koronavirusai, sukėle Artimųjų Rytų, Sunkų ūmų respiracinį sindromą bei COVID-19 (MERS-CoV bei SARS-CoV-1 ir 2) (Zhou ir kt., 2020). Masines epidemijas sukėlė ir gripo infekcijos 2004 ir 2009 metais, kilusios dėl naminių paukščių pernešto H7N7 gripo viruso (Koopmans et al., 2004) bei kiaulių pernešto H1N1 viruso (Dawood et al., 2009). Zoonozinis virusas paprastai būna visiškai nepažįstamas žmogaus imuninei sistemai, todėl lengvai plinta naiviose populiacijose. Pastebėti ir identifikuoti naują patogeną užtrunka, o dar ilgiau užtrunka išsiaiškinti jo patogenezę, epidemiologiją, pritaikyti gydymą ir sukurti strategiją patogeno plitimo stabdymui. Dėl šių priežasčių zoonoziniai virusai gali lengvai sukelti epidemijas ar pandemijas. Akivaizdu, kad zoonozinis virusų potencialas didelis, o kadangi gebėjimas jį nustatyti didėja vystantis technologijoms, atsiranda galimybė numatyti tam tikras būsimas zoonozes ir, galbūt, jų išvengti arba sumažinti jų pasekmes.

Apie PyV zoonozę kalbama vis plačiau, daugėja tyrimų, grindžiančių tokią hipotezę. Akivaizdžiausias PyV zoonozės pavyzdys – beždžionių SV40 virusas, įsitvirtinęs žmonių populiacijose. Šis virusas aptinkamas tiek artimą kontaktą su laukiniais primatais turinčiose žmonių populiacijose, tiek populiacijose, kurios buvo skiepytos SV40 užkrėstomis vakcinomis, tiek populiacijose, kurios neturėjo kontakto nei su laukiniais gyvūnais, nei su užkrėstomis vakcinomis (iki 25 % serologiškai teigiamų mėginių populiacijoje) (Kean ir kt., 2009; Mazzoni ir kt., 2017; Wong ir kt., 2019), vadinasi, virusas geba savarankiškai plisti tarp žmonių. Kitas pavyzdys – HPyV12, kuris buvo atrastas žmonėse ir laikomas žmogaus PyV, tačiau paaiškėjo, kad šiuo virusu žmonės greičiausiai užsikrėtė nuo kirstukų (Gedvilaite ir kt., 2017). Klausimų kelia ir LIPyV bei NJPyV poliomos virusai, kurių serologinis paplitimas žmonių populiacijose labai žemas (aptarta 1.7 skyriuje). Be to, LIPyV buvo aptiktas kačių išmatose, o žmogaus Naujojo Džersio poliomos virusas, nuo jo identifikavimo 2014 m., daugiau nė karto nebuvo aptiktas (Fahsbender ir kt., 2019). Tai gali rodyti, jog žmogus zoonoziškai užsikrėtė šiais virusais nuo jų pradinių šeimininkų, kurie dar nenustatyti.

### **1.10 Poliomos virusų kilmė ir filogenezė**

Manoma, kad virusai nėra kilę iš vieno bendro protėvio, nes jų biologija ir genetika yra per daug skirtingos. Įdomu, kad bakterijoms ir archėjoms beveik išimtinai būdingi dgDNR gan didelio genomo (10–100 kb) virusai, jas infekuojančių RNR virusų žinoma vos keletas. Eukariotai, priešingai, pasižymi gausia RNR virusų įvairove, ypač daug eukariotus infekuojančių virusų turi (+)RNR genomą. Nėra žinoma, kas lemia tokius skirtumus tarp eukariotų ir prokariotų virusų. Galbūt branduolio atsiradimas eukariotinėse ląstelėse smarkiai sumažino dgDNR virusų replikacijos ir transkripcijos efektyvumą dėl atsiradusio papildomo barjero, kurį virusas turi įveikti (Koonin ir

kt., 2015). Yra žinoma, kad tik maža dalis SV40 virionų geba pernešti savo genomą į branduolį (Bhattacharjee ir Chattaraj, 2017). Žiedinės dgDNR eukariotų virusai smarkiai skiriasi nuo kitų dgDNR eukariotų virusų, kuriems būdingas didelis genomai, todėl manoma, kad jie evoliucionavo atskirai nuo pastarųjų.

Artimiausi poliomos virusų giminaičiai yra papilomos virusai, su kuriais PyV dalinasi morfologijos ir geno struktūros panašumais (papilomos virusams taip pat būdingi ankstyvasis ir vėlyvasis regionai, minichromosomų struktūra). Abi virusų šeimos geba transformuoti infekuotas ląsteles. Pagal vieną iš hipotezių, abi šeimos išsivystė iš vgDNR virusų, nes jų kapsidžių baltymų struktūros ir replikacijos baltymai yra homologiški vgDNR virusams, tokiems kaip cirkovirusai, nanovirusai, parvovirusai. LTag turi tipišką 3 helikazės superšeimos motyvą ir riedančio rato replikacijos iniciacijos endonukleazę, nors pastaroji yra inaktyvuota. Šių fermentinių aktyvumų panaikinimas yra susijęs su perėjimu nuo riedančio rato į "teta" tipo replikaciją, tai yra ir nuo vgDNR į dgDNR genomą (Moens, Krumbholz ir kt., 2017). vgDNR virusai, savo ruožtu, galimai išsivystė iš bakterijų plazmidžių (Kazlauskas ir kt., 2019). Įdomu, kad poliomos ir papilomos virusai galimai rekombinavo tarpusavyje ir suformavo šurkščiaplaukį ilganosį bandikutą (*Perameles bougainville*) infekuojančius virusus. Bandikuto virusai koduoja į PyV LTag panašią seką vienoje grandinėje ir į papilomos virusų L1 ir L2 baltymus panašias sekas kitoje (Moens, Krumbholz ir kt., 2017).

Įdomu, kad keturiuose plačiausiai dėl PyV ištirtų žinduolių būriuose (graužikų, šikšnosparnių, primatų ir plėšrūnų) buvo aptikti tiek *Alpha*-, tiek *Betapolyomavirus* genčių atstovai. Turint tai omenyje, būtų galima manyti, kad bendras placentinių žinduolių protėvis turėjo bent du poliomos virusus, iš kurių galėjo kilti *Alpha*- ir *Beta*- poliomos virusai. Kiti žinduolių būriai turi tik po vienos PyV genties atstavą, tačiau tai gali būti susiję su daug mažesnėmis jų ištyrimo apimtimis (Ehlers ir kt., 2019).

Apie poliomos virusų kilmę ir senąją evoliuciją daug įžvalgų suteikė neseniai atrasti žuvų bei nariuotakojų poliomos virusai. Peretti ir kolegos 2015 metais publikavo pirmo žuvų PyV geno seką ir sutrikdė iki tol gyvavusius įsitikinimus, kad poliomos virusai infekuoja tik žinduolius ir paukščius (Peretti ir kt., 2015). 7369 bp PyV genomai buvo aptiktas turguje įsigytame juodajame jūrų ešeryje (*Centropristis striata*). Šio viruso genomai buvo ne tik 1,5 kb didesnis nei iki tol žinomas didžiausias PyV genomai (tuo metu žinomų PyV dydžiai svyravo nuo 4,7 iki 5,7 kb), bet ir buvo filogenetiškai nutolęs nuo kitų PyV, nors atitiko PyV būdingą geno struktūrą. Įdomu, kad viruso didžiojo T antigeno seka pasirodė panašiausia į japoninio unguorio endotelio ląsteles infekuojančio chimerinio viruso koduojamo baltymo seką (angl. *Japanese eel endothelial*

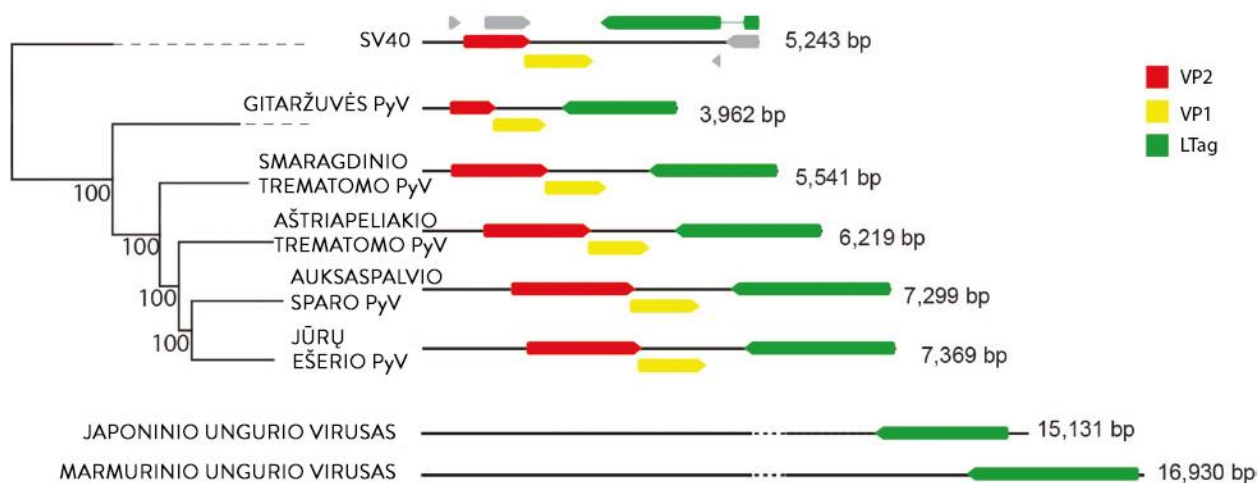
*cells-infecting virus, JEECV*). Šis virusas turi 15 kb dydžio genomą ir koduoja PyV LTag homologišką baltymą (Peretti ir kt., 2015). Vėliau, kai buvo aptikta daugiau panašių virusų žuvyse ir antžeminiuose stuburiniuose, jiems suteiktas *Adomavirus* pavadinimas, nes šie virusai koduoja adenovirusams, poliomos ir papilomos virusams homologiškus baltymus (Welch ir kt., 2019).

2016 metais Buck su kolegomis publikavo dar dviejų žuvų poliomos virusų genomus, aptiktus aštriapeliakiame trematome (*Trematomus pennellii*) ir didžiojoje gitaržuvėje (*Rhynchobatus djiddensis*) bei plačiau aptarė ir anksčiau publikuotą *Centropristis striata* PyV (Buck ir kt., 2016). Gitaržuvės priklauso kremzlinių žuvų Elasmobranchii poklasiui, kartu su rykliais ir rajomis. Manoma, kad Elasmobranchii poklasis ir kauliniai stuburiniai gyvūnai išsiskyrė maždaug prieš pusę milijardo metų. Nors gitaržuvės PyV turi poliomos virusams būdingą struktūrą, jo 3962 bp genomus yra žymiai mažesnis nei 4697 bp galvijų poliomos viruso 1, kuris anksčiau buvo mažiausias žinomas šeimos narys (Buck ir kt., 2016). Praėjus keliems mėnesiams po šios publikacijos, poliomos virusas buvo aptiktas auksaspalvio sparo (lot. *Sparus aurata*), sergančio žuvų limfocistine liga, mėginiuose (López-Bueno ir kt., 2016), o 2018 metais iš smaragdinio trematomo (*Trematomus bernacchii*) buvo išskirtas dar vienas žuvų poliomos virusas. (Van Doorslaer ir kt., 2018).

Remiantis 2018 metais Van Doorslaer ir kolegų atliktu tyrimu, žuvų poliomos virusai priklauso dviem skirtingoms evoliucinėms linijoms (Doorslaer ir kt., 2018). Vienai genčiai priklausančių PyV LTag baltymų sekos sutampa maždaug 60 %, o žemiausias tai pačiai *Alphapolyomavirus* genčiai priklausančių žiurkėno ir paprastojo palminio šikšnosparnio (*Eidolon helvum*) LTag aminorūgščių sekos panašumas – 47,8 %. Visi penki žuvų PyV labai smarkiai skiriasi savo LTag aminorūgščių sekomis – panašiausių jūrų ešerio ir smaragdinio trematomo PyV LTag ar. sekos sutampa tik 46 %. Filogenetinė analizė parodė, kad kaulinių ir kremzlinių žuvų PyV nėra monofiletiniai ir dabartinis PyV filogenetinis medis gali būti suskirstytas į tris pagrindines grupes. Vienoje grupėje yra dabartiniai su kaulinėmis žuvimis susiję PyV, kitoje vienintelis atstovas – kremzlinės gitaržuvės PyV. Trečioje grupėje yra visos kitos pripažintos PyV rūšys (**1.9 pav.**). Tokiam skirstymui prieštarauja iš šikšnosparnio (*Hipposideros pomona*) išskirtas PyV, kuris buvo panašiausias į jūrų ešerio PyV (41 % pagal VP1 ir 37 % pagal LTag baltymų sekas) (Cantalupo ir kt., 2017), taigi būtų priskiriamas kaulinių žuvų PyV grupei. Vis dėlto, nėra aišku, ar tikrai šio viruso šeimininkas yra šikšnosparnis.

Galiausiai PyV sekos buvo aptiktos ir nariuotakojų gyvūnų sekoskaitos duomenyse (Buck ir kt., 2016). Analizuodami GenBank raktažodžių paieškos rezultatus, Buck ir kolegos pastebėjo, kad Pietų Afrikos voro (*Stegodyphus mimosarum*) genomines DNR fragmentas buvo

anototas kaip panašus į PyV LTag. PyV LTag baltymų sekos, įskaitant naujas žuvyse atrastas sekas bei voro sekose aptiktą LTag fragmentą, buvo panaudotos į LTag panašių sekų paieškai ištransliuotų nukleotidų duomenų bazėse. Tokiu būdu buvo aptiktos į LTag panašios sekos dar penkių vorų sekoskaitos duomenyse. Dar keliolika į LTag panašių sekų autoriai identifikavo pirmažandžių būrio (Archaeognatha) vabzdžiuose ir stuburiniuose gyvūnuose – paukščiuose, driežuose. Taip pat buvo išgautas pilnas žiedinis 5419 bp į PyV panašios struktūros genomas iš skorpiono (*Centruroides exilicauda*) sekoskaitos duomenų (Buck ir kt., 2016). Kol kas nėra aptikta daugiau PyV sekų nariutakajuose. Skorpione aptiktas PyV nėra oficialiai priskirtas Polyomaviridae šeimai dėl per mažo struktūrinio panašumo į poliomos virusus (Moens ir kt., 2017).



### 1.9 pav. Žuvų ir SV40 poliomos virusų genomų filogenetinis medis

Kaimynų sujungimo (angl. *neighbour-joining*) filogenetinis medis, sudarytas lyginant žuvų ir SV40 PyV viso genomo sekas. Spalvomis pavaizduota linearizuota kiekvieno genomo schema, išryškinant VP2 (raudona), VP1 (geltona) ir LTag (žalia) atvirus skaitymo rėmelius. Skaičiai nurodo genomo dydį (bp). Pilkos spalvos atviri skaitymo rėmeliai prie SV40 nurodo (iš kairės į dešinę) Agno, VP3, ALTO ir sTag. Pavaizduoti ir su ungueriais susiję virusai (Van Doorslaer ir kt., 2018).

PyV aptikimas žuvyse ir nariutakajuose pakeitė požiūrį į poliomos virusų kilmę ir evoliuciją. Nariutakojai ir žinduoliai atsiskyrė prieš 900 milijonų metų (Wang ir kt., 1999), jų bendras protėvis greičiausiai turėjo bent vieną poliomos virusą, todėl PyV yra senesni nei buvo manyta.

### 1.11 Poliomos virusų ir jų šeimininkų koevoliucija

Daugelis tyrimų rodo, kad DNR virusai yra linkę koevoliucionuoti kartu su savo šeimininkais (Kaján ir kt., 2020). Ne išimtis ir poliomos virusai. Įvairūs tyrimai patvirtina, kad PyV yra konservatyvūs, labai specifiški šeimininkui ir diverguoja kartu su juo. Vis dėlto, 2017 m. publikuotas tyrimas apie viruso/šeimininko kodivergenciją ir šuolius tarp šeimininkų rodo, kad,

nors PyV yra labiau kodiverguojantys su šeimininku nei daugelis kitų virusų, šeimininko keitimas taip pat yra dažnesnis reiškinys, nei buvo manoma (Geoghegan ir kt., 2017). Kitaip sakant, PyV evoliuciją apibūdina ne tik kodivergencija su šeimininku, bet ir šeimininko keitimo įvykiai, linijų duplikacijos ir rekombinacijos tarp tolimų poliomos virusų. Skaičiuojama, kad PyV diverguoja 0,5 % per milijoną metų nuo šeimininkų atsiskyrimo (Buck ir kt., 2016).

PyV geba keisti šeimininką, nors tai įvyksta gan retai. Vis dėlto, dabartinė PyV filogenetinė struktūra ir tyrimai liudija apie šeimininko keitimo atvejus. Visų pirma, žmogaus poliomos virusai nesudaro vienos monofiletinės grupės – jie pasiskirstę *Alpha-*, *Beta-* ir *Deltapolyomavirus* gentyse ir skirtingi ŽPyV yra artimesni įvairiems gyvūnų PyV nei vieni kitiems (Torres, 2020). Šikšnosparnių PyV taip pat nėra monofiletiniai ir greičiausiai kai kurie jų yra susidarę po viruso persokimo iš kitų žinduolių šikšnosparniams (Tao ir kt., 2013). Neseniai atliktas didelės apimties šikšnosparnių tyrimas (n=1 083) parodė, kad poliomos virusai geba keisti šeimininką tarp artimų rūšių, tačiau tokie įvykiai labai reti. Šio tyrimo metu šeimininko keitimo įvykių tarp šikšnosparnių ir kitų žinduolių nebuvo aptikta (Tan ir kt., 2020). Šiame kontekste įdomiai atrodo paukščių poliomos virusai, kurie geba infekuoti įvairių rūšių paukščius (Johnė ir Müller, 2007).

Taip pat, pagal dabartinius duomenis, yra manoma, kad PyV šeimoje yra įvykusios bent trys senos rekombinacijos tarp tolimų jos narių. Minėti ungurių ir bandikuto virusai rodo, kad PyV galėjo rekombinuoti ir su kitomis virusų šeimomis. Šeimos viduje rekombinacijos nustatomos sudarant PyV filogenetinius medžius, kai lyginant pagal ankstyvąją ir vėlyvąją transkripcijos regionus (dažniausiai LTag ir VP1 koduojančias DNR arba aminorūgščių sekas), poliomos virusas išsiskiria į skirtingas filogenetines grupes. Pavyzdžiui, paukščių poliomos virusai analizuojant pagal LTag sekas išsiskiria į atskirą *Gammapolyomavirus* gentį, tačiau analizuojant pagal VP1 sekas, grupuojasi *Betapolyomavirus* gentyje; HPyV6, 7 grupuojasi su MWPyV pagal LTag analizę, bet pagal VP1 analizę sudaro atskirą *Betapolyomavirus* grupę kartu su WU ir KI PyV; trys primatų poliomos virusai *Ateles paniscus polyomavirus 1*, TSPyV ir *Pongo pygmaeus polyomavirus 1* pagal LTag analizę priklauso *Alphapolyomavirus* genčiai, o pagal VP1 – *Betapolyomavirus* (Buck ir kt., 2016; Torres, 2020).

Galiausiai, yra pastebima, kad rūšies lygmenyje PyV diverguoja šiek tiek greičiau nei šeimos. Kodivergencijos su šeimininku procesai yra stebimi ir žmonių poliomos virusuose, tiriant skirtingas žmonių populiacijas. JC, BK ir MC PyV turi keletą subtipų, kurie skirtingai paplitę Afrikoje, Azijoje, Europoje, Amerikose ir Okeanijoje (Torres, 2020). Pastebima, kad poliomos virusai diverguoja ir tarp pacientų, tai gali lemti skirtingą infekcijos ir patologijos eigą (Blackard ir

kt., 2020; Liimatainen ir kt., 2020). PyV divergencija tarp populiacijų turėtų būti būdinga ir kitų gyvūnų, ne tik žmonių poliomos virusams, tačiau tam reikia ištirti didelius kiekius tos pačios rūšies individų iš skirtingų populiacijų, aptinkant ir analizuojant jiems būdingų PyV sekas. Tokie tyrimai galėtų papildyti informaciją apie šeimininko ir poliomos virusų kodivergenciją, be to, leistų neatsižvelgti į šeimininko keitimo ir rekombinacijų įvykius, nes tokie įvykiai reti, o tiriamas evoliucijos laikas rūšies lygmenyje yra sąlyginai labai trumpas, lyginant su tiriamais evoliuciniais laikotarpiais genties ar šeimos lygmenyse. Tyrimams puikiai tinka graužikų populiacijos, nes jie gausiai paplitę ir juos nesunku pagauti, be to, graužikų kartos keičiasi greitai, todėl galima tikėtis pastebimos virusų divergencijos.

### 1.12 Graužikai ir jų poliomos virusai

Graužikai (lot. *Rodentia*) – gausiausias rūšių skaičiumi žinduolių būrys, apimantis apie 40 % visų žinduolių rūšių. Kaip minėta anksčiau, graužikai, kartu su šikšnosparniais ir primatais, yra vienas didžiausių zoonozinių patogenų šaltinių, tačiau zoonoziniai PyV juose dar nėra patvirtinti.

Geltonkaklė pelė (*Apodemus flavicollis*) ir dirvinė pelė (*Apodemus agrarius*) yra pelinių (Muridae) šeimos graužikai. Jiems būdingas gan platus arealas – šios pelės yra gausiai paplitusios Europoje bei Azijoje. *A. flavicollis* ir *A. agrarius* yra žinomos kaip žmones infekuojančių Dobrava-Belgrade bei Saaremaa hantavirusų platintojos. Šiose pelių rūšyse aptiktų Dobrava virusų sekos sutapo 84,3 % (Sibold ir kt., 2001; Plyusnin ir kt., 2006). 2015 m. naujas poliomos virusas buvo aptiktas Vokietijoje sugautų geltonkaklių pelių krūtinės ertmės skysčio mėginiuose. Šis virusas pasižymėjo 72 % panašumu į HaPyV ir turėtų būti priskirtas *Alphapolyomavirus* genčiai (Nainys, 2015; Ehlers ir kt., 2019). Kol kas *A. flavicollis* PyV (AflaPyV1) nėra oficialiai suklasifikuotas ICTV (ICTV, talk.ictvonline.org). PyV paieška buvo atlikta ir Vokietijoje sugautų *Apodemus agrarius* širdies, inkstų, kepenų, plaučių, limfmazgių, blužnies mėginiuose, tačiau poliomos virusų sekų nebuvo rasta (Ehlers ir kt., 2019).

Pilkoji (*Rattus norvegicus*) ir juodoji (*Rattus rattus*) žiurkės taip pat priklauso pelinių šeimai, yra gausiai paplitusios visuose žemynuose (išskyrus Antarktidą ir Arkties regioną). Šios žiurkės plačiai naudojamos laboratorijose kaip eksperimentiniai gyvūnai, be to, jos paprastai gyvena arti žmonių ir mėgsta maitintis jų paliekamais maisto likučiais, todėl yra vienos didžiausių zoonozinių patogenų pernešėjų. Manoma, kad juodosios žiurkės pernešė XIV a. 30–60 % Europos žmonių populiacijos sunaikinusios juodosios mirties sukėlėją (*Yersinia pestis*) su blusomis (Liu ir kt., 2018). Žiurkės, be maro, taip pat perneša daug kitų sunkių žmonių ligų – vidurių šiltinę,



trichineliozę, tuliaremiją, hantaviruso sukeliama karštinę, hepatitą ir kitas. (Animal Diversity Web, <https://animaldiversity.org/>). Yra žinomi du žiurkių poliomos virusai. *Rattus norvegicus* poliomos virusas 1 (RnorPyV1) buvo aptiktas 2015 metais Vokietijoje sugautų žiurkių blūžnies mėginiuose, šis virusas priskiriamas *Alphapolyomavirus* genčiai. 2016 metų gruodį atrastas naujas žiurkių poliomos virusas (RatPyV2), pasižymintis dideliu panašumu į WU ir KI PyV. Virusas buvo priskirtas *Betapolyomavirus* genčiai. RatPyV2 buvo išskirtas iš laboratorinių X-SCID žiurkių paausinių seilių liaukų. RatPyV2 buvo aptiktas įvairiuose sergančių žiurkių organuose: plaučių bronchiolėse, trachėjoje, sėkliniame latakė, prostatoje, kiaušintakiuose. Virusas buvo aptiktas ir sveikose žiurkėse. Tai rodo, kad nors virusas infekuoja ir sveikas žiurkes, patologijas sukelia tik turinčioms silpną imunitetą (Siebrasse ir kt., 2016).

*Microtus* genties pelėnai priklauso žiurkėninių (Cricetidae) šeimai. Genčiai priklauso daugiau nei 70 pelėnų rūšių, šie pelėnai gausiausiai paplitę Europoje ir Azijoje. *Microtus* spp. pelėnai taip pat žinomi kaip zoonozinių infekcijų pernešėjai (Rodríguez-Pastor ir kt., 2019), šie pelėnai yra hantavirusų, galinčių užkrėsti žmones, rezervuaras (Jeske ir kt., 2019). Yra žinomas vienas *Microtus* genties pelėnus infekuojantis poliomos virusas – paprastojo pelėno (angl. *Common vole*, lot. *Microtus arvalis*) poliomos virusas 1 (CVPyV). Virusas buvo aptiktas 2015 m. Vokietijoje sugautų pelėnų mėginiuose ir buvo panašiausias į WUPyV (67 % genomo sekos panašumas) (Nainys ir kt., 2015). Šiuo metu CVPyV priskiriamas *Betapolyomavirus* genčiai. Kitų *Microtus* gentį infekuojančių poliomos virusų kol kas neaptikta.

Šiuo metu ICTV oficialiai pripažįsta 9 graužikų poliomos virusus (įskaitant jau minėtus du žiurkių PyV ir *Microtus arvalis* PyV). Kaip jau minėta anksčiau, pirmasis poliomos virusas MPyV buvo atrastas pelėse 1953 m. (Gross, 1953). Netrukus *Mus musculus* buvo atrastas dar vienas pelių poliomos virusas, sukeliantis naujagimėms pelėms plaučių uždegimą (*Mus musculus polyomavirus 2*) (Kilham ir Murphy, 1953). Vėliau buvo atrastas žiurkėnų poliomos virusas HaPyV, Sirinių žiurkėnų naujagimiams sukeliantis limfomą ir leukemiją (Scherneck ir kt., 2001). PyV taip pat aptikti *Mastomys natalensis* pelėse (Orba ir kt., 2011) ir pelėnuose *Myodes glareolus* (Nainys ir kt., 2015). MPyV1 ir HaPyV priskiriami *Alphapolyomavirus* genčiai, o pelių pneumotropinis virusas, *M. natalensis* ir *M. glareolus* PyV – *Betapolyomavirus*. 2018 m. balandį publikuotame Niujorko miesto pelių virusų įvairovės tyrime *Mus musculus* identifikuotas naujas pelių poliomos virusas (*Mus musculus polyomavirus 3*). Jo genomo ilgis 5091 bp ir jis pasižymi 75 % panašumu į *Rattus norvegicus* PyV2 (Williams ir kt., 2018), virusas priskirtas *Betapolyomavirus* genčiai.

Kai kurie pastaruoju metu aptikti graužikų PyV dar nėra oficialiai suklasifikuoti (kai kurių publikuotos nepilnos genomo sekos). 2018 metais poliomos virusas buvo aptiktas nutrijose (*Myocastor coypus*) (da Silva ir kt., 2018). Naujų poliomos virusų sekos buvo aptiktos Brazilijoje, žiurkėninių šeimos Pietų Amerikos graužikuose *Akodon montensis* ir *Calomys tener* (Maia ir kt., 2018). Ehlers ir kolegos 2019 metais publikavo straipsnį, kuriame pateikė naujus pelės *Mastomys natalensis* ir didžiosios miegapelės (*Glis glis*) poliomos virusus (Ehlers ir kt., 2019). Keturių rūšių voverėse (*Sciurus carolinensis*, *Sciurus variegatoides*, *Callosciurus erythraeus* ir *Callosciurus prevostii*) buvo aptikti keturi nauji poliomos virusai (Schulze ir kt., 2020).

Iš ICTV patvirtintų 88 žinduolių PyV, 9 graužikų poliomos virusai sudaro tik 10 %, nors graužikai apima 40 % visos žinduolių įvairovės. Būtų galima priskaičiuoti ir ICTV nepatvirtintus graužikų PyV, tačiau taip pat yra daugybė ir neseniai atrastų ir dar nepatvirtintų kitų žinduolių, pavyzdžiui, šikšnosparnių, PyV, todėl situacijos tai iš esmės nepakeistų. Akivaizdu, kad kol kas graužikų poliomos virusų aptikta dar labai mažai. Kadangi skirtingose graužikų rūšyse aptinkami PyV reikšmingai skiriasi, o graužikų PyV turi atstovų *Alpha-* ir *Betapolyomavirus* gentyse, galima manyti, kad unikalūs PyV galėtų infekuoti daugelį dar netirtų graužikų rūšių.

## 2 MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Medžiagos

Visi darbui atlikti naudoti tirpalai buvo ruošiami distiliuotame vandenyje, nebent nurodyta kitaip.

#### 2.1.1 Tirpalai DNR skyrimui ir gryninimui

Etanolis: 96 % ir 70 % (v/v).

NaAc: 3 M natrio acetatas, pH = 4,8.

NaOH-NDS tirpalas: 0,2 M natrio hidroksido ir 1 % natrio dodecilsulfato.

NH<sub>4</sub>Ac tirpalas: 7,5 M amonio acetatas.

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

#### 2.1.2 Reagentai DNR elektroforezei

Etidžio bromido tirpalas: 10 mg/ml koncentracijos etidžio bromido tirpalas.

Agarozė: 0,8–1,4 % agarozės TAE buferiniame tirpale.

50x TAE buferinis tirpalas: Thermo Scientific™ TAE Buffer.

DNR dažas: Thermo Scientific™ 6x DNA Loading Dye.

#### 2.1.3 Reagentai fermentinėms reakcijoms

Reagentai, naudoti fermentinėms reakcijoms, buvo pagaminti „Thermo Fisher Scientific“. Žr. 2.2 lentelė.

#### 2.1.4 Tirpalai *E. coli* bakterijų ir *S. cerevisiae* mielių kompetentinių ląstelių paruošimui

CaCl<sub>2</sub> tirpalas: ruošiamas 100 mM CaCl<sub>2</sub> tirpalas, autoklavuojamas ir laikomas 4°C temperatūroje. Prieš naudojimą atšaldomas ledo vonioje.

CaCl<sub>2</sub> ir glicerolio tirpalas: ruošiamas 100 mM CaCl<sub>2</sub> tirpalas, 4:1 santykiu sumaišomas su gliceroliu (v/v) ir autoklavuojamas. Laikomas 4°C temperatūroje. Prieš naudojimą atšaldomas ledo vonioje.

TE buferinis tirpalas: 10 mM Tris-HCl (pH = 8) ir 0,1 mM EDTA tirpalas vandenyje (pH = 8), pH = 8, autoklavuojama.

TE-LiCl: 0,1 M LiCl tirpalas TE buferyje, autoklavuojama.

TE-PEG: 50 % (w/w) PEG4000 tirpalas TE buferyje, autoklavuojama.

### **2.1.5 Tirpalai baltymų skyrimui iš mielių ląstelių ir jų gryninimui**

Ardymo buferinis tirpalas (DB 150/450): 10 mM Tris-HCl (pH = 7,2), 150/450 mM NaCl, 0,01 % Triton-X-100 (v/v), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,25 M L-Arg tirpalas. Filtruojamas. Prieš naudojimą įpilama PMSF tirpalo iki 2 mM koncentracijos.

10x koncentruotas PMSF tirpalas: 20 mM PMSF tirpalas izopropanolyje, laikomas -20 °C temperatūroje.

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

Cezio chlorido tirpalai gradientui suformuoti: 1,38; 1,35; 1,32; 1,29; 1,26 g/ml CsCl tirpalai buferiniame tirpale (DB 150), filtruojami.

10x koncentruotas PBS tirpalas: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tirpalas, filtruojamas.

### **2.1.6 Regentai baltymų elektroforezei poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis**

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

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

Amonio persulfato tirpalas (APS): 10 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> tirpalas.

Akrilamido tirpalas: ROTIPHORESE®Gel 40 (37,5:1).

NDS tirpalas: 10 % NDS tirpalas.

Koncentruojantis gelis: 3,2 % akrilamido tirpalo, 125 mM Tris-HCl (pH = 6,8), 0,1 % APS, 0,1 % NDS, 0,1 % TEMED (N, N, N', N'- tetrametilendiamino).

Frakcionuojantis gelis: 12 % akrilamido tirpalo, 375 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 0,1 % NDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED.

2x baltymų mėginių dažas: 0,5 M Tris-HCl (pH = 6,8), 20 % (w/v) glicerolio, 4 % (w/v) NDS, 0,001 % (w/v) bromfenolio mėlio, 10 % (v/v) merkaptoetanolio.

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

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

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

### 2.1.7 Molekulinės masės standartai

DNR fragmentų agarozės gelyje standartas: GeneRuler DNA Ladder Mix.

Baltymų dydžio standartai: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder ir PageRuler™ Unstained Protein Ladder.

### 2.1.8 Bakterijų ir mielių kamienai

Plazmidžių konstravimui ir padauginimui naudoti bakterijų kamienai:

*Escherichia coli* DH5α F-gyrA96 (NaIr) *recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* (rk–mk+) *glnV44 deoR* Δ(*lacZYA-argF*)U169 [φ 80dΔ(*lacZ*)M15] (EGIS kolekcija);

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

Naudoti *Saccharomyces cerevisiae* mielių kamienai:

*Saccharomyces cerevisiae* AH22-214 (*a, his4 leu2*) (EGIS kolekcija);

*Saccharomyces cerevisiae* AH22-214Δ*pep4* (*a, his4 leu2 pep4*) (EGIS kolekcija).

*S. cerevisiae* ląstelės augintos 30 °C temperatūros purtyklėje arba termostate.

### 2.1.9 Plazmidiniai vektoriai

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

pTZ57R/T bakterijų klonavimo vektorius (Thermo Fisher Scientific Baltics #K1213);

pFX7 mielių raiškos vektorius, turintis *GAL10-PYK1* galaktoze indukuojamą promotorių, sudarytą iš UDP-galaktozės epimerazės geno UAS sekos (atsakingos už transkripcijos indukciją) ir piruvatkinazės geno promotoriaus. Vektorius turi *bla* ir *FDHI* genus, suteikiančius atsparumą ampicilinui ir formaldehidui bei bakterijų ir mielių replikacijos iniciacijos sekas (EGIS kolekcija).

### 2.1.10 Naudoti oligonukleotidai

Darbo metu naudotos oligonukleotidinių pradmenų poros ir sekos bei pradmenų porų padauginamų fragmentai ir jų ilgiai pateikti lentelėje (2.1 lentelė.).

**2.1 lentelė. Darbo metu naudotų oligonukleotidinių pradmenų sekos ir padauginami fragmentai**

Pradmenų pavadinimas	Pradmenų 5'-3' seka	Padauginamas fragmentas	Padaug. fragmento dydis (bp)
<b>Lizdinės PGR pradmenys</b>			
LTag-1T	GATGTTTCCTTTCTARRTNAC	LTag-1	536–551
LTag-1A	GCAAAGATCAAAAAAGCATHHTGYCA		
LTag-2T	AAATGATCTCTCAAGTTATCNARRTT	LTag-2	205–235
LTag-2A	AAAGGTCCAGTTAATAGTGG		
VP1-1T	CCAGACCCAACTARRAATGARAA	VP1-1	829–1137
VP1-1A	AACAAGAGACACAAATNTTTCNCC		
VP1-2T	ATGAAAATGGGGTTGGCCCNCTNTGYAARG	VP1-2	249–273
VP1-2A	CCCTCATAAACCCGAACYTCYCHACYTG		
<b>Smulkių žinduolių <i>mt-Cytb</i> geno padauginimui skirti pradmenys</b>			
mt-Cytb-T	TCATCMTGATGAAAYTTYGG	mt-Cytb	946
mt-Cytb-A	ACTGGYTGDCCBCCRATTCA		
<b><i>Rattus norvegicus</i> PyV 1 padauginimo pradmenys</b>			
RnorPyV-Tag-A1	CACTTCCAGACTGCAGGTCCTTATC	Rnor3	1308
RnorPyV-Tag-A2	CTCACTGGCATTAGTCTCCAGTTC	Rnor2	1898
RnorPyV-Tag-T1	TGTAAAGGGACAGGTAGCTAATAGAG	Diagnostinis (dg)	1273
RnorPyV-Tag-T2	AGCAGCTACGCAGAGATCAACCAC	Rnor3	1308
RnorPyV-VP1-A	GTGTTTGTGAACTGCATAACAGGCG	Rnor1	1643
RnorPyV-VP1-ATG	GCACTAGTATGGCCCCAAAAGAAAAGGCGTC	VP1 genas	1153
RnorPyV-VP1-stop	GCACTAGTTAATTCATATGAATHTCAGGTTTGGTTC		
RnorPyV-VP1-T	CTGCTCAATGTCCATGGCTATGGC	Diagnostinis (dg)	1273
RnorPyV-VP2-A	GTTGGTCTCTAAATCCCGAGATTAC	Rnor2	1898
RnorPyV-VP2-T	CTACAATGGAGGGTTTAGCGGCTG	Rnor1	1643
<b><i>Rattus norvegicus</i> PyV 2 padauginimo pradmenys</b>			
RatPyV2-VP1-stop	CGTCTAGATTAGCCCTGCACATTCAACATGC	VP1 genas	1034
RatPyV2-VP1-ATG	CGTCTAGAATGTCCAGGGTGACATGCCAAAG		
<b><i>Apodemus flavicollis</i> PyV 1 padauginimo pradmenys</b>			
AflaPyV1-Tag-T	CTGTTTAGTTATAAAGGTGATAGC	Genomas	~5300
AflaPyV1-Tag-A	GACCCTTATAATCAGGATTATATCTTGC		
AflaPyV1-dg-T	CACCTCAAGAGGAGCCCATATAC	dg	1172
AflaPyV1-dg-A	CAAACCTTATCTATTGCACACCCAAGC		
<b><i>Rattus rattus</i> PyV 1 padauginimo pradmenys</b>			
RratPyV-Tag-A1	GATTTCTCCCAGAAATTCAGC	Sekoskaitos pradmuo	-
RratPyV-Tag-A2	GTTCAACTTATCTGAAGGGCAGT	Rrat1	1808
RratPyV-Tag-T1	CTTGCTGCAGCAATTATGCAC	Rrat2	2016
RratPyV-Tag-T2	GCTAAGACGCCAGCACAGAGGC	Rrat1	1808
RratPyV-VP2-T	GCTCAGCAAGCCCTGAGGACTG	Rrat2	2016
<b><i>Microtus arvalis</i> PyV 1 padauginimo pradmenys</b>			
CVPyV-A	CATAAATTGGTCTATTGCAACACCTAG	Genomas	~5000
CVPyV-T	GTTGTTTTTGGAGGATGTGAAGGGAC	Genomas; dg2	~5000; 1109

<b>CVPyV-Tag-A1</b>	GAATCAGCATTAAGTGCCTGCTTGC	dg1; dg3	1070; 725
<b>CVPyV-Tag-A2</b>	CATAGTTCAGGGGGAATCCG	dg4	514
<b>CVPyV-Tag-T1</b>	GCATGGGATGCTTGCTTGCCACATG	dg3	725
<b>CVPyV-Tag-T2</b>	CTTCTGGAGGCTTCTGCTTTAC	dg1; dg4	1070; 514
<b>CVPyV-VP1-T</b>	CATATAACCAGACAGTCTCTG	dg2	1109
<b><i>Microtus arvalis</i> PyV 2 padauginimo pradmenys</b>			
<b>MarPyV-Tag-A1</b>	CACAGAGATCTAAGATAGCAGCAGC	Genomas LTag; dg	~5000; 1018
<b>MarPyV-Tag-A3</b>	GCTGGCATGTCTTTCGGGGAGTC	Sekoskaitos pradmuo	-
<b>MarPyV-Tag-T1</b>	GAGGAAAAGCACTAAATATCAATATGC	Genomas LTag	~5000
<b>MarPyV-Tag-T3</b>	GCACAACCAGGCCCTTCAGGTTC	dg	1018
<b>MarPyV-VP1-A</b>	CAATAGGGAACTCACTGGATATG	Sekoskaitos pradmuo; genomas VP1	~5000
<b>MarPyV-VP1-T</b>	AACACATTGTTCTCAGAAATGATGC	Genomas VP1	~5000
<b>MarPyV-VP2-A</b>	GAAGTTCTGCTGTTGTGAAGGC	Sekoskaitos pradmuo	-
<b>MarPyV-VP3-A</b>	GCCTTGGTTTTGAGACGCTTCGC	Sekoskaitos pradmuo	-
<b>pJET/blunt plazmidinio vektoriaus pradmenys</b>			
<b>pJET-T</b>	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Sekoskaitos pradmenys	-
<b>pJET-A</b>	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG		-
<b>B:C+G+T; H:A+C+T; M:A+C; N:A+C+G+T; R:A+G; W:A+T; Y:C+T.</b>			

### 2.1.11 Bakterijų ir mielių auginimo terpės

**LB (Luria-Bertani) terpė (pH = 7):** 25 g/l LB mišinio tirpalas, ruošiant agarizuotą terpę, pridedama 2 % agarą, autoklavuojama.

**Ampicilino tirpalas:** 50 mg/ml ampicilino tirpalas 50 % etanolyje, laikomas -20 °C temperatūroje.

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

**YEPD terpė:** ruošiamas 1 % mielių ekstrakto, 2 % peptono, 2 % gliukozės tirpalas, ruošiant agarizuotą YEPD terpę, pridedama 2 % agarą. Autoklavuojama.

**YEPG terpė:** 1 % mielių ekstrakto, 2 % peptono, 3 % galaktozės vandenyje. Tirpalai ruošiami dvigubai koncentruoti atskirai galaktozės ir mielių ekstrakto/peptono, galaktozės tirpalas filtruojamas, mielių ekstrakto/peptono – autoklavuojamas.

**Formalinas:** AppliChem Formaldehyde solution 37 % for molecular biology BC, #A0877

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

### 2.1.12 Virusinės DNR išskyrimui naudoti tirpalai

Ekstrakcijos buferinis tirpalas: 10 mM Tris-HCl, 0,15 % natrio dodecilsulfato (NDS), 150 mM NaCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub> tirpalas, filtruojamas.

### 2.1.13 Reagentų gamintojai

#### 2.2 lentelė. Darbui naudoti reagentai ir jų gamintojai

Tiekėjas	Reagentas
<b>AGAR SCIENTIFIC</b>	Varinis TEM tinklelis (#AGS162-3)
<b>AMRESKO</b>	Ličio chloridas (#0416)
<b>APPLICHEM</b>	L-arginino hidrokloridas (#A3709), sojų peptonas (#A2206), amonio sulfatas (#141140), formalinas (#A2633), PMSF (#A0999), TEMED (#A1148), cezio chloridas (#A1126)
<b>CHEMPUR</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (#117992801), acto rūgštis (#425687607)
<b>FERAK BERLIN</b>	Merkaptoetanolis (#31012)
<b>GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES</b>	Mikrofiltrai (#10410314)
<b>HONEYWELL</b>	Etanolis (#32221), izopropanolis (#190764), natrio šarmas (#06203)
<b>PPH STANDARD SP. Z O.O.</b>	Chloroformas (#2006,10/08)
<b>ROTH</b>	LB (#X968.3), amonio acetatas (#7869.1), ampicilinas (#K029.2), APS (#9592.2), NDS (#CN30.3), akrilamidas (#T802.1), fenolis (#0038.3), fenolio-chloroformo-izoamilio alkoholio mišinys (#A156.2), dializės membrana (#0653.1)
<b>SERVA</b>	PEG 4000 (#33136.01)
<b>SIGMA-ALDRICH</b>	Coomasie brilliantinis mėlis (#1.12553), kalcio chloridas (#21074), Tris-HCl (#T5941), natrio acetatas (#71180), stiklo rutuliukai (#G9268), EDTA (#03609)
<b>THERMO FISHER SCIENTIFIC</b>	Standartinės ir FastDigest restrikcijos endonukleazės ir jų buferiniai tirpalai, DreamTaq ir Phusion High-Fidelity DNR polimerazės ir atitinkamų PGR buferinių tirpalų rinkinys (#EP0702, #F530L), Phi29 (#EP0091) ir EquiPhi29™ (#A39390) polimerazės ir jų buferiniai tirpalai, pirofosfatazė (#EF0221, Exo-Resistant Random Primer (#SO181), T4 DNR ligazė ir jai skirti buferiniai tirpalai (#EL0014), dNTP mišiniai (#R0191, #R0241), DNR ir baltymų molekulinės masės žymenys (#SM0331, #26630, #26614), FastAP fosfatazė (#EF0652), proteinazė K (#EO0492), TAE buferinis tirpalas (#B49), CloneJET PCR Cloning Kit (#1231), Klenow Fragment (#EP0051) bei gamintojo pateikiami buferiniai tirpalai, Fast DNA End Repair Kit (#K0771), GeneJET Viral DNA and RNA Purification Kit (#K0821), GeneJET Plasmid Miniprep Kit (#K0502), GeneJET Gel Extraction Kit (#K0692).
<b>FISHER SCIENTIFIC</b>	Tris (#BP152), natrio chloridas (#BP358), sacharozė (#S/8560/65), glicerolis (#G/0650/21), D-gliukozė (#G/0500/70), agaras (#A/1080/53), agarozė (#BP1356), Triton-X-100 (#BP151), Fisherbrand™ SureOne™ Aerosol Barrier Pipette Tips (#11973466, #11963466, #11913466)



**VWR  
INTERNATIONAL**

Mielų ekstraktas (#97063-370)

## 2.2 Laboratoriniai metodai

### 2.2.1 Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas

Į 20 ml LB terpės buvo sėjamos *E. coli* recipientinio kamieno ląstelės ir 18 val. auginamos 37 °C temperatūros purtyklėje. Tada ląstelės su visa terpe skiedžiamos 400 ml LB terpės, pašildytos iki 37 °C ir paruoštos 2 l kolboje, siekiant užtikrinti efektyvią ląstelių aeraciją augimo metu. Ląstelės auginamos 37 °C purtyklėje, kol kultūros optinis tankis (bangos ilgis 600 nm) pasiekia 0,6–0,7. Kiti etapai atliekami ledo vonioje. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 4 °C temperatūroje (10 min, 3000 aps./min BECKMAN Coulter J-26 XPI centrifuga, JA-14 rotorius) ir plaunamos 25 ml lede atšaldytu 100 mM CaCl<sub>2</sub> tirpalu (užpilama tirpalo, ląstelės suspenduojamos ir suspensija perkeliama į 50 ml flakonus). Centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis stalinėje centrifugoje Eppendorf 5810 R, supernatantas nupilamas, ląstelės resuspenduojamos į 25 ml lede atšaldyto 100 mM CaCl<sub>2</sub> tirpalo ir inkubuojamos 22 val. lede. Po inkubacijos ląstelės nusodinamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis stalinėje centrifugoje, supernatantas nupilamas ir ląstelės suspenduojamos 5–15 ml CaCl<sub>2</sub> ir glicerolio tirpale. Ląstelės išpilstomos į mikrocentrifuginius (Eppendorf) mėgintuvėlius ir užšaldomos -70 °C. Taip paruoštos kompetentinės ląstelės vėliau yra atšildomos lede ir naudojamos transformacijai.

### 2.2.2 Kompetentinių *E. coli* ląstelių transformacija

Transformuojant kompetentines ląsteles DNR susiuvimo mišiniu, 0,5–2 µg DNR (20 µl susiuvimo mišinio) buvo maišoma su 90 µl kompetentinių (žr. 2.2.1) ląstelių suspensijos. Transformuojant natyviomis plazmidėmis buvo naudojama 0,1 µg/ml DNR koncentracija transformacijos mišinyje. Kompetentinių ląstelių ir DNR mišinys 30 min inkubuojamas ledo vonioje, po to 2 min laikomas 42 °C vandens vonioje. Po temperatūrinio šoko DNR ir ląstelių mišinys porą minučių buvo atšaldomas ledo vonioje, skiedžiamas kambario temperatūros skysta LB terpe santykiu 1:10 ir inkubuojamas 0,5–1 val. 37 °C temperatūroje. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 5 min 2000 aps./min greičiu stalinėje Eppendorf 5415 D centrifugoje ir išsėjamos ant agarizuotos LB mitybinės terpės su 50 µg/ml ampicilino. Lėkštelės buvo inkubuojamos per naktį 37 °C temperatūroje.

### 2.2.3 Plazmidinės DNR išskyrimas iš *E. coli* ląstelių

Bakterijų kolonija buvo užsėjama į 5 ml LB terpės su 30 µg/ml ampicilino, auginama purtyklėje per naktį 37 °C temperatūroje (16–20 val.). Ląsteles nucentrifugavus 10 min

3000 aps./min greičiu (Eppendorf 5810 R centrifuga), supernatantas nupilamas, o likęs terpės lašas išsiurbiamas su siurbliuku. Toliau DNR skiriama vienu iš dviejų būdų.

Norint skiriamą DNR naudoti sekoskaitai, plazmidinė DNR buvo išskiriama naudojant komercinį Thermo Fisher Scientific plazmidinės DNR skyrimo rinkinį GeneJET Plasmid Miniprep pagal gamintojo rekomendacijas.

Jei plazmidinės DNR neketinama naudoti sekoskaitai, skiriama šarminės lizės būdu. Pirmiausia bakterijų masė suspenduojama 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, tada pridedama 400  $\mu$ l 0,2 M NaOH-1 % NDS tirpalo, labai švelniai sumaišoma, ir laikoma 2–5 min, kol tirpalas nuskaidrėja. Pridedama 300  $\mu$ l 3 M NaAc pH = 4,8 tirpalo, vėl švelniai maišoma, kol išsėda baltos nuosėdos. Pridedama 500  $\mu$ l chloroformo, gerai sumaišoma purtyklėje. Centrifuguojama 15 min 3000 aps./min (Eppendorf 5810 R centrifuga). Viršutinė vandeninė fazė atsargiai perkeliama į mėgintuvėlį su 700  $\mu$ l izopropanolio, gerai sumaišoma rankoje pavartant. 2 min palaikoma kambario temperatūroje ir 4 min centrifuguojama 13 200 aps./min stalinėje centrifugoje Eppendorf 5415 D. Nuosėda praplaunama: užpilama 500  $\mu$ l 70 % EtOH, purtoma purtyklėje, kol nuosėda atšoka, 3 min centrifuguojama stalinėje centrifugoje tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nupilamas, mėgintuvėlis dar 4 s centrifuguojamas, likęs tirpalo lašas nusiurbiamas ir mėgintuvėlis paliekamas visiškai išdžiūti. DNR nuosėda ištirpinama 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O su 1  $\mu$ l 10 mg/ml RNRazės tirpalo. Taip paruošta DNR toliau naudojama restrikcinei analizei.

#### **2.2.4 Plazmidinės DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis**

Buferiniai tirpalai bei inkubacijos temperatūra buvo parenkami pagal gamintojo rekomendacijas. DNR koncentracija reakcijos mišinyje ~50  $\mu$ g/ml. 1  $\mu$ g DNR hidrolizei buvo imama 1 U restrikcijos endonukleazės. Reakcijos mišinys buvo inkubuojamas 1 val., tada pridedama 6x DNR dažo ir vykdoma elektroforezė agaroziniame gelyje, kuris buvo analizuojamas apšvietus ultravioletine šviesa transiluminatoriuje („ULTRA-LŪM“). Jei hidrolizuota DNR buvo naudojama kitose fermentinėse reakcijose, prieš tai reakcijos mišinys buvo deproteinizuojamas (žr. 2.2.9).

#### **2.2.5 Lipnių DNR fragmentų galų bukinimas**

DNR fragmentų galų bukinimui buvo naudojami komerciniai rinkiniai CloneJET PCR Cloning Kit, Fast DNA End Repair Kit arba Klenow fragment fermentas. Reakcijos buvo atliekamos laikantis gamintojo rekomendacijų ir naudojant gamintojo suteikiamus buferinius

tirpalus. Fragmentai su užbukintais galais buvo naudojami DNR susiuvimo reakcijose (žr. **2.2.6**). Atlikus reakciją su Klenow fragmentu arba Fast DNA End Repair Kit, DNR papildomai deproteinizuojama ir nusodinama (žr. **2.2.9**, **2.2.10**), prieš ją naudojant tolimesnėms reakcijoms.

### **2.2.6 DNR susiuvimas**

DNR susiuvimo reakcija buvo vykdoma 5–60 min kambario temperatūroje, T4 DNR ligazės buferiniame tirpale, pridėjus 5 U T4 DNR ligazės ir 0,1–1 µg siuvamos DNR. Vektoriaus koncentracija siuvimo mišinyje siuvant su DNR fragmentu buvo 15–50 µg/ml. Vektoriaus ir DNR fragmentų molekulių galų kiekio santykiai susiuvimo mišinyje buvo parenkami empiriškai nuo 1:1 iki 1:5. DNR susiuvimo mišiniu buvo transformuojamos kompetentinių *E. coli* DH5α kamieno ląstelės (žr. **2.1.8**).

### **2.2.7 DNR koncentracijos ir nukleotidų sekos nustatymas**

DNR koncentracija buvo nustatoma naudojantis spektrofotometru NanoDrop 2.1. DNR nukleotidų seka buvo nustatoma automatiniu genetiniu analizatoriumi 3130xl (Applied Biosystems) Biotechnologijos instituto Sekoskaitos centre.

### **2.2.8 DNR elektroforezė agarozės gelyje**

DNR elektroforezė vykdyta 0,8–1,4 % agarozės geliuose, turinčiuose 0,1–0,2 µg/ml etidžio bromido. Naudotos horizontalios agarozės plokštelės, gelis panardinamas į TAE buferį. Taikyta 10 V/cm įtampa. Geliai buvo analizuojami ultravioletinėje šviesoje „ULTRA-LŪM“ transiliumatoriuje.

### **2.2.9 DNR deproteinizavimas fenolio-chloroformo-izoamilo alkoholio mišiniu**

Jei mėginio tūris nedidelis, jis buvo skiedžiamas vandeniu iki 100 µl. Tuomet tirpalas buvo maišomas su lygiu tūriu fenolio-chloroformo-izoamilo alkoholio mišinio, ~1 min intensyviai purtomas purtyklėje ir centrifuguojamas 3 min Eppendorf 5415 D stalinėje centrifugoje 13 200 aps./min greičiu. Vandeninė fazė buvo atsargiai surenkama ir perkeliama į kitą mėgintuvėlį. Deproteinizuojant po DNR galų bukinimo, procedūra buvo kartojama du kartus. Po deproteinizavimo, DNR nusodinama etanoliu (žr. **2.2.9**).

### 2.2.10 DNR nusodinimas

Į DNR tirpalą buvo pridedama 0,5 tūrio 7,5 M amonio acetato tirpalo, ir 2,5 tūrio 96 % etanolio. Mišinys buvo 30 min šaldomas -70°C temperatūroje, tada centrifuguojamas Eppendorf 5415 D stalinėje mikrocentrifugoje 11 min 13 200 aps./min greičiu. Supernatantas buvo nupilamas, nuosėdos plaunamos 70 % etanolio. Ant DNR nuosėdų buvo užpilama 0,5 ml -20 °C temperatūros 70 % etanolio ir sumaišoma. Centrifuguojama 3 min tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nupilamas, DNR nuosėdos išdžiovinamos ir tirpinamos reikiamame vandens kiekyje.

### 2.2.11 DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio

Iš gelio išpjaunama agarozės juostelė su numatyto dydžio DNR fragmentu. Išpjautas agarozės gabaliukas susmulkinamas ir perkeliamas į Eppendorf mėgintuvėlį. Toliau DNR skiriama „užšaldymo ir suslėgimo“ metodu arba naudojant Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit pagal gamintojo rekomendacijas.

Skiriant DNR „užšaldymo ir suslėgimo“ metodu, susmulkinta agarozė buvo užpilama 1 tūriu fenolio bei šaldoma -20 °C temperatūroje mažiausiai 1 val. Po šaldymo mėginys buvo 11 min centrifuguojamas 13 200 aps./min greičiu stalinėje Eppendorf 5415 D mikrocentrifugoje. Vandeninė fazė su joje ištirpusia DNR buvo nusiurbiamą ir perkeliama į kitą mėgintuvėlį, DNR deproteinizuojama (žr. 2.2.9), nusodinama (žr. 2.2.10). Taip paruoštas DNR fragmentas naudojamas kitose reakcijose.

### 2.2.12 Virusinės DNR išskyrimas

Virusų genomine DNR buvo išskiriama iš graužikų inkstų mėginių, naudojant GeneJET Viral DNA and RNA Purification Kit (žr. 2.2 lentelė.) pagal gamintojo rekomendacijas, laikantis kuo sterilesnių sąlygų, naudojant sterilius automatinių pipečių antgalius su filtrais. Kadangi rinkinys skirtas nukleorūgščių išskyrimui iš kraujo serumo, skiriant virusų genomine DNR iš kietų audinių, mėginiai prieš skyrimą buvo atitinkamai paruošiami. -70 °C laikyti mėginiai atšildomi iki kambario temperatūros, į mikrocentrifuginį mėgintuvėlį su inkstų dalimi pridedama 200 µl ekstrakcijos buferinio tirpalo (žr. 2.1.12) ir ~3 U proteinazės K (žr. 2.2 lentelė.). Mišinys 4 val. inkubuojamas 56 °C termobloke Biosan Bio TDB-100. Centrifuguojamas 3 min 5000 aps./min Eppendorf 5417 C centrifugoje ir 200 µl skystos fazės perkeliama į naują mikrocentrifuginį mėgintuvėlį. Toliau toks mėginys naudojamas virusinės DNR skyrimui su rinkiniu. Virusinė DNR eliuojama į 50 µl eliacijos buferinio tirpalo. Taip išskirta DNR padalinama

į dvi dalis po 25 µl: viena dalis paliekama tolimesniam naudojimui (toliau vadinama „nepadauginta DNR“), kita nusodinama ir padauginama (žr. **2.2.13**).

### **2.2.13 Virusinės DNR nusodinimas ir padauginimas**

Padauginimui naudojama virusinė DNR, išskirta pagal **2.2.12** aprašytą metodiką. Darbas atliekamas laikantis sterilių sąlygų, naudojant sterilius tirpalus, medžiagas ir automatiinių pipečių antgalius su oro barjeriais, siekiant neužteršti mėginio aplinkos mikroorganizmais ir, ypač, žiedinėmis bakterijų plazmidėmis.

Virusinės DNR nusodinimas. Dėl mėginiuose esančio labai mažo virusinės DNR kiekio, DNR nusodinimui buvo taikoma speciali metodika. Į reakcijos mišinį buvo pridedamas lygus tūris 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc ir 3 tūriai 96 % etanolio. Mišinys buvo 1 valandą laikomas kambario temperatūroje ir po to perkeliamas į -20 °C, kur laikomas mažiausiai 18 valandų. Po to mišinys buvo 1 valandą centrifuguojamas 13 200 aps./min Eppendorf 5417 C centrifugoje, prieš tai jį atšildžius iki kambario temperatūros. Nuosėda praplaunama, užpilant 500 µl 70 % etanolio ir švelniai pamaišius mišinys centrifuguojamas 15 min 13 200 aps./min Eppendorf 5417 C centrifugoje. Skysta fazė pašalinama, ją nusiurbiant automatine pipete, mėginys gerai išdžiovinamas. Taip paruošta DNR naudojama padauginimo reakcijai naudojant **Phi29** arba **EquiPhi29** polimerazę.

Virusinės DNR padauginimas, naudojant **Phi29** arba **EquiPhi29** DNR polimerazę. Išsamus aprašymas pateiktas lentelėje (**2.3 lentelė**). Phi29 padauginimo protokolas parengtas pagal laboratorijoje optimizuotas sąlygas, EquiPhi29 padauginimo protokolas parengtas pagal gamintojo rekomendacijas. Reakcijoms naudoti 3'→5' egzozonukleaziniam polimerazių aktyvumui atsparūs atsitiktiniai arba specifiniai (žr. **2.3.1**) pradmenys, arba šių pradmenų mišinys santykiu 1:9. Tiriamųjų mėginių padauginimui buvo naudojami atsitiktiniai pradmenys; specifiniai pradmenys ir atsitiktinių bei specifinių pradmenų mišinys buvo naudojami specifinių pradmenų padauginimo efektyvumui įvertinti. Atsitiktinė 24 mėginių imtis iš kiekvienoje lokacijoje (15 mėginių imtis iš Ispanijos) sugautų tiriamųjų *Microtus* spp. graužikų buvo padauginta naudojant Phi29 polimerazę, likę mėginiai – EquiPhi29 polimerazę. Lentelė su tikslia informacija apie mėginius pateikiama prieduose (**1 priedas**). Tokia padauginta virusinė DNR naudojama tolesnėms reakcijoms arba iki panaudojimo laikoma -20 °C.

### 2.3 lentelė. Virusinės DNR padauginimas Phi29 arba EquiPhi29 polimerazėmis

	Phi29	EquiPhi29
Galutinis reakcijos tūris	40 µl	20 µl
Virusinės DNR nuosėda tirpinama ½ reakcijos tūrio mišinio:		
<b>Reagentas</b>	<b>Galutinė koncentracija</b>	
Atsitiktinių/specifinių pradmenų mišinys/atsitiktinių:specifinių pradmenų mišinys 1:9	25 µM/25 µM/22,5 µM:2,5 µM	
Phi29/EquiPhi29 10x reakcijos buferinis tirpalas	1x	
H <sub>2</sub> O	Iki 20 µl	Iki 10 µl
Mišinys 3 min inkubuojamas 95 °C termobloke Biosan Bio TDB-100, po to atvėsinamas iki kambario temperatūros ir pridama dar ½ reakcijos mišinio:		
<b>Reagentas</b>	<b>Galutinė koncentracija</b>	
dNTP mišinys	0,5 mM	1 mM
Phi29 polimerazė	0,6 U/µl	
EquiPhi29 polimerazė		0,5 U/µl
DTT	Yra buferinio tirpalo sudėtyje, 1 mM	1 mM
Pirofosfatazė	0,001 U/µl	
Phi29/EquiPhi29 10x reakcijos buferinis tirpalas	1x	
H <sub>2</sub> O	Iki 20 µl	Iki 10 µl
Padauginimo reakcija	24 val. 30 °C termostate	3 val. 45 °C vandens vonioje
Inaktyvacija	Nėra (iškart užšaldoma -20 °C iki panaudojimo)	10 min 65 °C termobloke

#### 2.2.14 Polimerazės grandininė reakcija

Polimerazės grandinė reakcija taikoma padauginti DNR fragmentus. Darbo metu naudoti pradmenys nurodyti **2.1 lentelė**. PGR atliktos 25 µl tūryje, laikantis kuo sterilesnių sąlygų. Reakcijos vykdomos plonasieniuose PGR mėgintuvėliuose Thermo Fisher Scientific Baltics Labnet MultiGene™ termocikleryje. Buvo naudojamos DreamTaq (diagnostiniams fragmentams, lizdinei PGR) arba Phusion High-Fidelity (viso viruso genomo padauginimui, *mt-Cytb* geno padauginimui) DNR polimerazės. PGR sąlygos ir reagentų koncentracijos buvo parinktos pagal gamintojo rekomendacijas polimerazei. Po DNR padauginimo eksperimentų gauti fragmentai buvo skiriami iš agarozės gelio (žr. **2.2.11**) ir klonuojami į pJET1.2/blunt klonavimo vektorių, prieš tai, jei reikia (jei padauginti naudojant DreamTaq polimerazę), DNR fragmentų galai bukinami (žr. **2.2.5**).

Lizdinė PGR buvo vykdoma remiantis Johne ir kolegų pasiūlyta metodika ir naudojant prie LTag konservatyvių regionų sekų besijungiančius išsigimusius pradmenis (žr. **2.1 lentelė**.)

(Johne ir kt., 2005). Pirmoji reakcija buvo atliekama naudojant LTag-1T ir LTag-1A pradmenų porą, padauginant ~500 bp fragmentą. 5 µl PGR mišinio po padauginimo buvo naudojami kaip DNR matrica antrajai reakcijai. Antroji reakcija vykdoma naudojant LTag-2T ir LTag-2A pradmenų porą, padauginamas ~200 bp fragmentas. Šios reakcijos rezultatai vizualizuojami DNR elektroforeogramoje. Visose reakcijose naudotos neigiamos reakcijos mišinio be DNR kontrolės.

### **2.2.15 Mielių auginimas ir heterologinių baltymų sintezės indukcija**

Mielių *S. cerevisiae* ląstelės, transformuotos plazmide su reikiamu genu, 16-24 val. buvo auginamos skystoje YEPD terpėje, 30 °C temperatūroje. Po to buvo įpilama pusė tūrio indukcijai skirtos YEPG terpės, turinčios 9 % galaktozės. Indukcija vykdoma 18–22 val., 30 °C temperatūros purtyklėje. Į auginimo ir indukcinę terpes buvo dedama 0,3 µl/ml 37 % formaldehido tirpalu (pagal Sasnauskas ir kt., 1999).

### **2.2.16 Heterologinių baltymų sintezę vykdančių mielių klonų atrinkimas**

Po baltymų sintezės indukcijos, mielių ląstelės buvo perkeliamos į 50 ml flakonus, atskiriamos nuo terpės centrifuguojant 3 min 2000 aps./min greičiu (Beckman J-6B centrifuga, JS-5.2 rotorius) ir užšaldomos -20 °C. Tolesni veiksmai buvo atliekami ledo vonioje. Priklausomai nuo ląstelių kiekio, jos buvo užpilamos 2–2,5 tūriais ardymo buferinio tirpalo DB450 (su argininu), įpilama iki 2 mM proteazių slopiklio PMSF ir pridedamas ardomų mielių masei lygus kiekis stiklinių rutuliukų. Mielių ląstelės buvo ardomos intensyviai maišant purtyklėje (1 min ardoma ir 1 min šaldoma lede). Bendras ardymo laikas – 10 min. Paimamas suardytų mielių ląstelių lizato mėginys, lizatai toliau 5 min centrifuguojami 4 °C temperatūroje 2000 aps./min greičiu (Eppendorf 5415D centrifuga), tirpi frakcija buvo surenkama, paimamas jos mėginys.

Surinkta tirpi frakcija atsargiai suleidžiama į ultracentrifuginius mėgintuvėlius su 15 ml 30 % sacharozės tirpalo, nesumaišant sacharozės ir mėginio sluoksnių. Mėginiai centrifuguojami 4 val. 37000 aps./min greičiu Beckman LE-80K centrifuga 4 °C temperatūroje. Po centrifugavimo tirpi frakcija pašalinama, nuosėda ištirpinama 100–200 µl ardymo buferio DB150 su argininu, paimamas mėginys. Paimti lizato, supernatanto po centrifugavimo ir nuosėdos mėginiai buvo analizuojami NDS-PAGE po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis (žr. 2.2.19). Išanalizavus poliakrilamidinį gelį, atrenkami klonai, kuriuose nustatoma heterologinio baltymo sintezė lyginant su kontroliniu kamienu.



### 2.2.17 Heterologinių baltymų išskyrimas iš mielių ląstelių ir gryninimas

Atrinkus mielių kloną, kuriame vyksta tiriamo heterologinio baltymo sintezė, jis auginamas anksčiau aprašytomis sąlygomis (žr. **2.2.15**). Po baltymų sintezės indukcijos mielių ląstelės buvo atskiriamos nuo terpės centrifuguojant 5 min 2000 aps./min. greičiu (Beckman J-6B centrifuga, JS-5.2 rotorius) ir užšaldomos -20 °C temperatūroje. Tolesni veiksmai buvo atliekami tik ledo vonioje. Priklausomai nuo ląstelių kiekio, jos buvo užpilamos 2,5 kartus didesniu ardymo buferinio tirpalo tūriu, į kurį prieš pat darbą buvo įpilama iki 2 mM proteazių slopiklio PMSF bei įdedama proteazių slopiklių mišinio tabletė (žr. **2.2 lentelė**). Tuomet buvo pridedamas lygus kiekis (pagal šlapių mielių masę) stiklinių rutuliukų. Mielių ląstelės buvo ardomos intensyviai maišant maišykle Bead-Beater GB26. Bendras ardymo laikas 10 min Suardytų mielių ląstelių lizatas buvo centrifuguojamas 5 min 4 °C temperatūroje 2000 aps./min greičiu (Beckman J-6B centrifuga, JS-5.2 rotorius), supernatantas buvo surenkamas. Suardytų mielių ląstelių lizatų (grubių lizatų) ir supernatantų mėginiai buvo analizuojami NDS-PAGE geliuose po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis.

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

Toliau baltymai buvo gryninami per CsCl gradientą. Ištirpintų baltymų suspensija buvo užpilama ant CsCl gradiento, sudaryto tankio mažėjimo tvarka į centrifuginį mėgintuvėlį lėtai pilant po 1,5 ml CsCl tirpalus (žr. **2.1.5**). Buvo centrifuguojama per naktį tomis pačiomis sąlygomis. Po centrifugavimo buvo renkamos atskiros frakcijos po 0,5–2 ml, pradėdant nuo viršaus, ir baltyminiai mėginiai analizuojami NDS-PAGE geliuose po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis. Norint pasiekti didesnę VPD grynumo laipsnį ar labiau jas sukonzcentruoti, atrinktos frakcijos su gryninamais baltymais buvo pakartotinai užnešamos ant suformuoto CsCl gradiento ir centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis.

### **2.2.18 Baltymų dializė**

Baltymų tirpalas buvo supilamas į vientisą 14 000 Da pralaidumo celiuliozinį dializės maišelį ir įmerkiamas į 4 °C temperatūros PBS buferinį tirpalą. Dializė buvo vykdoma 2 l PBS tirpalo tūryje maišant magnetine maišykle, 4 °C temperatūroje 12 val., kas 2–4 val. keičiant buferinį tirpalą.

### **2.2.19 Baltymų NDS-PAGE ir poliakrilamidinio gelio dažymas**

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

### **2.2.20 Į virusus panašių dalelių stebėjimas elektroniniu mikroskopu**

Elektroninė mikroskopija buvo atlikta naudojant Morgagni 268 (D) transmisinį elektroninį mikroskopą (FEI). Po cezio chlorido gradiento VPD užnešamos ant varinio tinklelio su 300 akučių, padengto anglimi. Po 1 min tinklelis buvo išdžiovinamas filtriniu popieriumi, plaunamas vandeniu ir vėl išdžiovinamas filtriniu popieriumi. 2 % uranilacetato tirpalas užnešamas ant tinklelio ir inkubuojama 2 min. Tinklelis vėl džiovinamas filtriniu popieriumi ir dar 5 min džiovinamas ore. Mėginiai perkeliama į elektroninį mikroskopą, analizuojami ir fotografuojami.

### **2.2.21 Buferinių tirpalų, terpių, laboratorinių priemonių sterilinimas**

Laboratorinės priemonės (indai, antgaliai ir kt.) ir termostabilūs buferiniai tirpalai ar terpės buvo sterilinami autoklavuojant 1 atm. slėgyje (121 °C) 20 min. YEPD terpė sterilinama 0,8 atm. slėgyje (117 °C) 30 min.

Termolabilūs buferiniai tirpalai ir reagentai buvo sterilinami filtruojant per 2 µm filtrą.

Metodikos sudarytos remiantis literatūros šaltiniais: (MBI fermentas. Molecular Biology Catalog And Product Application Guide, 2012-2013; Johne et al., 2005; Schlegel et al., 2012).

## 2.3 Bioinformatiniai ir statistiniai metodai

### 2.3.1 Poliomos virusams specifinių heksanukleotidinių pradmenų kūrimas

Iš duomenų bazių buvo paimtos 1594 poliomos virusų pilno genomo sekos, jų identifikaciniai kodai pateikiami prieduose (**5 priedas.**). Pagal LTag baltymo sekoje esantį konservatyvų HPDKGG motyvą buvo suvienodinamos sekų kryptys. Buvo sugeneruojamos atvirkštinės komplementarios sekos. Sugeneruojamos visos galimos heksanukleotidinės sekos – 4096 variantai. Atliekama kiekvieno heksanukleotido varianto paieška visų 1594 genomų tiesioginėje ir atvirkštinėje sekoje, gaunama duomenų lentelė, nurodanti kiekvieno iš 4096 heksanukleotidų pasikartojimų skaičių kiekvienos iš 1594 sekų tiesioginėje ir atvirkštinėje grandinėje ( $4096 \times 1594 \times 2$ ). Išanalizavus gautus duomenis, buvo atrinkti heksanukleotidai, kurie yra bent vienoje – tiesioginėje ar atvirkštinėje – visų PyV genomų sekų grandinėje.

Visų PyV sekos buvo padalintos į 10 vienodo ilgio DNR fragmentų ir kiekviename tokiam fragmente, abiejose grandinėse, surandami heksanukleotidai, kurie pasitaiko didžiausioje dalyje visų sekų. Pastaroji analizė atliekama tiek naudojant tik jau atrinktus heksanukleotidus, kurie tikrai yra visose analizuojamose PyV genomų sekose, tiek naudojant visus 4096 heksanukleotidus. Šios analizės atliktos naudojant Linux operacinės sistemos komandinę eilutę.

Pagal sugeneruotus duomenis pradmenys buvo parenkami rankiniu būdu atsižvelgiant į keletą kriterijų:

- Keliuose iš genomų pradmens seka yra bent vienoje grandinėje;
- Kiek kartų pradmens seka pasikartoja visuose genomuose tiesioginėje ir atvirkštinėje grandinėse kartu sudėjus;
- Vengiama pradmenų, kurių sekoje tas pats nukleotidas kartojasi 4 ar daugiau kartų iš eilės;
- Ar atrinktas pradmenų komplektas tolygiai išsidėsto per visą PyV genomo seką abiejose grandinėse.

Galiausiai buvo atrinkta 20 pradmenų, tolygiai padengiančių visą PyV genomo seką abiejose grandinėse. Lentelėje pateikti pradmenis aprašantys rezultatai, gauti prie analizės pridėjus

8 šiame tyrime nustatytų PyV genomus (7 MarPyV2 ir 1 RratPyV1) (2.4 lentelė.) 2 galiniai 3'-galo pradmenų nukleotidai buvo sujungti fosforotioato jungtimis, kad pradmenys būtų apsaugoti nuo 3'-5' Phi29 polimerazės egzozonukleazinio aktyvumo. Atrinkti pradmenys buvo tikrinami eksperimentiškai (žr. 3.1).

#### 2.4 lentelė. Atrinkti heksanukleotidiniai pradmenys

Pradmens seka 5'-3'	Keliose iš 1602 genomų sekų pradmuo yra bent vienoje grandinėje?	Kiek kartų pradmens seka pasikartoja visų tirtų genomų abiejose grandinėse?	Ar pradmenyje tas pats nukleotidas kartojasi 4 kartus ir daugiau iš eilės?
AAAATG	1602	17588	Taip
AAAGGA	1602	10511	Ne
AAGAAG	1602	11953	Ne
ACATTT	1601	12112	Ne
AGTAGT	1568	6295	Ne
ATGAAA	1600	8842	Ne
CATTTT	1602	17588	Taip
CCTCCT	1602	9898	Ne
CTCTTC	1599	6511	Ne
CTTCTT	1541	11953	Ne
GAAATA	1600	7736	Ne
GAAGAA	1602	13551	Ne
TAAAAG	1601	11772	Taip
TCCTCC	1602	8571	Ne
TGGAAA	1601	13513	Ne
TTCTTC	1602	13551	Ne
TTTCAG	1602	10880	Ne
TTTCAT	1600	8842	Ne
TTTGGA	1601	10077	Ne
TTTGGG	1602	14404	Ne

#### 2.3.2 Nepadaugintos, Phi29 ir EquiPhi29 padaugintos DNR panaudojimo PyV paieškai efektyvumo palyginimas dviejų proporcijų z testu

Dviejų proporcijų lygybės testas padeda nustatyti ar dvi proporcijos A ir B reikšmingai skiriasi tarpusavyje:

$H_0: p_A = p_B$  (proporcijos nesiskiria), kai  $p > 0,05$ .

$H_1: p_A \neq p_B$  (proporcijos reikšmingai skiriasi), kai  $p < 0,05$ .

Testas buvo atliktas R programa, naudojant `prop.test(x, n)` funkciją, kai  $x$  – vektorius, kuriame pateikiami sėkmingų įvykių skaičiai,  $n$  – vektorius, kuriame pateikiami visų bandymų skaičiai. Šiuo atveju,  $x$  yra lygus kiekvienu atveju rastų mėginių su PyV DNR skaičiui, o  $n$  – visų tam tikru būdu paruoštų tirtų mėginių skaičiui. Buvo lyginti visi nepadauginti mėginiai ( $x = 1$ ,  $n = 189$ ) su visais bet kuria polimeraze padaugintais mėginiais ( $x = 14$ ,  $n = 189$ ) ir Phi29 polimeraze padauginti mėginiai ( $x = 9$ ,  $n = 111$ ) su EquiPhi29 padaugintais mėginiais ( $x = 5$ ,  $n = 78$ ).

### 2.3.3 PyV T antigenų splaisingo vietų nustatymas

Splaisingo vietos nustatytos splaisingo vietų nustatymo įrankiu (Alternative Splice Site Predictor, <http://wangcomputing.com/assp/index.html>). Buvo tikrintos donorinės ir akceptorinės splaisingo vietos, kurių įverčiai  $>9$ . Ištransliuota splaisuota seka buvo palyginta su panašiausio *Mus musculus* PyV 2 (MarPyV2 splaisingui) arba *Rattus norvegicus* PyV 1 (RratPyV1 splaisingui) LTag, sTag, mTag baltymų sekomis duomenų bazėse. Taip parinktos galutinės splaisingo vietos.

### 2.3.4 Sekų palyginimai ir filogenetinės analizės

Filogenetinės analizės ir sekų palyginimai buvo atliekami naudojant MEGA X programinę įrangą (Kumar ir kt., 2018). Sekų palyginiai buvo sukurti naudojant Muscle algoritimą. Filogenetinės analizės buvo atliekamos trimis metodais – didžiausio tikėtimumo, kaimynų sujungimo ir minimalios evoliucijos. Šiais metodais sudaryti filogenetiniai medžiai buvo topologiškai vienodi. Rezultatuose pateikti minimalios evoliucijos (ME) metodu sudaryti filogenetiniai medžiai.

ME medžio sudarymo žingsniai: Saitou ir Nei metodu sudaromas kaimynų sujungimo (angl. *neighbor-joining*, NJ) medis (Saitou ir Nei, 1987); atliekama visų į šį medį panašių filogenetinių medžių analizė ir atrenkamas filogenetinis medis, kurio suminis šakų ilgis yra pats mažiausias. Statistiškai patikrinamas skirtumas tarp surasto ME medžio suminio šakų ilgio ir kitų panašių medžių suminių šakų ilgių (Rzhetsky ir Nei, 1992).

### 2.3.5 Virusų ir šeimininko koevoliucijos analizė JANE programa

JANE programa analizuoja šeimininko ir parazito (viruso) koevoliuciją ir pateikia galimą koevoliucijos rekonstrukcijos sprendimą pagal *įvykio-kainos* metodą (Conow ir kt., 2010). Programai pateikiamas šeimininko filogenetinis medis, viruso filogenetinis medis ir funkcija,

sujungianti šeimininko ir viruso filogenetinių medžių šakų galus (apibrėžianti, kuris virusas infekuoja kurį šeimininką). Tuomet nurodomos evoliucijos įvykių kainos: kodivergencijos, duplikacijos, šeimininko keitimo ir genetinės informacijos praradimo. Programa apskaičiuoja tikėtiniausią koevoliucijos scenarijų, turintį žemiausią kainą.

Šio tyrimo metu buvo patikrintos 5 kainų kombinacijos, parinktos pagal anksčiau atliktus tyrimus (**2.5 lentelė.**) (Madinda ir kt., 2016; Tan ir kt., 2020). Programa leista pasirinkus viršūnių kainos nustatymą ir numatytus populiacijos dydžio (100) ir kartų skaičiaus (100) nustatymus. Norint nustatyti tikimybę geresnę sprendimo kainą gauti atsitiktinai, sprendimų kainos taip pat buvo apskaičiuotos pagal 50 filogenetinių žemėlapių, kuriuose viruso ir šeimininko filogenetinių medžių viršūnės buvo sujungtos atsitiktinai. Kadangi visos analizuotos kainų kombinacijos turėjo geresnių atsitiktinių sprendimų, buvo atlikta papildoma geresnės kainos kombinacijos paieška, nustatant kainų ribas nuo -1 iki 2 kodivergencijai ir nuo 0 iki 3 kitiems įvykiams (simuliacijos N = 500). Vis dėlto, visos 1024 kombinacijos turėjo tokios pačios arba žemesnės kainos atsitiktinių sprendinių.

**2.5 lentelė. Kofilogenetinei analizei naudotos kainų schemas ir gauti sprendiniai**

<b>Kainos schema</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
<b>Kaina/įvykiui</b>					
Kodivergencija	0	0	-1	0	0
Duplikacija	1	1	0	2	3
Duplikacija su šeimininko keitimu	1	1	0	4	9
Genetinės informacijos praradimas	1	0	0	1	2
Nepavykusi divergencija	0	0	0	0	0
<b>Įvykių skaičius sprendime</b>					
Kodivergencija	3	4	4	4	4
Duplikacija	0	1	1	1	1
Duplikacija su šeimininko keitimu	3	1	1	1	1
Genetinės informacijos praradimas	0	5	5	5	5
Nepavykusi divergencija	0	0	0	0	0
<b>Sprendimo kaina</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>-4</b>	<b>11</b>	<b>22</b>
<b>Simuliacija (N=50)</b>					
Atsitiktiniai sprendiniai, turintys tokią pačią ar geresnę kainą	3	7	8	5	3

### 3 REZULTATAI

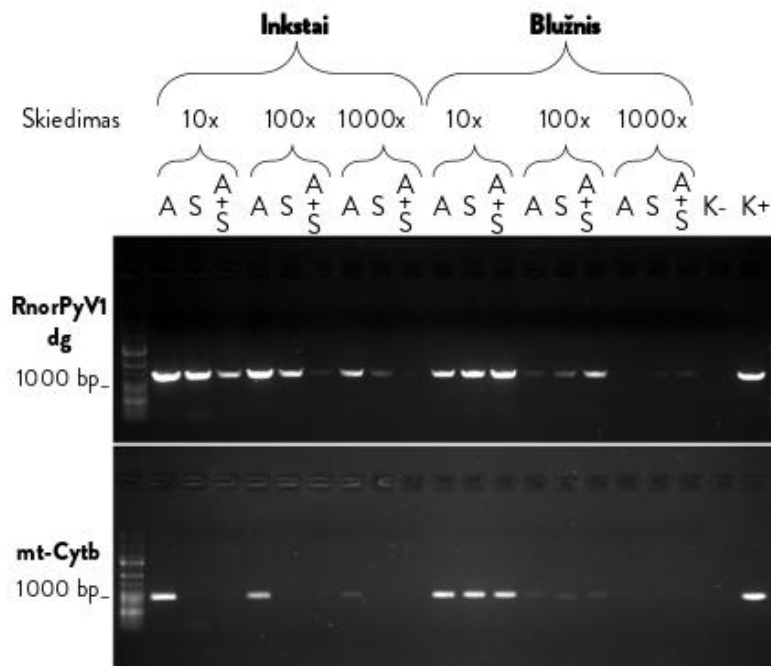
#### 3.1 Poliomos virusams specifinių heksanukleotidinių pradmenų kūrimas ir jų efektyvumo tikrinimas

Siekiant patobulinti mėginių praturtinimo poliomos virusų DNR Phi29 polimeraze metoda, buvo nuspręsta sukurti poliomos virusams specifinius heksanukleotidinius pradmenis, kurie būtų naudojami vietoj įprastų atsitiktinių heksanukleotidinių pradmenų. Buvo sukurta 20 PyV specifinių heksanukleotidinių pradmenų (žr. **2.3.1**). Šių 20 pradmenų efektyvumas specifiškai padauginant PyV DNR buvo tikrinamas Phi29 ir EquiPhi29 polimerazėmis dauginant iš *R. norvegicus* 20 žiurkės inkstų ir blužnies mėginių išskirtą DNR. Iš šių mėginių ankstesnės analizės metu buvo išskirtas RnorPyV1 genomus ir nustatyta jo seka, todėl žinoma, jog mėginiuose tikrai buvo šio viruso DNR. Išskirta DNR buvo padalijama į tris dalis, nusodinama ir padauginama Phi29 polimeraze, naudojant atsitiktinius arba specifinius pradmenis, arba abiejų pradmenų mišinį (santykiu 1:9) (žr. **2.2.13**, **2.3 lentelė**). Naudojant EquiPhi29 polimerazę mėginys buvo padalijamas į 7 dalis, viena dalis paliekama nepadauginta, likusios 6 dalys buvo dauginamos su skirtingais pradmenų mišiniais dviejose temperatūrose – 30 °C 24 val. (t. y., tokiomis pačiomis sąlygomis, kaip dauginant Phi29) arba 45 °C 3 val. (gamintojo rekomenduojamos sąlygos).

Padauginti mėginiai buvo skiedžiami 10, 100 ir 1000 kartų ir naudojami PGR su RnorPyV1 (dg, 1273 bp) ir smulkių graužikų *mt-Cytb* (*mt-Cytb*, 946 bp) DNR sekoms specifiniais pradmenimis (žr. **2.1.10**). RnorPyV1 dg DNR fragmento PGR padauginimo rezultatai rodo PyV DNR padauginimo Phi29 efektyvumą, o *mt-Cytb* DNR – pašalinės (mitochondrinės), ne PyV DNR Phi29 padauginimo efektyvumą. Neigiamai PGR kontrolei buvo naudojami reakcijos mišiniai be DNR, matrica RnorPyV1 specifinės reakcijos teigiamai kontrolei – 20 žiurkės RnorPyV1 diagnostinis fragmentas pTZ57R/T klonavimo vektoriuje; matrica *mt-Cytb* specifinės reakcijos teigiamai kontrolei – 34 žiurkės *mt-Cytb* genas pJET1.2/blunt klonavimo vektoriuje. PGR reakcija buvo atliekama 25 ciklus.

Gauti rezultatai parodė, kad visi naudoti pradmenų mišiniai su Phi29 polimeraze sėkmingai padaugina virusinę DNR, nes su nepadauginta neskiesta mėginių DNR RnorPyV1 dg PGR fragmentai išvis nebuvo susintetinti (duomenys nepateikiami). Rezultatai, gauti naudojant iš inkstų ir blužnies išskirtą DNR nesutapo. Žiurkių PyV DNR inkstų mėginiuose efektyviausiai buvo padauginta atlikus PGR su mėginiais, padaugintais Phi29 naudojant atsitiktinius pradmenis, o blužnies mėginiuose – padaugintais Phi29 naudojant atsitiktinių ir specifinių pradmenų mišinį. *mt-Cytb* genas PGR buvo padaugintas tik atsitiktiniais pradmenimis Phi29 polimeraze padaugintuose

inkstų mėginiuose, bet vienodai gerai su visais trimis pradmenų mišiniais Phi29 polimeraze padaugintuose blužnies mėginiuose (3.1 pav.).

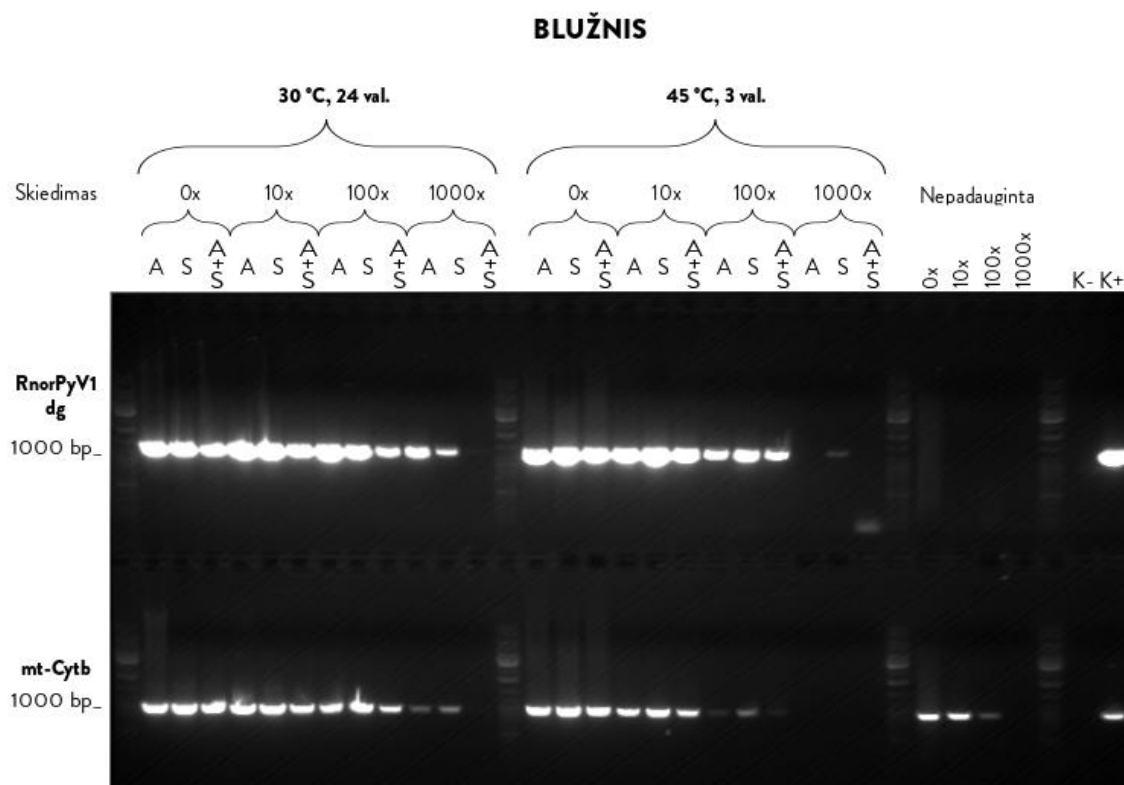
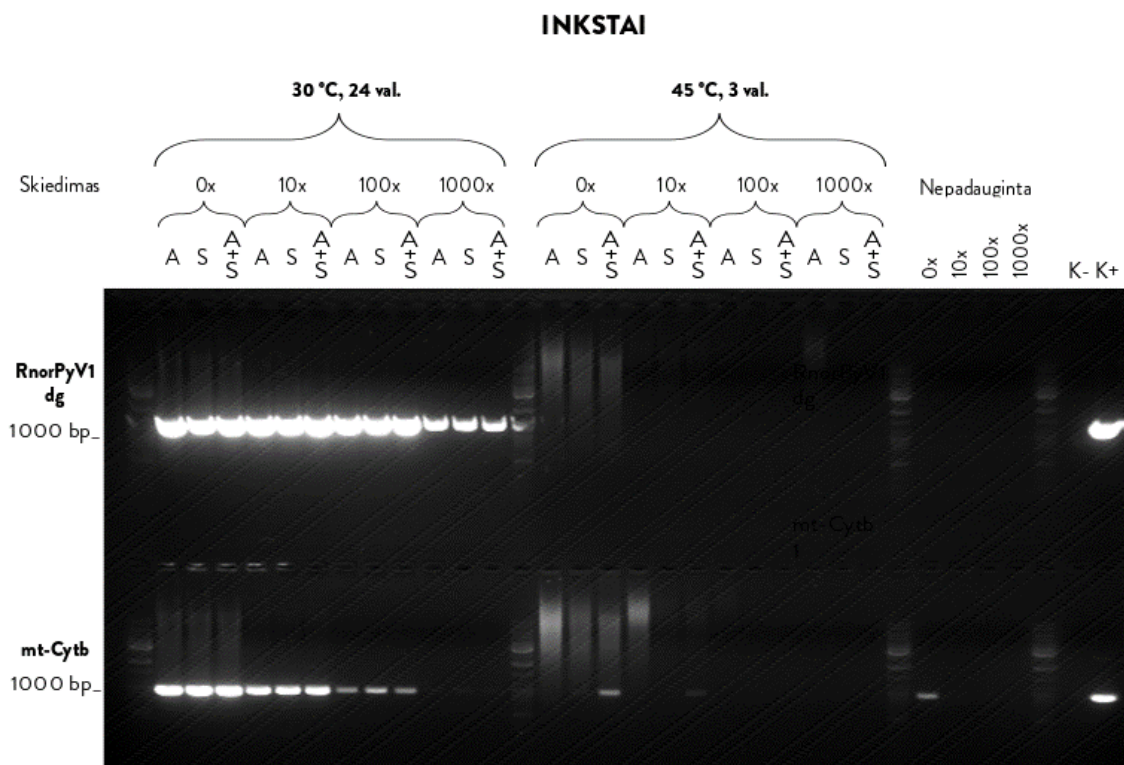


### 3.1 pav. PyV specifinių heksanukleotidinių pradmenų efektyvumo Phi29 polimeraze padauginant PyV ir mtDNR tyrimo rezultatai

Iš 20 žiurkės inkstų ir blužnies mėginių išskirta ir Phi29 polimeraze atsitiktiniais (A), PyV specifiniais (S) arba atsitiktinių+specifinių pradmenų mišiniu (A+S, santykis 1:9) padauginta DNR analizuota atliekant RnorPyV1 (dg, 1273 bp) ir *mt-Cytb* (*mt-Cytb*, 946 bp) specifines PGR reakcijas. RnorPyV1 dg DNR fragmento PGR padauginimo rezultatas rodo PyV DNR padauginimo efektyvumą, o *mt-Cytb* – mitochondrijų DNR padauginimo efektyvumą. K+ – pTZ57R/T-R20-I-dg; pJET-R34-*mt-Cytb*.

Analogiška analizė buvo atlikta ir išskirtos DNR padauginimui naudojant modifikuotą, termostabilesnę ir greitesnę Phi29 – EquiPhi29 polimerazę (3.2 pav.). Šiuo atveju PGR analizė buvo atliekama ir su nepadauginta 10, 100 ir 1000 kartų skiesta inkstų ir blužnies mėginių DNR. PGR matrica naudojant iš blužnies išskirtus ir EquiPhi29 polimeraze padaugintus mėginius, abejomis sąlygomis (30 °C 24 val. ir 45 °C 3 val.) su visais pradmenų mišiniais padaugintuose mėginiuose buvo gauti tiek RnorPyV1 dg, tiek *mt-Cytb* PGR produktai. PGR matrica naudojant iš inkstų išskirtus ir EquiPhi29 polimeraze padaugintus mėginius, RnorPyV1 dg PGR fragmentai buvo gauti tik su mėginiais, daugintais 30 °C 24 val., bet ne su mėginiais, daugintais 45 °C 3 val. *mt-Cytb* PGR produktai buvo gauti su visais pradmenų mišiniais 30 °C 24 val. EquiPhi29 daugintais mėginiais, bet tik naudojant atsitiktinių ir specifinių pradmenų mišinį su 45 °C 3 val. daugintais mėginiais. PGR su blužnies mėginiais, EquiPhi29 polimeraze padaugintais 45 °C 3 val., taip pat parodė blogesnius rezultatus sintetinant tiek *mt-Cytb*, tiek RnorPyV1 dg DNR fragmentus, lyginant su 30 °C 24 val. padaugintais mėginiais. Visais atvejais inkstų ir blužnies mėginiuose *mt-Cytb* DNR fragmentas buvo efektyviausiai padaugintas EquiPhi29





**3.2 pav. PyV specifinių heksanukleotidinių pradmenų efektyvumo EquiPhi29 polimeraze padauginant PyV ir mtDNR tyrimo rezultatai**

Iš 20 žiurkės inkstų ir blužnies mėginių išskirta ir EquiPhi29 polimeraze atsitiktiniais (A), PyV specifiniais (S) arba atsitiktinių+specifinių pradmenų mišiniu (A+S, santykis 1:9) padauginta DNR analizuota atliekant RnorPyV1 (dg, 1273 bp) ir *mt-Cytb* (*mt-Cytb*, 946 bp) specifines PGR reakcijas. RnorPyV1 dg DNR fragmento PGR padauginimo rezultatas rodo PyV DNR padauginimo efektyvumą, o *mt-Cytb* – mitochondrijų DNR padauginimo efektyvumą. K+ – pTZ57R/T-R20-I-dg; pJET-R34-*mt-Cytb*.

polimeraze naudojant PyV specifinius pradmenis. Blužnies mėginiuose, padaugintuose EquiPhi29 30 °C 24 val., RnorPyV1 dg DNR fragmentas PGR buvo efektyviausiai padaugintas PGR matrica naudojant mėginius, padaugintus su atsitiktinių, o 45 °C 3 val. – specifinių pradmenų mišiniu. Toks rezultatas galėtų būti paaiškintas tuo, kad 45 °C temperatūroje pradmenys prie DNR jungiasi specifiškiau nei 30 °C temperatūroje, kurioje pradmenys dažnai jungiasi atsitiktinai.

PGR naudojant nepadaugintą DNR, RnorPyV1 dg DNR fragmentas nebuvo gautas nei inkstų, nei blužnies mėginiuose, o mt-Cytb DNR fragmentas buvo padaugintas abiejų organų mėginiuose. Tai rodo, kad mitochondrinės DNR koncentracija mėginiuose prieš padauginimą buvo gerokai didesnė nei PyV DNR koncentracija. Po padauginimo EquiPhi29 tiek PyV, tiek mitochondrinė DNR PGR buvo padauginama efektyviai, tačiau PGR rezultatų skirtumas matrica naudojant EquiPhi29 polimeraze nepadaugintą ir padaugintą DNR yra daug akivaizdesnis RnorPyV1, nei mitochondrinės DNR atveju, taigi, padauginimui naudojant EquiPhi29, PyV DNR buvo padauginta efektyviau nei mitochondrijų DNR.

PyV specifinių heksanukleotidinių pradmenų mišinys kai kuriais atvejais PyV DNR padaugino efektyviau, o pašalinę DNR – blogiau nei atsitiktinių pradmenų mišinys, tačiau šie rezultatai neatsikartojo visuose eksperimentuose, todėl, kol bus atlikti išsamesni tyrimai, buvo nuspręsta mėginių DNR padauginimui Phi29 arba EquiPhi29 polimeraze rinktis įprastų atsitiktinių pradmenų mišinį.

## 3.2 Poliomos virusų paieška graužikų mėginiuose

### 3.2.1 Poliomos virusų paieška *Microtus* genties pelėnų inkstų mėginiuose

Poliomos virusų paieška buvo atlikta 189 Lietuvoje, Čekijoje, Ispanijoje ir dviejuose Vokietijos regionuose (Mecklenburg-Vorpommern regionas Šiaurėje ir Baden-Württemberg regionas Pietuose) sugautų *Microtus* genties pelėnų inkstų mėginiuose (**1 priedas.**). Mėginiai gauti iš prof. Ulrich Rainer laboratorijos Friedricho Loefflerio institute (vok. *Friedrich-Loeffler-Institut*) Vokietijoje. Lietuvoje buvo sugauti trijų rūšių pelėnai – *M. agrestis*, *M. arvalis* ir *M. oeconomus*. Kituose regionuose visi sugauti pelėnai buvo *M. arvalis* rūšies. Iš inkstų mėginių buvo išskirta virusinė DNR (žr. **2.2.12**) ir padalinta į dvi dalis. Viena dalis buvo iškart naudojama PGR (nepadauginta), kita dalis buvo padauginta naudojant Phi29 arba EquiPhi29 polimerazę (padauginta) (žr. **2.2.13**). EquiPhi29 polimerazė mėginių paruošimui poliomos virusų paieškai buvo naudota pirmą kartą, todėl buvo pabandyta palyginti jos efektyvumą su įprastai naudojama Phi29 polimeraze. Mėginiai padauginimui viena ar kita polimeraze buvo parinkti atsitiktinai, 24 atsitiktinius mėginius padauginant Phi29 polimeraze, likusius – EquiPhi29. Visi 15 tirtų mėginių iš

Ispanijos buvo padauginti Phi29 polimeraze. Iš viso 111 mėginių buvo padauginti Phi29 polimeraze ir 78 EquiPhi29 (**3.1 lentelė**). Padauginta ir nepadauginta DNR buvo naudojama poliomos virusų paieškai lizdinės PGR metodu (žr. **2.2.14**).

**3.1 lentelė. Tirtų *Microtus* genties pelėnų inkstų mėginių suvestinė**

Regionas, pagavimo metai ir rūšis	Visi mėginiai	Phi29	EquiPhi29
<b>Lietuva (LT)</b> 2016-2017 m.	57	24	33
<i>M. agrestis</i>	12	6	6
<i>M. arvalis</i>	27	12	15
<i>M. oeconomus</i>	18	6	12
<b>Šiaurės Vokietija (SV), Mecklenburg-Vorpommern regionas</b> 2010, 2011, 2013, 2014 m.	37	24	13
<i>M. arvalis</i>			
<b>Pietų Vokietija (PV), Baden-Württemberg regionas</b> 2010, 2011, 2014 m.	40	24	16
<i>M. arvalis</i>			
<b>Čekija (CK)</b> 2016 m.	40	24	16
<i>M. arvalis</i>			
<b>Ispanija (ISP)</b> 2015 m.	15	15	0
<i>M. arvalis</i>			
<b>Iš viso</b>	189	111	78

Poliomos virusų paieškai paruoštuose mėginiuose buvo naudojami poliomos virusų LTag DNR sekoms specifiniai degeneruoti lizdinės PGR pradmenys (**2.1 lentelė**). Nuo keturių pelėnų iš Ispanijos ir vieno pelėno iš Šiaurės Vokietijos inkstų mėginių buvo padauginti numatyto dydžio (205–235 bp) DNR fragmentai. Šie DNR fragmentai buvo išskirti iš agarozės gelio (žr. **2.2.11**) ir, užbukinus jų galus, įsiūti į sekoskaitai skirtą plazmidinį vektorių pJET1.2/blunt. Vektoriaus plazmidinė DNR su įsiūtais DNR fragmentais po padauginimo *E. coli* bakterijų DH5 $\alpha$  kamieno ląstelėse ir išskyrimo iš bakterijų ląstelių buvo hidrolizuojama restrikcijos endonukleazėmis, vizualizuojama DNR elektroforeogramoje ir analizuojama (žr. **2.2.1–6, 2.2.8**). Atrinktų plazmidinių vektorių su įsistačiusiais 205–235 bp dydžio DNR fragmentais DNR fragmentų sekos buvo nustatytos VU GMC Biotechnologijos instituto sekoskaitos centre (žr. **2.2.7**), sekoskaitai naudojant vektoriui specifinius sekoskaitos pradmenis (žr. **2.1 lentelė**).

PGR matrica naudojant iš 2010 m. Šiaurės Vokietijoje sugauto pelėno nr. 1 inkstų išskirtą nepadaugintą DNR, lizdinės PGR metodu buvo gautas 225 bp ilgio PGR fragmentas. Nustatyta DNR fragmento seka buvo palyginta su esančiomis duomenų bazėse, naudojant NCBI BLAST lokalaus sekų palyginimo įrankį (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool,

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Seka buvo >99 % panaši į CVPyV (KR612374.1). Vėliau buvo atliktos diagnostinės CVPyV PGR su visais mėginiais, naudojant keturias CVPyV specifinių pradmenų kombinacijas (dg1–4, **2.1 lentelė.**), tačiau CVPyV DNR nebuvo padauginta nei viename mėginyje **3.2 lentelė.**)

PGR matrica naudojant iš pelėnų, sugautų Ispanijoje, inkstų (3, 4, 9, 15 pelėnai) išskirtą ir Phi29 padaugintą DNR, lizdinės PGR metodu buvo padauginti 230 bp ilgio DNR fragmentai. Nustatytos šių DNR fragmentų sekos buvo 82–83 % panašios į pelių pneumotropinio poliomos viruso DNR seką (KT987217.1), o panašumas į CVPyV (KR612373.1) siekė 70–71 %. Aptiktos PyV sekos reikšmingai skyrėsi nuo kitų žinomų poliomos virusų DNR sekų, todėl virusas buvo pavadintas *Microtus arvalis* PyV 2 (MarPyV2) (šio viruso atitikimas naujos PyV rūšies kriterijams aptartas **3.2.1.1** skyriuje). Buvo nustatyta pilna šio viruso genomo seka (aprašyta **3.2.1.1**) ir sukurti diagnostiniai pradmenys (**2.1 lentelė.**), kurie buvo panaudoti MarPyV2 paieškai visuose mėginiuose. Naudojant diagnostinius pradmenis buvo nustatyti 9 MarPyV2 infekuoti 2014 ir 2011 m. Pietų Vokietijoje sugauti pelėnai, 4 iš jų inkstų mėginiai buvo padauginti Phi29 polimeraze, 5 – EquiPhi29. Tik vienas 2010 m. Šiaurės Vokietijoje sugautas pelėnas buvo užsikrėtęs MarPyV2, virusas buvo aptiktas Phi29 padaugintame inkstų mėginyje. Tirtuose Lietuvoje ir Čekijoje sugautų pelėnų inkstų mėginiuose šių poliomos virusų nebuvo aptikta (**3.2 lentelė.**).

**3.2 lentelė. Poliomos virusų paieškos *Microtus* genties inkstų mėginiuose rezultatai**

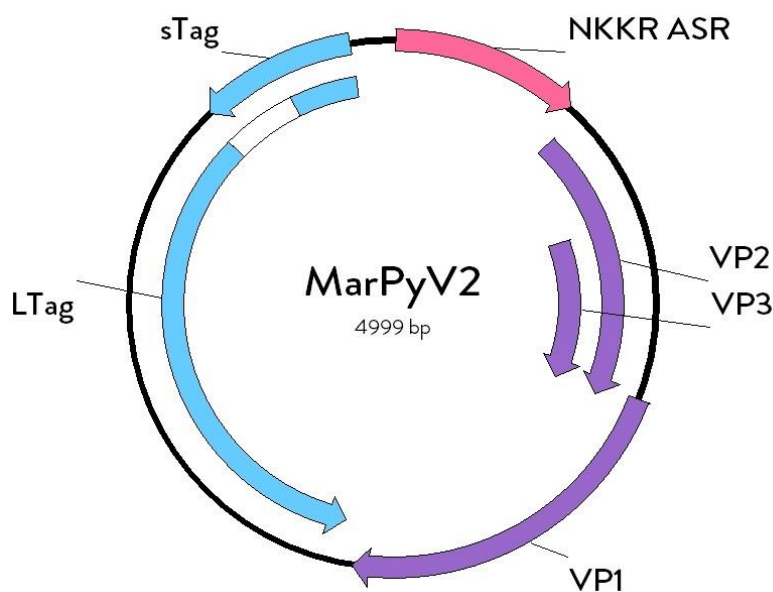
Regionas ir rūšis	Iš viso mėginių	Nepadauginti			Phi29			EquiPhi29			Iš viso teig.			
		CVPyV1	MarPyV2	Teigiamų, %	Mėginių	CVPyV1	MarPyV2	Teigiamų, %	Mėginių	CVPyV1	MarPyV2	Teigiamų, %	Mėginių	Proc.
Lietuva	57	0	0	0	24	0	0	0	33	0	0	0	0	0
Šiaurės Vokietija	37	1	0	2,7	24	0	1	4,16	13	0	0	0	2	5,4
Pietų Vokietija	40	0	0	0	24	0	4	16,6	16	0	5	31,25	9	22,5
Čekija	40	0	0	0	24	0	0	0	16	0	0	0	0	0
Ispanija	15	0	0	0	15	0	4	26,6	0	0	0	0	4	26,6
<b>Iš viso</b>	<b>189</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0,53</b>	<b>111</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>8,11</b>	<b>78</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>6,41</b>	<b>15</b>	<b>7,93</b>

Poliomos virusai iš viso buvo aptikti 15 iš 189 mėginių (7,93 %), PyV sekos buvo aptiktos 1 nepadaugintame mėginyje (0,53 %) ir 14 padaugintų mėginių (7,41 %). Iš padaugintų mėginių, kuriuose buvo aptiktos PyV sekos, 9 mėginiai buvo padauginti Phi29 (8,11 % visų mėginių, padaugintų Phi29) ir 5 – EquiPhi29 (6,41 % visų mėginių, padaugintų EquiPhi29).

Pritaikius dviejų proporcijų lygybės testą (žr. 2.3.2), buvo palygintas PyV aptikimo dažnis tarp nepadaugintos (1/189) ir bet kuria polimeraze padaugintos (14/189) DNR. Buvo nustatytas reikšmingas ( $p = 0,0016$ ) skirtumas tarp šių proporcijų, vadinasi, Phi29 arba EquiPhi29 padaugintuose mėginiuose didesnė tikimybė aptikti PyV DNR nei nepadaugintuose mėginiuose. Palyginus PyV aptikimo dažnį tarp mėginių, padaugintų Phi29 (9/111) arba EquiPhi29 (5/78) polimeraze, statistiškai reikšmingas skirtumas nebuvo nustatytas ( $p = 0,8755$ ).

### 3.2.1.1 *Microtus* genties pelėnuose aptiktų poliomos virusų genomų padauginimas ir analizė

Poliomos virusų pilnų genomų padauginimui buvo sukurti viso geno padauginimo pradmenys (2.1 lentelė.). Pilno CVPyV geno šiame tyrime padauginti nepavyko, jo viso geno seka nebuvo nustatyta. Naudojant MarPyV2 pilno geno padauginimo pradmenis buvo padauginti 7 pilni MarPyV2 genomi iš Vokietijoje ir Ispanijoje sugautų pelėnų mėginių. Padaugintų genomų DNR sekos buvo nuskaitytos pradmenų žingsniaavimo sekoskaitos metodu.



### 3.3 pav. MarPyV2 geno struktūros schema

Skirtingomis spalvomis pažymėti *Microtus arvalis* PyV 2 geno koduojami elementai – struktūriniai VP1, VP2 ir VP3 baltymai bei didysis ir mažasis T antigenai. MarPyV2 taip pat turi galimą nežinomos funkcijos baltymą koduojantį ASR nekoduojančiame kontrolės regione, o LTag genas turi vieną introną.

Padauginti MarPyV2 genomi yra 4985–4999 bp ilgio ir turi PyV būdingą struktūrą – skirtingomis kryptimis nuo replikacijos pradžios srities išsidėsčiusius VP1, VP2, VP3 bei LTag ir sTag koduojančius genus (3.3 pav.). MarPyV2 geno NKK regione taip pat yra atviras skaitymo rėmelis, koduojantis galimą nežinomos funkcijos baltymą, o LTag geno seka turi vieną introną. Atlikus papildomo NKKR geno elemento aminorūgščių sekos paiešką duomenų bazėse, buvo nustatytas žemas panašumas į kofermento A transferazių ar. sekas (34 % sekos padengimas, 28 %

sutapimas). MarPyV2 ISP\_15 genomo koduojamų elementų genų ir baltymų sekų ilgiai ir pozicijos genome pateiktos lentelėje (3.3 lentelė.).

**3.3 lentelė. MarPyV2 genomo koduojami elementai, ISP\_15 klonas**

Elementas	MarPyV2		
	Geno vieta genome	Geno dydis	Baltymo dydis
<b>LTag</b>	(2670..4368,4633..4869)	2200 (1935) bp	645 ar.
Splaisingo donorinė seka	AACAGAAAAGgtctgtgtgg		
Splaisingo akceptorinė seka	tgttttgcagATACCTCCCT		
<b>sTag</b>	4390-4869	480 bp	160 ar.
<b>VP1</b>	1540-2622	1083 bp	361 ar.
<b>VP2</b>	606-1577	972 bp	324 ar.
<b>VP3</b>	963-1577	615 bp	205 ar.
<b>NKKR ASR</b>	1-576	576 bp	192 ar.

Septyni padauginti genomai buvo palyginti su jiems artimiausiu *Mus musculus* PyV 2 – viso genomo sekos panašumas siekė ~73 % (3.4 lentelė.). Palyginus MarPyV2 ir MPtV VP1 ir LTag genų ir baltymų sekas buvo nustatyta, kad abiejų baltymų sekos buvo panašesnės tarpusavyje nei juos koduojančios DNR sekos. VP1 panašumas siekė 76 % ir 88 %, LTag – 76 % ir 81 % atitinkamai geno ir baltymo sekoms. Palyginus MarPyV2 ir kito *M. arvalis* infekuojančio poliomos viruso CVPyV (*Microtus arvalis* PyV 1) DNR ir baltymų sekas, gauti priešingi rezultatai. Genomų sekos tarp MarPyV2 ir CVPyV sutapo 62 %, VP1 ir LTag genų koduojančių sekų – po 60 %, o baltymų – vos 30 % ir 49 % (tikslūs skaičiai pateikti priede 4 priedas.).

**3.4 lentelė. Nustatytų MarPyV2 genomų palyginimas su MPtV**

Lentelėje pateikiamas nustatytų MarPyV2 pilnų genomų ir VP1 bei LTag genų ir baltymų sekų skirtingų nukleotidų arba aminorūgščių skaičius lyginant su MPtV sekomis. Skliausteliuose pateiktas sekos sutapimo procentas. Sekų palyginys sukurtas naudojant Muscle algoritimą ir MEGA X programinę įrangą.

Mėginys	Regionas	Genomo dydis, bp	Artimiausias PyV <i>Mus musculus</i> PyV 2 (5005 bp)				
			Visas genomas	VP1, nt.	VP1, ar.	LTag, nt.	LTag, ar.
<b>4</b>	Ispanija	4999	<b>1302</b> (73,98 %)	<b>266</b> (75,84 %)	<b>42</b> (88,36 %)	<b>475</b> (75,71 %)	<b>124</b> (80,00 %)
<b>15</b>	Ispanija	4999	<b>1303</b> (73,96 %)	<b>266</b> (75,84 %)	<b>42</b> (88,36 %)	<b>475</b> (75,71 %)	<b>125</b> (80,62 %)
<b>17</b>	Pietų Vokietija	4985	<b>1281</b> (74,40 %)	<b>266</b> (75,84 %)	<b>41</b> (88,64 %)	<b>461</b> (76,43 %)	<b>122</b> (81,02 %)
<b>18</b>	Pietų Vokietija	4991	<b>1285</b> (74,32 %)	<b>266</b> (75,84 %)	<b>41</b> (88,64 %)	<b>460</b> (76,48 %)	<b>122</b> (81,02 %)

<b>19</b>	Pietų Vokietija	4985	<b>1280</b> (74,42 %)	<b>266</b> (75,84 %)	<b>41</b> (88,64 %)	<b>460</b> (76,48 %)	<b>122</b> (81,02 %)
<b>24</b>	Pietų Vokietija	4985	<b>1279</b> (74,44 %)	<b>266</b> (75,84 %)	<b>41</b> (88,64 %)	<b>459</b> (76,53 %)	<b>122</b> (81,02 %)
<b>7</b>	Šiaurės Vokietija	4997	<b>1290</b> (74,22 %)	<b>264</b> (76,02 %)	<b>40</b> (88,91 %)	<b>463</b> (76,32 %)	<b>120</b> (81,33 %)

MarPyV2 genomai, pasižymintys poliomos virusams būdinga genomo struktūra (žiedinis ~5 kb dgDNR genomas, ankstyvasis ir vėlyvasis regionai, išsidėstę priešingomis kryptimis ir atskirti nekoduojančio regiono), buvo išskirti iš 7 skirtingose Europos vietose pagautų *Microtus arvalis* individų inkstų mėginių. Visų 7 pelėnų rūšys buvo patvirtintos molekuliniiais metodais pagal *mt-Cytb* geno sekas. LTag koduojančių nukleotidų sekų tarp naujo aptikto MarPyV2 ir jam artimiausio MPtV skirtumas siekė mažiausiai 23,47 %, o skirtumas tarp MarPyV2 ir CVPyV – mažiausiai 38,59 %. MarPyV2 gali būti laikomas nauju *M. arvalis* poliomos virusu, nes atitinka naujos PyV rūšies apibrėžimo kriterijus – turi PyV būdingą genomo struktūrą, jo šeimininkas – *Microtus arvalis*, o LTag koduojančių sekų skirtumas nuo jam artimiausio PyV (MPtV) didesnis nei 15 %.

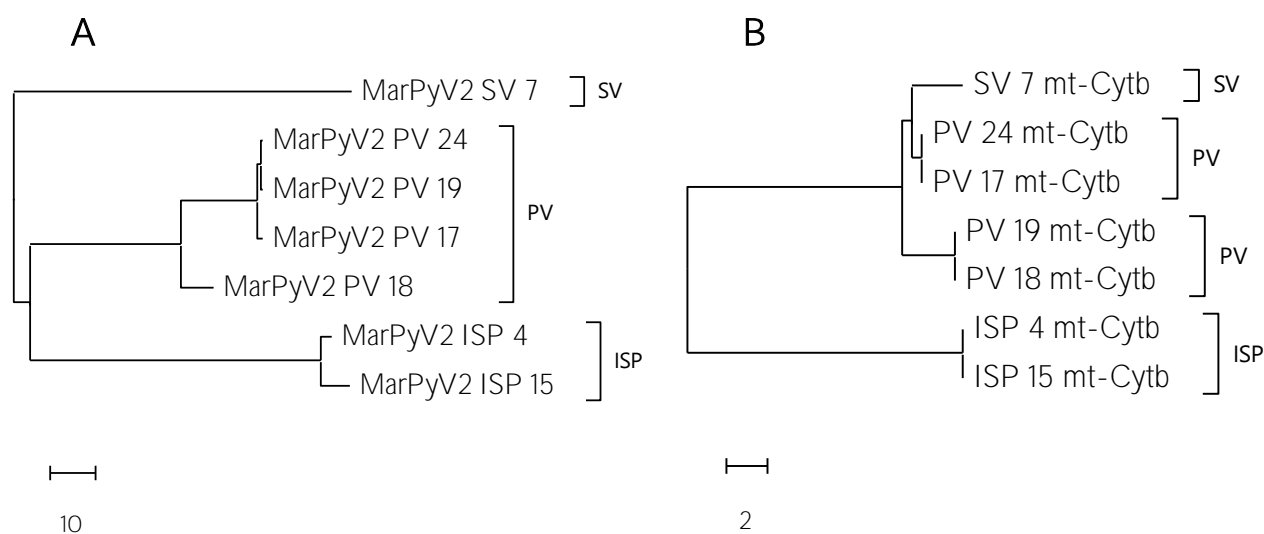
### 3.2.1.2 MarPyV2 filogenezės ir koevoliucijos su šeimininku tirtose populiacijose analizė

Lyginant tarpusavyje visų 7 padaugintų MarPyV2 genomų sekas, iš 5020 lygintų nt. pozicijų 221 jų buvo variabilios, ir 4799 – konservatyvios, vienodos visuose 7 genomuose. MarPyV2 viso genomo sekos buvo artimiausios tarp PV\_19 ir PV\_24 mėginių (1 nt. skirtumas), labiausiai nutolusios – tarp ISP\_15 ir SV\_7 (150 nt. skirtumų). PV\_17, 18, 19 ir 24 mėginių VP1 geno sekos nesiskyrė visiškai, SV\_7 ir ISP\_4 bei 15 mėginių VP1 geno sekos skyrėsi 27 ir 28 nt., o baltymo – 2 aminorūgštimis. Iš vokiškų ir ispaniškų pelėnų išskirtų MarPyV2 LTag geno sekos skyrėsi 55–58 nt., baltymo sekos – 10–13 aminorūgščių. Detalūs genomų sekų palyginimų duomenys pateikiami priede (**4 priedas.**).

Nustatytų PyV genomų sekos variabilios, todėl buvo nuspręsta sudaryti MarPyV2 genetinius atstumais tarp genomų sekų paremtą filogenetinį medį ir patikrinti, kaip grupuojasi nustatyti virusiniai genomai. Analogiškas filogenetinis medis buvo sudarytas ir pagal virusų šeimininkų dalines *mt-Cytb* geno sekas, norint palyginti, ar evoliuciškai PyV šeimininkai ir jų virusai grupuojasi panašiai, t. y., ar viruso evoliucija atitinka jo šeimininko evoliuciją.

Gauti filogenetiniai medžiai parodė, kad tiek virusai (**3.4 pav., A**), tiek jų šeimininkai (**3.4 pav., B**) išsiskiria į grupes pagal tiriamą populiaciją. Pelėnai atsiskyrė į dvi grupes – sugautų Ispanijoje (ISP) ir Vokietijoje (PV, SV). MarPyV2 atveju į atskiras grupes išsiskyrė ir Pietų bei

Šiaurės Vokietijoje (PV ir SV) surinktuose mėginiuose identifikuoti virusai. SV\_7 MarPyV2 genomo seka buvo žymiau labiau nutolusi nuo kitų MarPyV2 genomų, nors šio pelėno *mt-Cytb* geno seka nuo kitų Vokietijoje sugautų pelėnų sekų skyrėsi nežymiai.

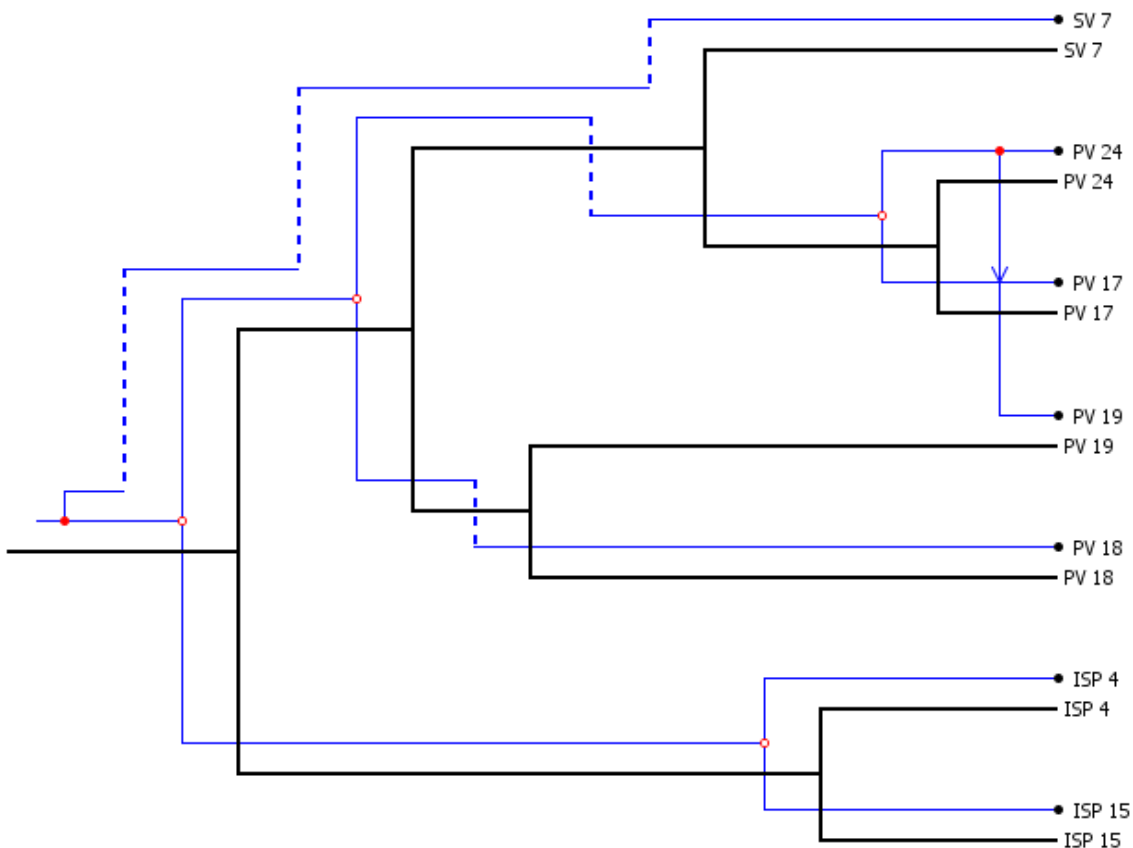


### 3.4 pav. Nustatytų MarPyV2 genomų (A) ir jų šeimininkų (B) tarpusavio filogenetiniai ryšiai

Filogenetiniai medžiai buvo sudaryti pagal nustatytų MarPyV2 virusų viso genomo sekas, medžio šakų ilgio suma = 211,597 (A) ir pelėnų, iš kurių buvo išskirti šie virusai, *mt-Cytb* geno dalines 874 bp ilgio sekas, šakų ilgio suma = 30,5 (B). Filogenetiniai medžiai sudaryti naudojant minimalios evoliucijos metodą (Rzhetsky ir Nei, 1992) (sudarymas aprašytas 2.3.4) ir atitinka mastelį, skalė – skirtumų skaičius tarp sekų. Analizė atlikta naudojant MEGA X.

Sudaryti MarPyv2 genomų ir pelėnų *mt-Cytb* filogenetiniai medžiai rodė tikėtiną MarPyV2 ir pelėnų koevoliuciją tirtose populiacijose, todėl buvo išanalizuoti JANE programa (Conow ir kt., 2010), siekiant nustatyti MarPyV2 virusų ir jų šeimininkų koevoliucijos įvykius, lėmusius dabartinius evoliucinius ryšius (žr. 2.3.5). Analizei panaudotos 5 įvykių–kainos kombinacijos pateikė du galimus sprendinius. I kainų kombinacija viruso–šeimininko ryšius išsprendė 3 kodivergencijos ir 3 duplikacijos su šeimininko keitimu įvykiais. II–V kainų kombinacijos pasiūlė vienodą sprendimą, apimantį 4 viruso ir šeimininko kodivergencijos įvykius, 1 duplikaciją, 1 duplikaciją su šeimininko keitimu ir 5 iškritas. Kadangi šeimininko keitimas yra retas įvykis tarp PyV, II–V kainų kombinacinių sprendinys yra daug labiau tikėtinas, todėl jis buvo analizuojamas plačiau (3.5 pav.). Šio sprendinio atveju, MarPyV2 kodivergencija su šeimininku atsako už ~36 %, o iškritos – už ~45 % MarPyV2 variantų evoliucinės įvairovės. Remiantis gautais duomenimis, galima daryti prielaidą, kad MarPyV2 rūšies evoliuciniam kintamumui tarppopuliaciniame lygmenyje šie du įvykiai yra svarbiausi.





### 3.5 pav. MarPyV2 variantų ir jų šeimininkų koevoliucijos sprendinys

Juoda spalva nubraižytas šeimininko *M. arvalis* filogenetinis medis, mėlyna spalva – jį infekuojančio MarPyV2 filogenetinis medis. Medis sudarytas pagal II-V įvykio–kainos kombinacijų sprendinį. Pateikiamas sprendinys, turintis žemiausią įvertį (kainą). Tuščiaiduriai rutuliukai rodo kodivergencijos su šeimininku įvykius, pilnaviduris rutuliukas – duplikaciją, pilnaviduris rutuliukas ir linija su rodykle – duplikaciją su šeimininko keitimu, brūkšninės linijos – įvykusius genetinės medžiagos praradimus. Sprendinys sudarytas JANE programa.

### 3.2.2 Poliomos virusų paieška *Apodemus* genties pelių mėginiuose

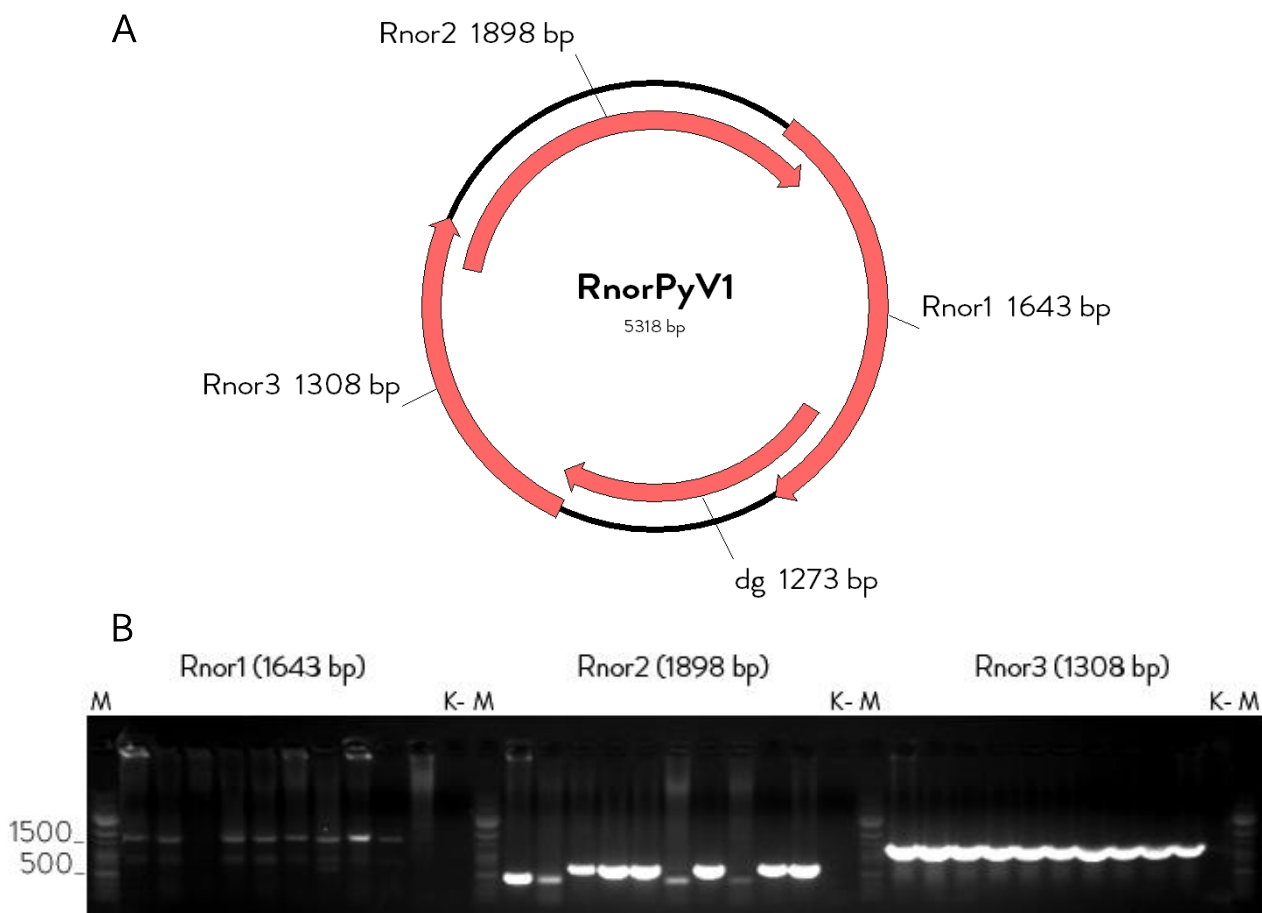
Poliomos virusų paieška buvo atlikta 34 2014–2016 m. Lietuvoje pagautose *Apodemus* genties pelėse. Buvo tiriami 18 dirvinių pelių (*Apodemus agrarius*) ir 16 geltonkaklių pelių (*Apodemus flavicollis*) inkstų, blužnies, plaučių ir krūtinės ertmės skysčio mėginiai (2 priedas.). Virusinė DNR iš mėginių buvo išskiriama, padalinama į dvi dalis ir padauginama, kaip aptarta anksčiau. Visų *Apodemus* pelių mėginių DNR padauginimui buvo naudota Phi29 polimerazė.

Visuose pelių mėginiuose buvo atlikta PyV paieška į LTag nutaikytos lizdinės PGR bei AflaPyV1 specifinės dg PGR metodais, o KES – ir į VP1 nutaikytos lizdinės PGR metodu (žr. 2.1 lentelė.). AflaPyV1 diagnostiniai ir VP1 lizdiniai pradmenys PyV DNR nepadaugino nei

viename mėginyje, o LTag lizdinės PGR metodu 4 pelės (*A. flavicollis*) Phi29 padaugintame inkstų mėginyje buvo aptikta PyV DNR. Padauginto 215 bp DNR fragmento seka 98 % sutapo su AflaPyV1 DNR seka (MG654478.1). Viso genomo padauginimo PGR su AflaPyV1 specifiniais genomo padauginimo pradmenimis (žr. **2.1 lentelė.**) buvo atlikta matricomis naudojant iš visų turimų 4 pelės organų mėginių išskirtą padaugintą ir nepadaugintą DNR, tačiau pilno PyV genomo dydžio fragmentų nebuvo gauta.

### 3.2.3 Poliomos virusų paieška *Rattus* genties žiurkių mėginiuose

Ankstesnių tyrimų metu Lietuvoje sugautų pilkosios (*Rattus norvegicus*) ir juodosios (*Rattus rattus*) žiurkių mėginiuose buvo atlikta RnorPyV1 ir RatPyV2 paieška. RnorPyV1 buvo aptiktas abiejų rūšių žiurkių, o RatPyV2 – tik juodosios žiurkės mėginiuose. Buvo nustatytos pilnos genomų sekos RnorPyV1, išskirto iš *Rattus norvegicus*, ir RatPyV2, išskirto iš *Rattus rattus* mėginių. RnorPyV1 pilno genomo seka iš *R. rattus* žiurkių nebuvo nustatyta, nors šio viruso DNR buvo aptikta juodosiose žiurkėse (Kurmauskaitė, 2018).



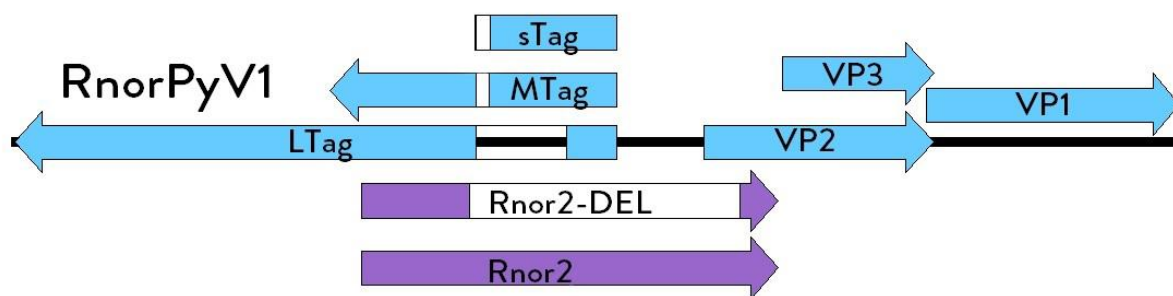
**3.6 pav. RnorPyV1 genomo padauginimo fragmentų schema (A) ir iš *R. rattus* mėginių išskirto RnorPyV1 genomų fragmentų padauginimo elektroforeograma (B)**

Takeliuose iš kairės į dešinę 38–43, 45–47 ir 50 *R. rattus* žiurkių mėginiai; K- reakcijos mišinio be DNR kontrolė.

Šio tyrimo metu buvo bandoma padauginti RnorPyV1 genomą iš *R. rattus* mėginių. Buvo tirti 50 žiurkių Phi29 padauginti inkstų mėginiai – 15 *R. norvegicus* ir 35 *R. rattus*. Vienos žiurkės (nr. 34, *R. rattus*) buvo tirtas ir iš plaučių išskirtas Phi29 padaugintas mėginys (**3 priedas**).

RnorPyV1 dg (**3.6 pav., A**) PGR buvo atlikta naudojant iš 12 *R. rattus* žiurkių (37–47, 50) inkstų ir iš vienos žiurkės (34) plaučių išskirtus mėginius. Numatyto dydžio 1273 bp DNR fragmentas buvo padaugintas nuo 10 iš 12 tirtų inkstų mėginių (38–43, 45–47 ir 50) ir nuo 34 žiurkės plaučių mėginio. Buvo nustatytos visų 11 padaugintų DNR fragmentų sekos, jų panašumas į RnorPyV1 (KR065723.1) siekė 99 %. Šie mėginiai buvo panaudoti RnorPyV1 geno fragmentų (Rnor1, 2, 3, **2.1 lentelė**.) padauginimui PGR (**3.6 pav., A**). Po padauginimo pastebėta, kad dauginant Rnor1 ir Rnor3 DNR fragmentus buvo gauti numatyto dydžio fragmentai (1643 ir 1308 bp atitinkamai), tačiau dauginant Rnor2 DNR fragmentą, padauginto DNR fragmento dydis buvo 400–700 bp, vietoj numatyto 1898 bp (**3.6 pav., B**).

Buvo nustatytos Rnor1–3 DNR fragmentų, padaugintų nuo iš 34 žiurkės plaučių mėginio išskirtos DNR, sekos. Rnor1 ir 3 DNR fragmentų panašumas į RnorPyV1 (KR075945.1) siekė 99 %. Padaugintas Rnor2 DNR fragmentas buvo 659 bp ilgio ir 100 % sutapo su RnorPyV1 geno seka (KR075945.1). Lyginant su RnorPyV1 genomu, padaugintas Rnor2 DNR fragmentas turėjo 1226 bp ilgio iškritą sekos viduryje (**3.7 pav.**): Rnor2 1–490 nt. DNR seka atitiko RnorPyV1 geno seką 4158–4647 nt., o 487–659 nt. sutapo su 559–731 RnorPyV1 geno nukleotidais. Nustatyta iškrita apima visą viruso mažąjį T antigeną, pusę viduriniojo T antigeno, LTag geno pradžią, visą NKK regioną bei VP2 geno pradžią. Nuskaityti Rnor1, 2, 3 ir dg DNR fragmentai buvo surinkti į 4114 bp ilgio PyV DNR genomą, kuris buvo pavadintas RnorPyV1-DEL.



### 3.7 pav. RnorPyV1 geno ir Rnor2 geno fragmentų su ir be iškritos schema

Paveiksle pavaizduota RnorPyV1 linearizuoto geno schema su pagrindiniais koduojamais elementais, pilnas Rnor2 fragmentas ir Rnor2-DEL DNR fragmentas, turintis 1226 bp iškritą. Rnor2-DEL DNR fragmentas buvo padaugintas nuo iš 34 žiurkės plaučių mėginio išskirtos DNR.

Analizuojant nuo iš 34 žiurkės plaučių mėginio išskirtos DNR padaugintų fragmentų Rnor1 ir Rnor3 sekas buvo pastebėta, kad kai kurių klonų nustatytos DNR sekos yra daug labiau

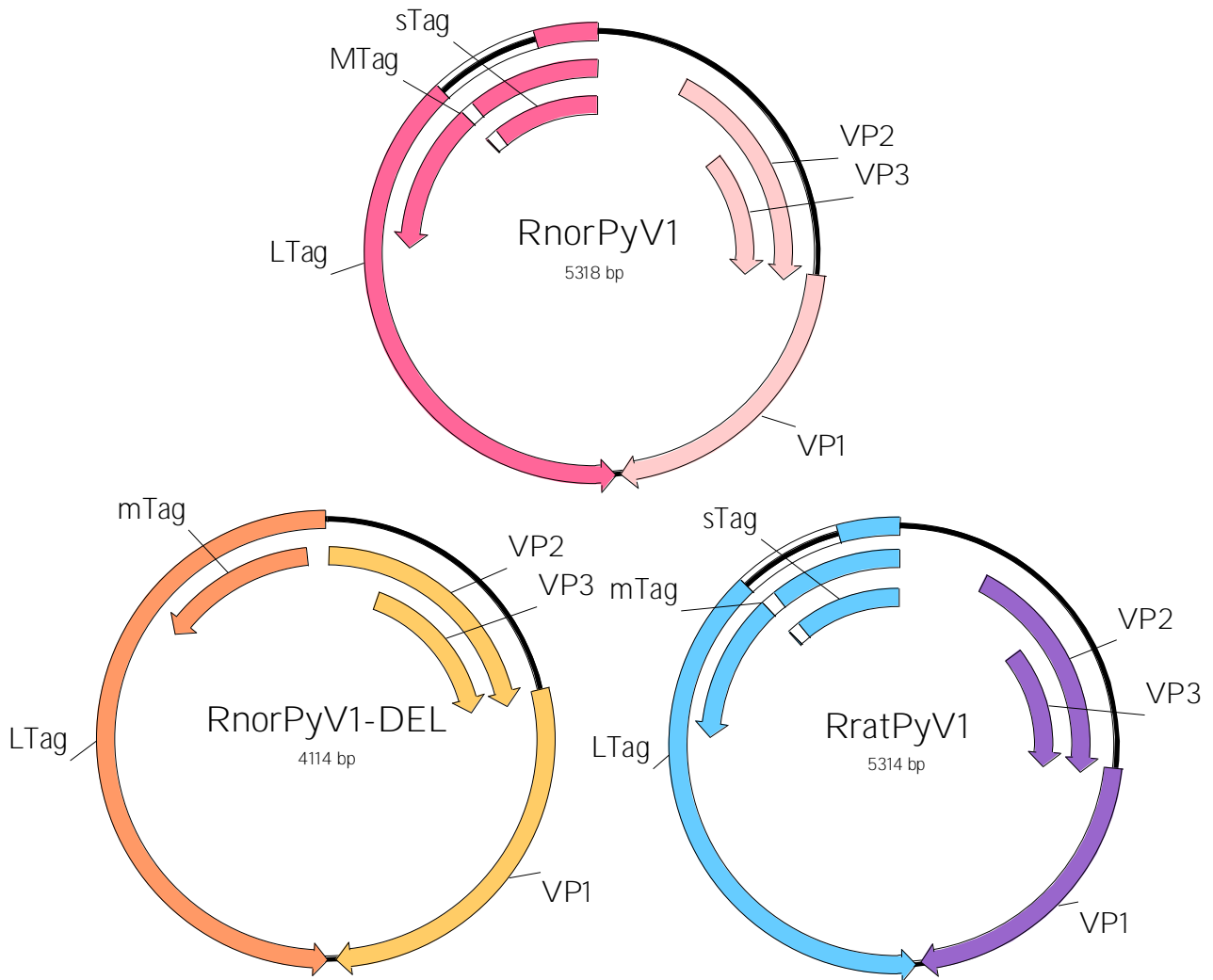
nutolusios nuo RnorPyV1 – jų panašumas siekė 90 %. Pagal nustatytas sekas buvo sukurti pradmenys likusioms pakitusio genomo dalims padauginti (*Rattus rattus* PyV 1 pradmenys, **2.1 lentelė.**). Buvo surinktas 5314 bp PyV genomas, kurio sekos panašumas į RnorPyV1 siekė 92 %. Šis virusas buvo pavadintas *Rattus rattus* PyV 1 (RratPyV1), nes buvo aptiktas šios rūšies žiurkėse.

Toliau 1–36 žiurkių (13 *R. norvegicus*, 23 *R. rattus*) inkstų mėginiuose buvo ieškoma RratPyV1 viruso DNR, naudojant Rrat1 fragmentą dauginančius pradmenis (**2.1 lentelė.**). Numatyto dydžio fragmentai buvo gauti tiriant 6 žiurkių mėginius (1, 4–7, 31), visos šios žiurkės priklausė *Rattus rattus* rūšiai. Buvo nustatytos PGR produktų, gautų nuo 1, 4 ir 7 žiurkių mėginių, DNR sekos. Šių DNR fragmentų panašumas į RnorPyV1 siekė 90 %, o panašumas į naują RratPyV1 – daugiau nei 99 %. Visų žiurkių, kuriose buvo aptiktos PyV sekos, rūšys buvo patvirtintos molekuliniais metodais pagal *mt-Cytb* geno seką.

### **3.2.3.1 RnorPyV1, RnorPyV1-DEL ir RratPyV1 žiurkės infekuojančių poliomos virusų genomų palyginimas**

*R. rattus* žiurkių mėginiuose aptikti RnorPyV1-DEL ir RratPyV1 genomai yra labai artimi *R. norvegicus* RnorPyV1 – jų sekos sutampa 99 % (neskaitant iškritos) ir 92 % procentais. RratPyV1 pasižymi poliomos virusams būdinga genomo struktūra – turi ankstyvąjį ir vėlyvąjį transkripcijos regionus, atskirtus nekoduojančios srities (**3.8 pav.**). RnorPyV1 ir RratPyV1 koduojami struktūriniai baltymai ir sTag yra vienodo ilgio, o RratPyV1 koduojamos LTag ir mTag baltymų sekos sutrumpėjusios 2 ir 4 aminorūštimis (**3.5 lentelė.**).

Priešingai RratPyV1, RnorPyV1-DEL genomo struktūra neatitinka įprastos PyV genomų struktūros: dėl 1226 bp iškritos virusas yra praradęs visą nekoduojantį reguliacinį regioną, kuriame yra už viruso transkripciją atsakingos sekos (**3.8 pav.**), todėl gali būti, kad šis virusas nėra transkribuojamas. RratPyV1 taip pat koduoja N-galą praradusius, įprastinio translacijs pradžios kodono neturinčius VP2, LTag ir mTag baltymus, todėl šie baltymai gali būti transliuojami nebent nuo tolimesnių ATG kodonų. sTag viruso genomas nekoduoja visai (**3.5 lentelė.**). N-galą praradęs LTag neturi jame koduojamo DnaJ motyvo, būtino viruso replikacijos ciklui. Visos šios RnorPyV1-DEL savybės leidžia daryti prielaidą, kad virusas yra defektyvus ir negali vykdyti savo replikacinio ciklo bei infekuoti ląstelių. Šis virusas greičiausiai yra ląstelėje įvykusio RnorPyV1 genomo persitvarkymo rezultatas.



### 3.8 pav. RnorPyV1, RnorPyV1-DEL ir RratPyV1 genomų schemas

RnorPyV1 geno seką paimta iš duomenų bazių (KR065723.1). RnorPyV1-DEL ir RratPyV1 genomų sekos nustatytos šio tyrimo metu.

RratPyV1 viruso pilno geno sekos yra 8 % (456 variabilios vietos) nutolusios nuo RnorPyV1, nukleotidų skirtumai tolygiai išsidėstę visame genome. NKRR tarp šių virusų skiriasi 10 nukleotidų, LTag koduojanti seka skiriasi 254 nt., baltymo seka – 34 ar., VP1 koduojanti seka skiriasi 107 nt., baltymo seka – 5 ar. Taip pat buvo išanalizuoti konservatyvių LTag motyvų – DnaJ, OBD ir ATFazės – sekų skirtumai tarp RnorPyV1 ir RratPyV1. Konservatyvių motyvų vietos RratPyV1 sekose buvo surastos naudojant NCBI konservatyvių motyvų aptikimo įrankį. DnaJ motyvas (koduojančios LTag sekos 76–189 nt., 26–63 ar.) turi 17 nt. pakaitų ir 1 ar. T→A (konservatyvią) pakaitą 36 LTag baltymo pozicijoje. OBD motyvas (811–1089 nt., 271–363 ar.) turi 24 nt. pakaitas ir A→S (konservatyvią) pakaitą 307 baltymo pozicijoje. ATFazės motyvas (1645–1758 nt., 549–586 ar.) turi 6 nt. pakaitas, o aminorūgščių pakaitų neturi. Didžiausiu variabilumu išsiskyrė 184–228 pozicijų LTag baltymo sekos fragmentas, jame buvo 12 ar. pakaitų ir 3 ar. iškrita,

šiam LTag sekos fragmente nėra jokių konservatyvių motyvų. Konservatyvūs DnaJ, OBD ir ATFazės motyvai apėmė tik 2 iš 34 LTag baltymo sekoje įvykusių aminorūgščių pakaitų.

### 3.5 lentelė. RnorPyV1, RnorPyV1-DEL ir RratPyV1 koduojami genomo elementai

RnorPyV1-DEL atveju VP2, LTag ir mTag geno ilgis – visas po iškritos likęs buvusios geno sekos ilgis; koduojančios sekos ilgis – koduojančios sekos ilgis, skaičiuojant nuo pirmo transliacijos pradžios kodono. Baltymo ilgis taip pat pateikiamas skaičiuojant nuo pirmo transliacijos pradžios kodono.

Elementas	Geno vieta genome	Geno ilgis, bp	Introno ilgis, bp	Koduojančios sekos ilgis, bp	Baltymo ilgis, ar.
<b>RnorPyV1 (KR065723.1)</b>					
<b>VP1</b>	1406..2560	1155	-	1155	385
<b>VP2</b>	397..1440	1044	-	1044	348
<b>VP3</b>	754..1440	687	-	687	229
<b>LTag</b>	2579..4678,5088..5318	2740	412	2328	776
<b>mTag</b>	4015..4678,4738..5318	1304	62	1242	414
<b>sTag</b>	4671..4678,4742..5318	648	66	582	194

<b>RnorPyV1-DEL</b>					
<b>VP1</b>	873..2024	1152	-	1152	384
<b>VP2</b>	5..904	900	-	900	300
<b>VP3</b>	221..904	684	-	684	228
<b>LTag</b>	2049..4114	2066	-	1503	501
<b>mTag</b>	3485..4048	564	-	474	158
<b>sTag</b>	-	-	-	-	-

<b>RratPyV1</b>					
<b>VP1</b>	1409..2563	1155	-	1155	385
<b>VP2</b>	400..1443	1044	-	1044	348
<b>VP3</b>	757..1443	687	-	687	229
<b>LTag</b>	2583..4674,5084..5314	2732	410	2322	774
	Splaisingo donorinė seka	AGGACATGAGgtaaggaggc			
	Splaisingo akceptorinė seka	tttgttacagGGTGTTAATC			
<b>mTag</b>	4023..4654,4738..5314	1292	82	1209	403
	Splaisingo donorinė seka	CCTGCAGTAGgtaagtatca			
	Splaisingo akceptorinė seka	cctctaccagCAGACAGCCT			
<b>sTag</b>	4667..4674,4738..5314	648	62	582	194
	Splaisingo donorinė seka	CCTGCAGTAGgtaagtatca			
	Splaisingo akceptorinė seka	tttgttacagGGTGTTAATC			

RratPyV1 ir RnorPyV1 LTag koduojanti DNR seka skiriasi mažiau nei 15 % (skirtumas – 11 %), todėl RratPyV1 neatitinka naujo PyV apibrėžimo kriterijaus. Panašu, kad *R. norvegicus* žiurkių poliomos virusas RnorPyV1 geba infekuoti ir *R. rattus* žiurkes, nors, kaip rodo šiame darbe pateikti duomenys, *R. rattus* žiurkėse dažnai vyksta šio viruso genomo

persitvarkymai. RratPyV1 buvo aptiktas vien tik *R. rattus* rūšies žiurkėse. Kadangi abu virusai, nors ir labai panašūs, bet infekuoja skirtingus šeimininkus, būtų galima nepaisyti 15 % LTag koduojančių sekų skirtumo kriterijaus ir laikyti RratPyV1 nauju *Rattus rattus* žiurkės infekuojančiu poliomos virusu.

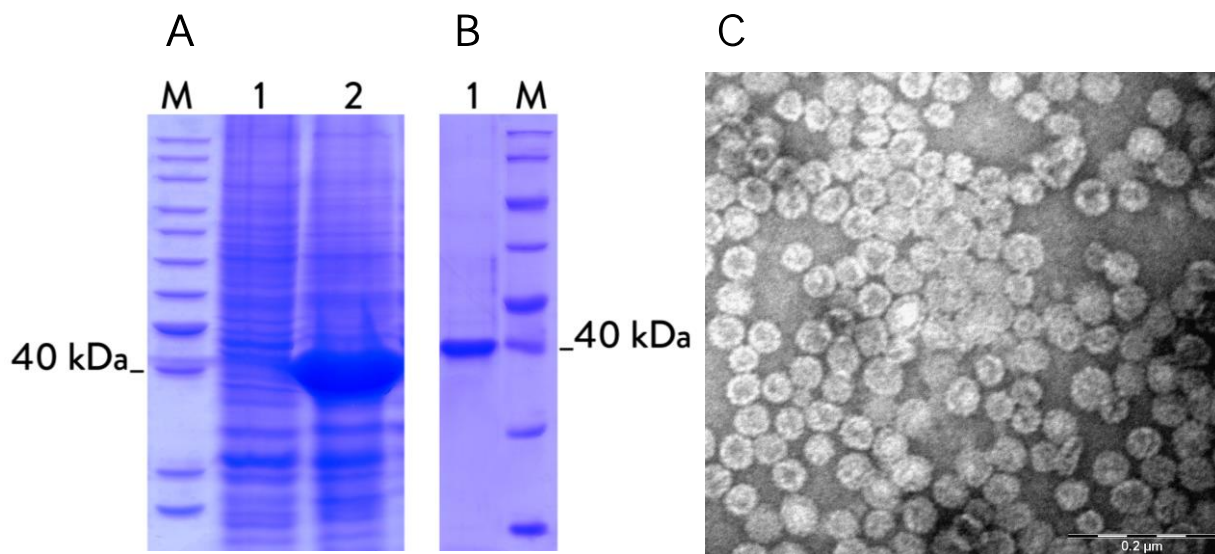
### 3.3 Žiurkių RnorPyV1 ir RatPyV2 VP1 sintezė mielėse ir VPD gryninimas

Šio darbo metu buvo siekiama susintetinti *R. norvegicus* žiurkių poliomos virusų 1 ir 2 į virusus panašias daleles mielėse, kurias vėliau būtų galima panaudoti šių virusų paplitimo imunofermentinei analizei žiurkių mėginiuose. RnorPyV1 ir RatPyV2 VP1 baltymų sintezei mielėse buvo naudoti anksčiau sukonstruoti pFX7 (žr. 2.1.9) mielių raiškos vektoriai pFX7-RnorPyV1-VP1 ir pFX7-RatPyV2-VP1, turintys abiejų virusų VP1 baltymus (Kurmauskaitė, 2018). Raiškos vektoriams konstruoti buvo panaudoti RnorPyV1 VP1 genas, padaugintas nuo 20 *Rattus norvegicus* žiurkės mėginio ir RatPyV2 VP1 genas, padaugintas nuo 9 *Rattus rattus* mėginio.

pFX7-RnorPyV1-VP1 ir pFX7-RatPyV2-VP1 raiškos vektoriai buvo transformuoti į mielių *Saccharomyces cerevisiae* AH22-214 ir AH22-214Δpep4 kamienų ląsteles (žr. 2.1.8). AH22-214Δpep4 yra dukterinis AH22-214 mielių kamienas, neturintis veikiančio proteinizės A geno. Transformuotos mielių ląstelės buvo auginamos mažame tūryje ir ardamos stiklo rutuliukais, ląstelių nuolaužos nusodinamos centrifuguojant, paimamas tirpios frakcijos mėginys ir likęs tirpios frakcijos tūris ultracentrifuguojamas per 30 % sacharozės sluoksnį. Po ultracentrifugavimo gauta nuosėda buvo ištirpinta ir analizuojama baltymų NDS-PAGE metodu (žr. 2.2.15, 2.2.16, 2.2.19).

RatPyV2 VP1 baltymo sintezė nebuvo nustatyta nei vieno mielių kamieno ląstelėse. RnorPyV1 VP1 baltymo sintezė tiek AH22-214, tiek AH22-214Δpep4 kamieno ląstelėse buvo itin efektyvi (3.9 pav., A). Kadangi AH22-214 mielių kamieno užaugusių ląstelių biomasės kiekis buvo didesnis, šis kamienas buvo pasirinktas didelio kiekio RnorPyV1 VP1 sintezei ir VPD gryninimui. Mielių ląstelės, vykdančios heterologinio VP1 baltymo sintezę, buvo ardamos stiklo rutuliukais, į virusus panašios dalelės gryninamos ultracentrifuguojant per du sacharozės ir du cezio chlorido gradientus (žr. 2.2.17, 2.2.18), tarpinius rezultatus analizuojant NDS-PAGE metodu. Po II ultracentrifugacijos per CsCl gradientą išgrynintas mėginys buvo analizuojamas elektroniniu mikroskopu (2.2.20). Galiausiai mėginys buvo dializuojamas (žr. 2.2.18).

RnorPyV1 VP1 baltymo išeiga buvo 0,389 mg iš 1 g šlapios mielių biomasės. Iš viso buvo išgryninti 32 mg baltymo (3.9 pav., B). RnorPyV1 VP1 baltymas formavo  $43 \pm 5,3$  nm dydžio į virusus panašias daleles (3.9 pav., C). Išgrynintas RnorPyV1 VP1 VPD planuojama panaudoti serologiniams žiurkių PyV paplitimo tyrimams.



### 3.9 pav. RnorPyV1 VP1 sintezės mielių ląstelėse ir VPD gryninimo rezultatai

**A** RnorPyV1 VP1 baltymo sintezės *Saccharomyces cerevisiae* AH22-214 kamieno ląstelėse analizės NDS-PAGE nuotrauka. Gelyje analizuotos ištirpintos nuosėdos po ultracentrifugavimo per 30 % sacharozės sluoksnį. M –molekulinės masės standartas Unstained Protein Ladder; 1 – AH22-214 kamieno ląstelių su pFX7 vektoriumi be įklonuoto heterologinio baltymo geno kontrolė; 2 – AH22-214 kamieno ląstelių su pFX7-RorPyV1-VP1 raiškos vektoriumi mėginys.

**B** Išgryninto po dializės RnorPyV1 VP1 baltymo SDS-PAGE nuotrauka. Baltymo kiekis takelyje – 1 μg. M – molekulinės masės standartas Unstained Broad Range Protein Ladder.

**C** RnorPyV1 VP1 baltymo formuojamų VPD po II ultracentrifugavimo per CsCl gradientą EM nuotrauka.



## 4 REZULTATŲ APTARIMAS

Ieškant naujų virusų ar atliekant virusų paplitimo tyrimus molekuliniiais metodais, labai svarbu tinkamai paruošti mėginius. Egzistuoja įvairūs mėginių praturtinimo virusinėmis nukleorūgštimis metodai, daugelis jų aptarti 1.3.2 skyriuje. Tiriant poliomos virusus, labai dažnai taikomas metodas – grandinės išstūmimo atsitiktinis padauginimas didelio procesyvumo polimerazėmis, pavyzdžiui, Phi29 bakteriofago polimeraze. Dėl padauginimo reakcijos savybių, mažos žiedinės molekulės yra padauginamos efektyviau nei ilgos linijinės, todėl Phi29 padauginimas plačiai taikomas PyV tyrimams (Johnė ir kt., 2009; Nainys ir kt., 2015; Parras-Moltó ir kt., 2018). Vis dėlto, mėginyje esanti šeimininko ar kita pašalinė DNR taip pat yra padauginama. Phi29 padauginto mėginio bendra DNR koncentracija tampa labai didelė ir neretai slopina PGR, todėl reikia mėginį skiesti, o praskiedus PyV DNR koncentracija vėl sumažėja. Taip pat dažniau gaunami ir nespecifiniai PGR produktai. Dėl šių priežasčių, prieš padauginimą Phi29 mėginiai dažnai paveikiami DNR egzozonukleazėmis, kurios pašalina linijines molekules, o žiedinius PyV genomus palieka sveikus (Schowalter ir kt., 2010; Nainys ir kt., 2015), jei mėginiai yra aukštos kokybės ir žiediniai virusų genomai nėra suirę. Jei žiedinėse PyV molekulėse įvykę DNR trūkiai, jos irgi bus suardytos egzozonukleazės. Sujungus Phi29 padauginimo ir veikimo egzozonukleazėmis metodus, palankiomis sąlygomis, galima gauti mėginius, kuriuose PyV DNR koncentracija labai aukšta, o pašalinės DNR – labai žema.

Šio darbo metu buvo norėta sukurti mėginių praturtinimo PyV DNR metodą, kuris apimtų Phi29 padauginimo ir veikimo egzozonukleazėmis privalumus, tačiau nepasizymėtų šių metodų trūkumais. Tam buvo sukurti PyV specifiniai heksanukleotidiniai pradmenys, kurie buvo naudojami vietoj įprastų atsitiktinių heksanukleotidinių pradmenų Phi29 padauginimo reakcijoje. Vis dėlto, gauti rezultatai neparodė tvirto PyV specifinių pradmenų pranašumo padauginant PyV DNR Phi29 polimeraze: nors kai kuriais atvejais nauji pradmenys ir veikė efektyviau, bet iš skirtingų organų išskirtų mėginių padauginimo rezultatai nesutapo, be to, pradmenys efektyviai daugino ir mitochondrijų DNR. Tokie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad arba pradmenys prie DNR jungiasi nespecifiškai, arba mitochondrijų DNR taip pat turi daug šių pradmenų prisijungimo vietų. Abu variantai yra tikėtini. Phi29 padauginimo reakcija vykdoma 30 °C temperatūroje ir jai naudojama itin didelė pradmenų koncentracija (25 kartus didesnė, nei įprastinės PGR atveju). Esant tokiai žemai temperatūrai ir dideliame pradmenų, bet mažam matricinės DNR kiekiui, pradmenys yra linkę jungtis nespecifiškai, be to, pradmenų ilgis – vos 6 nukleotidai, todėl jų specifiskumas yra žemas. Kuriant pradmenis, jie buvo atrinkti pagal didžiausią pasikartojimų skaičių visuose analizuotuose PyV genomuose tikintis, kad atrinktos sekos yra specifiskesnės PyV nei kitos kilmės

DNR. Nebuvo patikrinta, kaip dažnai atrinkti heksanukleotidai pasikartoja kitose DNR sekose. Tokį patikrinimą būtų galima atlikti ir sumaišant PyV genomų nukleotidus atsitiktine tvarka ir palyginant, ar dažniausiai pasikartojančios sekos nėra tos pačios kaip ir analizuojant tikrus PyV genomus. Kadangi tokia analizė nebuvo atlikta, gali būti, jog atrinkti pradmenys nėra specifiškesni poliomos virusams lyginant su specifiškumu kitos kilmės DNR.

Kaip minėta, Phi29 polimerazės optimali veikimo temperatūra yra 30 °C, todėl sintezei naudojant Phi29 sunku užtikrinti pradmenų specifinį prisijungimą. Siekiant patikrinti, ar aukštesnė temperatūra pradmenų specifinį prisijungimą gali pagerinti, buvo naudojama prieš keletą metų rinkoje pasirodžiusi patobulinta Phi29 versija – EquiPhi29 (Thermo Scientific™). EquiPhi29 buvo sukurta baltymų evoliucijos *in vitro* metu ir, pasak gamintojo, pasižymi didesniais termostabilumu (optimali veikimo temperatūra 42–45 °C), reakcijos greičiu ir produkto išeiga (2–2,5 karto daugiau produkto per tą patį laiką, reakcijos trukmė – 3 val.) bei mažesne padauginimo paklaida. Pasak gamintojo, žiedinę DNR (pUC19 plazmidinę DNR) EquiPhi29 geriausiai padaugina reakciją vykdant 42 °C 2 val., o dauginant 45 °C didžiausia išeiga pasiekama reakciją vykdant 3 val. Šio tyrimo metu gauti rezultatai parodė, kad PyV specifinių pradmenų mišinys blūžnies mėginiuose esant 45 °C reakcijos temperatūrai PyV DNR padaugino efektyviau nei atsitiktinių pradmenų mišinys, o 30 °C temperatūroje, priešingai, atsitiktiniai pradmenys veikė efektyviau. Vis dėlto, toks pats reakcijos temperatūros poveikis pastebėtas ir mitochondrinės DNR padauginimo efektyvumui, todėl negalima sakyti, kad aukštesnėje temperatūroje PyV specifiniai pradmenys specifiškiau jungiasi prie PyV DNR. Inkstų mėginiuose 45 °C temperatūroje EquiPhi29 PyV DNR nepadaugino visai. Kadangi DNR mėginys, naudotas padauginimui EquiPhi29 polimeraze abejomis sąlygomis, buvo vieno skyrimo, inkstų ir blūžnies mėginiai buvo dauginami EquiPhi29 vienu metu bei su tuo pačiu reakcijos mišiniu ir PGR reakcijos mišinys taip pat buvo naudotas tas pats tomis pačiomis sąlygomis, gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad DNR padauginimo efektyvumas mėginiuose labiausiai susijęs su pradiniu DNR kiekiu ir EquiPhi29 padauginimo reakcijos sąlygomis. Iš inkstų mėginių išskirtos DNR bendra koncentracija buvo mažesnė, nei išskirtos iš blūžnies mėginių, gali būti, kad 45 °C 3 val. reakcija yra netinkama padauginti itin mažą DNR kiekį. PGR su blūžnies mėginiais, EquiPhi29 polimeraze padaugintais 45 °C 3 val., taip pat parodė blogesnius rezultatus sintetinant tiek mt-Cytb, tiek RnorPyV1 dg DNR fragmentus, lyginant su 30 °C 24 val. padaugintais mėginiais. Gamintojų siūloma optimali EquiPhi29 veikimo temperatūra yra 42 °C, todėl tikėtina, kad 45 °C temperatūra nėra tinkamiausia PyV mėginių padauginimo reakcijai EquiPhi29 polimeraze.

Specifiškai padauginti PyV DNR Phi29 polimeraze bandė Rockett ir kolegės. Buvo sukurti BK, TS, 6, 7 ir STL poliomos virusams specifiniai pradmenys, kuriuos naudojant Phi29

padauginimui virusinė DNR mėginiuose buvo padauginta maždaug 200 kartų geriau nei reakcijai naudojant atsitiktinius heksamerus (Rockett ir kt., 2015). Rockett tyrimo metu naudoti pradmenys buvo specifiniai tik vienam poliomos virusui vienos reakcijos metu, jų ilgiai – 8–23 (ilgio vidurkis 14,4) nukleotidai. Toks autorių siūlomas metodas puikiai tinka specifinio PyV padauginimui ir paieškai, tačiau nėra tinkamas ieškant naujų PyV. Vis dėlto, ilgesnių nei heksanukleotidinių, pagal konservatyvias PyV sekas sukurtų pradmenų panaudojimas PyV padauginimui Phi29 arba EquiPhi29 gali būti daug žadanti tolimesnių tyrimų kryptis. Tolimesniuose tyrimuose DNR padauginimo efektyvumo įvertinimui taip pat būtų tikslinga naudoti tikro laiko PGR. Tuomet būtų galima kiekybiškai įvertinti skirtingais pradmenų mišiniais padauginamos DNR kiekį ir palyginti PyV ir pašalinės DNR padauginimo efektyvumą, taip pat palyginti Phi29 ir EquiPhi29 padauginamos PyV DNR kiekį. Šio tyrimo metu PyV ir mitochondrijų DNR padauginimo efektyvumo nebuvo galima lyginti tarpusavyje, *mt-Cytb* PGR padauginimui skirti pradmenys yra degeneruoti, pritaikyti įvairių smulkių graužikų citochromo b geno padauginimui, todėl nepadaugina DNR taip efektyviai, kaip padaugintų žiurkėms specifiniai pradmenys.

Šio darbo metu buvo patvirtinta, kad Phi29 padaugintuose mėginiuose poliomos virusų DNR surandama dažniau nei nepadaugintuose – paieškai naudojant padaugintus mėginius, poliomos virusų buvo rasta reikšmingai daugiau. Tiek Phi29, tiek EquiPhi29 polimeraze padauginti mėginiai turėjo didesnę PyV DNR kiekį nei nepadauginta DNR (naudojant nepadaugintus mėginius PyV DNR PGR metodu išvis nebuvo aptikta), todėl mėginių padauginimas Phi29 arba EquiPhi29 polimeraze yra svarbus mėginių paruošimo etapas efektyviai poliomos virusų paieškai.

Šio tyrimo metu buvo atlikta poliomos virusų paieška 189 *Microtus* spp. pelėnų, 34 *Apodemus* spp. pelių ir 50 *Rattus* spp. žiurkių mėginiuose. Pelėnai buvo pagauti Lietuvoje, Ispanijoje, Vokietijoje ir Čekijoje, visos pelės ir žiurkės buvo pagautos Lietuvoje. *Microtus arvalis* pelėnų mėginiuose buvo aptikta dviejų poliomos virusų DNR – anksčiau nustatyto CVPyV (MarPyV1) ir šio tyrimo metu pirmą kartą surasto MarPyV2. CVPyV DNR buvo aptikta tik viename mėginyje, nors paieška buvo atliekama naudojant keturias skirtingas CVPyV genomui specifinių pradmenų poras. Ankstesnių tyrimų metu nustatytas šio viruso paplitimas siekė 18 % tirtų Vokietijoje sugautų pelėnų mėginių (Nainys ir kt., 2015), tačiau tyrime buvo analizuoti tiek inkstų, tiek krūtinės ertmės skysčio pelėnų mėginiai, o paplitimas nustatytas dviem – PGR ir imunofermentinės analizės – metodais; tai galėjo lemti platesnę viruso paplitimo identifikaciją. Taip pat tyrime buvo tirti vien Vokietijoje sugauti pelėnai, o šio tyrimo metu vienintelė CVPyV irgi buvo aptikta 2010 m. Vokietijoje sugauto pelėno mėginyje. Šis pelėnas net buvo sugautas tame pačiame Šiaurės Vokietijos Mecklenburg-Vorpommern regione, kuriame buvo sugautas ir vienas iš CVPyV, kurio genomai buvo nustatytas ankstesniame tyrime, infekuotų pelėnų. Gali būti, kad Vokietijoje

šio PyV paplitimas 2010-2013 metais, kai buvo sugauti tirti pelėnai, buvo didesnis, nei vėlesniais metais ar kituose regionuose. Tai patvirtintų ir neseniai atliktas tyrimas su Vokietijoje pagautais pelėnais, kai CVPyV DNR nebuvo rasta nei viename iš 30 tirtų pelėnų (Ehlers ir kt., 2019). Akivaizdu, kad PyV paplitimas labai priklauso nuo tiriamos populiacijos.

MarPyV2 DNR buvo aptikta 14 mėginių: 4 pelėnų iš Ispanijos, 1 pelėno iš Šiaurės Vokietijos ir 9 pelėnų iš Pietų Vokietijos mėginiuose. Lietuvoje ir Čekijoje sugautuose pelėnuose šio PyV DNR nebuvo aptikta. Buvo nustatytos 7 iš šių mėginių išskirtų virusinių genomų pilnos sekos. Jų panašumas į *Mus musculus* PyV 2 siekia 73 %, į CVPyV – 62 %. Nors MarPyV2 ir CVPyV infekuoja tą patį šeimininką, *Microtus arvalis* pelėną, šie virusai yra labai nutolę. Tai nėra neįprasta poliomos virusams, pavyzdžiui, *Rattus norvegicus* PyV 1 ir 2 genomų sekos sutampa vos 49,13 % (Rigatti ir kt., 2016). MarPyV2 atitinka naujos PyV rūšies apibrėžimo kriterijus ir gali būti laikomas nauju poliomos virusu.

Nustatytų 7 MarPyV2 genomų sekos tarpusavyje skyrėsi iki 3 %. Tame pačiame regione sugautų pelėnų virusai skyrėsi mažiau, skirtinguose – daugiau. Atlikta filogenetinė analizė parodė, kad MarPyV2 variantų filogenetinis medis didžiąja dalimi atitinka šeimininkų, kuriuose jie buvo aptikti, filogenetinį medį. Virusų–šeimininko koevoliucijos analizė parodė, kad PyV koevoliucija su šeimininku ir genetinės informacijos praradimas yra svarbiausi PyV divergencijos tarp skirtingų populiacijų veiksniai (atsako už >80 % analizuotų MarPyV2 įvairovės), buvo nustatyti ir galimi šeimininko keitimo bei duplikacijos įvykiai, tačiau rezultatus reiktų patvirtinti padidinus tiriamųjų imtį. Panašūs rezultatai buvo gauti ir analizuojant įvairių rūšių šikšnosparnių ir jų PyV populiacijas – kodivergencijos ir genetinės informacijos praradimo įvykiai sudarė didžiąją dalį PyV ir šikšnosparnių kevoliuciją lėmusių įvykių (>70 %), bet buvo nustatyti ir nedažni šeimininko keitimo bei duplikacijų atvejai (Tan ir kt., 2020). Kofilogenetinių analizių, apimančių antžeminius stuburinius (Ehlers ir kt., 2019) bei hominidus (Madinda ir kt., 2016) ir jų poliomos virusus, rezultatai taip pat buvo panašūs. PyV–šeimininko kodivergencija literatūroje yra apibrėžiama kaip svarbiausias, tačiau ne vienintelis PyV evoliuciją aprašantis veiksnys – svarbų vaidmenį atlieka ir šeimininko keitimo, duplikacijų, genetinės informacijos praradimo ar įgijimo (linijų duplikacijos, rekombinacijos) įvykiai (Torres, 2020). *M. arvalis* PyV paieškas ketinama tęsti, įtraukiant mėginius iš daugiau regionų, kas leistų šių virusų evoliuciją patyrinti giliau.

AflaPyV1 buvo aptiktas vienoje *Apodemus flavicollis* pelėje iš 34 tirtų Lietuvoje sugautų *Apodemus* genties pelių, tačiau viruso pilno geno seka nebuvo padauginta. Ankstesnių tyrimų metu AflaPyV1 DNR buvo aptikta ~22 % mėginių, išskirtų iš pelių sugautų 2012, 2013 ir 2014 Vokietijoje (Nainys, 2015; Ehlers ir kt., 2019), o šiame darbe atlikto tyrimo metu buvo tirtos

Lietuvoje 2014–2016 metais sugautos pelės. Gali būti, kad Lietuvoje AflaPyV1 virusas mažiau paplitęs nei Vokietijoje arba PyV infekcijos nevienodu mastu išplitusios skirtingais metais. Kadangi šio viruso paplitimas Vokietijoje siekė ~22 %, o tirtų Lietuvoje sugautų pelių imtis buvo nedidelė – tik 16 *A. flavicollis* pelių, todėl gali būti, jog daugiau PyV užsikrėtusių individų tiesiog nepateko į tyrimą. Tirtose *Apodemus agrarius* pelėse poliomos virusų nebuvo rasta, jų nerado ir Ehlers su kolegomis, tirdami Vokietijoje sugautų *Apodemus agrarius* pelių širdies, inkstų, kepenų, plaučių, limfmazgių, blužnies mėginius (Ehlers ir kt., 2019).

Skirtingas CVPyV, MarPyV2 ir AflaPyV1 paplitimas įvairiose populiacijose gali būti paaiškintas tuo, kad dėl PyV gebėjimo lengvai plisti tarp individų per seiles, išmatas, šlapimą ar odą poliomos virusai greitai išplinta populiacijoje: didelė tikimybė, kad užsikrėtus bent vienam populiacijos individui, greitai užsikrės ir daugelis kitų tos populiacijos individų. Taip atsiranda labai aukšto PyV paplitimo populiacijos, kurios gali iškreipti bendrą statistiką ir lemti didelius skirtumus tarp tyrimų. Taip pat svarbu atkreipti dėmesį, kad PyV DNR buvimas rodo aktyvią infekciją, ar individas PyV buvo užsikrėtęs anksčiau geriau galėtų parodyti antikūnų tyrimas. Skirtingų organų mėginiuose aptinkamas PyV DNR kiekis taip pat gali smarkiai skirtis, nes skirtingi PyV infekuoja skirtingas ląsteles. Taip pat PyV DNR aptikimui gali būti svarbus ir metų laikas, kada graužikai buvo pagauti.

*Rattus rattus* ir *Rattus norvegicus* žiurkių mėginiuose atlikus PyV paiešką, *R. rattus* žiurkėse buvo aptiktos dviejų labai panašių į RnorPyV1 virusų sekos – RnorPyV1-DEL ir RratPyV1. Tai yra pirmos PyV genomų sekos, nustatytos iš *R. rattus* žiurkių mėginių. RnorPyV1-DEL geno seka su RnorPyV1 sutampa 99 %, tačiau turi 1226 bp ilgio iškritą. Nustatyta iškrita apima visą viruso mažąjį T antigeną, pusę viduriniojo T antigeno, LTag geno pradžią, visą NKK regioną bei VP2 geno pradžią. Panašios iškritos yra aprašytos Siriniuose žiurkėnuose (*Mesocricetus auratus*), sergančiuose limfoma (Mazur ir kt., 1994). 2013 m. sergančiuose žiurkėnuose buvo nustatytos HaPyV sekos, turinčios 308–692 bp iškritis, apimančias NKKR ir VP2 ar net VP3 genų pradžias (Muñoz ir kt., 2013). PyV geno NKKR ir gretimų sekų persitvarkymai siejami su žiurkėnų limfomos ir su žmonių PyV sukeltų patologijų, pavyzdžiui, BKPyV sukeltos nefropatijos ir JCPyV sukeltos PML, išsivystymu (McIlroy ir kt., 2019). Nėra duomenų, ar šio tyrimo metu tirtoms žiurkėms pasireiškė kokie nors patologiniai požymiai. Tikėtina, kad RnorPyV1-DEL įvykę sekų pokyčiai susiję su viruso bandymu prisitaikyti prie naujo šeimininko.

RratPyV1 ir RnorPyV1 genomų sekos sutampa tik 92 % procentais, tačiau jų genomų ilgiai panašūs, o sekų skirtumai išsidėstę po visą genomą – tai rodo palaipsniui vykusią sekų divergenciją. Labiausiai skiriasi virusų LTag koduojanti DNR seka, tačiau tik maždaug kas

dešimtas DNR sekos pokytis lėmė baltymo aminorūgšties pasikeitimą, o konservatyvūs LTag DnaJ, OBD ir ATFazės motyvai yra beveik nepasiekti. Kadangi virusas buvo rastas tik *Rattus rattus* mėginiuose, jį būtų galima laikyti nauju šių žiurkių poliomos virusu. Įdomu, kad RnorPyV1-DEL ir RratPyV2 sekos buvo aptiktos toje pačioje žiurkėje. Gali būti, kad *Rattus norvegicus* PyV 1 neseniai prisitaikė patekti į *Rattus rattus* žiurkių ląsteles, tačiau šiose ląstelėse negali efektyviai vykdyti infekcinio ciklo, todėl NKRR persitvarkymais bando prisitaikyti prie naujo šeimininko. RratPyV1 irgi greičiausiai yra kilęs iš RnorPyV1, kadaise pakeitusio šeimininką iš *R. norvegicus* į *R. rattus*, tačiau šis virusas cirkuliuoja *R. rattus* žiurkėse jau kurį laiką ir yra prisitaikęs prie naujo šeimininko per visą sekos ilgį, todėl neturi RnorPyV1-DEL būdingų iškritų.

Šio tyrimo metu buvo rastos dviejų graužikų rūšių naujų poliomos virusų sekos – *Microtus arvalis* PyV 2 ir *Rattus norvegicus* PyV 1. Iš ICTV patvirtintų 88 žinduolių PyV, 9 graužikų poliomos virusai sudaro tik 10 %, nors graužikai apima 40 % visos žinduolių įvairovės. Pridėjus šiuos du naujus, žinomų graužikus infekuojančių poliomos virusų skaičius išaugtų penktadaliu, o graužikų PyV reprezentacija tarp visų poliomos virusų padidėtų iki 12,5 %. Vis dėlto akivaizdu, kad trūksta dar daug informacijos apie graužikus infekuojančius poliomos virusus.

RnorPyV1 VP1 baltymo sintezė mielėse buvo efektyvi, VP1 baltymas mielėse formavo  $43 \pm 5,3$  nm dydžio į virusus panašias daleles. Šiame tyrime RnorPyV1 formuojamos VPD mielėse buvo susintetintos ir išgrynintos pirmą kartą. Anksčiau buvo parodyta, kad HaPyV, MPyV, BVPyV, CVPyV, žmonių, paukščių ir SV40 PyV VP1 sintezė mielėse taip pat vyksta efektyviai ir susintetinti baltymai formuoja 40–55 nm dydžio VPD (Sasnauskas ir kt., 1999; Sasnauskas ir kt., 2002; Nainys ir kt., 2015; Norkiene ir kt., 2015). RatPyV2 VP1 baltymo sintezė šio tyrimo metu mielėse nebuvo gauta. Šio viruso VP1 baltymo seka, iš virusų, kurių sintezės mielėse tyrimai buvo atlikti, artimiausia WUPyV. WUPyV tyrimų metu buvo pastebėta, kad šio viruso VP1 baltymo sintezė mielėse vyksta gan silpnai ir VPD gryninasi sunkiau lyginant su daugeliu kitų tirtų ŽPyV. Išanalizavus susiformavusių WUPyV VP1 VPD dydį EM, paaiškėjo, kad dalelės yra mažesnės nei įprastos – vos 25–35 nm dydžio (Norkienė, 2018). WUPyV VP1 baltymo N-galo nukreipimo į branduolį sekos buvo modifikuotos įvedant daugelio PyV VP1 baltymams konservatyvų MAPTKRK NLS motyvą. Modifikuoto WUPyV VP1 baltymo sintezės mielėse išauga ir formuojamų VPD dydis padidėjo (Vasiliūnaitė, 2017). Toks pats poveikis buvo pastebėtas ir konservatyvų NLS motyvą įjungus į APyV VP1 baltymą (Norkienė, 2018). RatPyV2 baltymas irgi neturi konservatyvios nukreipimo į branduolį sekos VP1 baltymo N-gale. Tolimesniuose tyrimuose būtų galima svarstyti NLS sekos įjungimą, siekiant pagerinti šio baltymo sintezę mielėse.

## IŠVADOS

1. PyV specifiniai heksanukleotidiniai pradmenys nepadaugino PyV DNR patikimai efektyviau ir patikimai nepadidino PyV DNR santykio su mitochondrijų DNR mėginiuose lyginant su atsitiktiniais heksanukleotidais, padauginimui naudojant Phi29 ir EquiPhi29 polimerazes.
2. *Microtus arvalis* pelėnuose buvo aptikti du PyV: viename pelėne buvo padaugintas DNR fragmentas, 99 % identiškas CVPyV (MarPyV1), o 14 pelėnų buvo surastas naujas poliomos virusas MarPyV2, kurio genomo sekos panašumas į MPtV siekė 73 %, o į CVPyV – 62 %. Nustatyta, kad šio viruso tarppopuliacinei įvairovei buvo svarbiausi koevoliucijos su šeimininku ir genetinės informacijos praradimo įvykiai.
3. Vienoje Lietuvoje sugautoje *Apodemus flavicollis* pelėje buvo rasta AflaPyV1 PyV DNR, o *Apodemus agrarius* pelių mėginiuose PyV aptikta nebuvo.
4. *Rattus rattus* žiurkėse buvo nustatytas naujas PyV RratPyV1, kurio genomo sekos panašumas į RnorPyV1 siekė 92 %, ir RnorPyV1 variantas, turintis 1226 bp iškritą, apimančią NKKR regioną ir gretimas sekas.
5. Iš mielių ląstelių buvo efektyviai išgrynintos RnorPyV1 VP1 baltymo formuojamos  $43 \pm 5,3$  nm dydžio į virusus panašios dalelės (išeiga 0,389 mg iš 1 g šlapios mielių biomasės), bet RatPyV2 VP1 baltymo sintezė mielių ląstelėse buvo neaptinkama.

# VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

EMILIJA VASILIŪNAITĖ

## **Poliomos virusų paieška, genomų sekų nustatymas ir analizė Europoje sugautų graužikų mėginiuose**

Genetikos magistro studijų baigiamasis darbas

### **SANTRAUKA**

Poliomos virusai (PyV) – ~5 kb dydžio dvigrandinės DNR virusai, infekuojantys žinduolius, paukščius bei žuvis. Pastaruoju metu plačiai tiriami PyV patogenezės ir evoliucijos aspektai. Graužikai – rūšių skaičiumi gausiausias žinduolių būrys – yra sąlyginai mažai ištirtas PyV atžvilgiu, todėl yra geras taikynys naujų poliomos virusų paieškai, be to, graužikai ir jų PyV yra tinkamas modelis PyV koevoliucijos su šeimininku analizei.

Šio tyrimo metu buvo sukurti PyV specifiniai heksanukleotidiniai pradmenys, skirti specifiskai padauginti PyV DNR grandinės išstūmimo padauginimo reakcijos būdu. Specifiniai pradmenys, lyginant su atsitiktiniais, nepadaugino PyV DNR patikimai efektyviau ir patikimai nepadidino PyV DNR/mitochondrijų DNR santykio mėginiuose padauginimui naudojant Phi29 ir EquiPhi29 polimerazes. Buvo atlikta poliomos virusų paieška *Microtus*, *Apodemus* ir *Rattus* genčių graužikų mėginiuose. Viename *Microtus arvalis* pelėne buvo nustatyta 99 % CVPyV (MarPyV1) identiška seka, o 14 pelėnų buvo rastas naujas poliomos virusas MarPyV2, kurio genomo sekos panašumas į MPtV siekė 73 %, o į CVPyV – 62 %. Kofilogenetinė analizė parodė, kad MarPyV2 tarppopuliacinei įvairovei buvo svarbiausi koevoliucijos su šeimininku ir genetinės informacijos praradimo įvykiai. Vienoje *Apodemus flavicollis* pelėje buvo aptikta AflaPyV1 DNR, o *Apodemus agrarius* pelėse PyV DNR nebuvo nustatyta. *Rattus rattus* žiurkėse buvo rastas naujas PyV, kurio genomo sekos panašumas į RnorPyV1 siekė 92 %, ir RnorPyV1 variantas, turintis 1226 bp iškritą, apimančią NKKR regioną ir gretimas sekas. Iš mielių ląstelių buvo efektyviai išgrynintos RnorPyV1 VP1 baltymo formuojamos  $43 \pm 5,3$  nm dydžio į virusus panašios dalelės (išėiga 0,389 mg iš 1 g šlapios mielių biomasės), o RatPyV2 VP1 baltymo sintezė mielių ląstelėse buvo neaptinkama.



VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

Institute of Biosciences

EMILIJA VASILIŪNAITĖ

**Search, identification and analysis of polyomavirus genome sequences in rodent samples from Europe**

Master thesis

**SUMMARY**

Polyomaviruses (PyVs) are ~ 5 kb double-stranded DNA viruses that infect mammals, birds, and fish. Recently, pathogenesis and evolution of PyVs are extensively studied. Rodents, the largest group of mammals, have been relatively little investigated for PyVs, making them a good target for searching for new polyomaviruses. Rodents and their PyVs are a suitable model for the analysis of PyV host-virus coevolution.

In this study, PyV-specific hexanucleotide primers were developed for the strand displacement amplification reaction. However, novel primers did not amplify PyV DNA significantly more efficiently and did not significantly increase the ratio of PyV DNA to mitochondrial DNA in samples compared to random primers using Phi29 and EquiPhi29 polymerases for amplification. The rodent samples of genera *Microtus*, *Apodemus*, and *Rattus* were examined for polyomaviruses. One *Microtus arvalis* vole had a PyV sequence, 99% identical to CVPyV. A new polyomavirus, MarPyV2, was identified in 14 *Microtus arvalis* voles and had a genomic sequence identity of 73% to MPtV and 62% to CVPyV. Co-evolution with the host and loss were the most important events for the inter-population diversity of this virus. AflaPyV1 DNA was detected in one *Apodemus flavicollis* mouse, and no PyV DNA was detected in *Apodemus agrarius* mice. In *Rattus rattus* rats, a new PyV with 92% genomic sequence identity to RnorPyV1 and a variant of RnorPyV1 with a 1226 bp deletion spanning the NCCR and adjacent sequences were identified. The synthesis of RnorPyV1 VP1 protein in yeast cells resulted in a yield of 0.389 mg per 1 g of wet yeast biomass, and the protein formed virus-like particles of  $43 \pm 5.3$  nm in size. RatPyV2 VP1 protein synthesis was not noticeable in yeast cells.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adams MJ, Hendrickson RC, Dempsey DM, Lefkowitz EJ. Tracking the changes in virus taxonomy. *Arch Virol.* 2015. 160(5):1375–1383. Šaltinis: 10.1007/s00705-015-2376-4
2. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Mushegian AR, Nibert ML, Sabanadzovic S, Sanfaçon H, Siddell SG, Simmonds P, Varsani A, Zerbini FM, Orton RJ, Smith DB, Gorbalenya AE, Davison AJ. 50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects. *Arch Virol.* 2017. 162(5):1441–6. Šaltinis: 10.1007/s00705-016-3215-y
3. Ali Suliman B. Comparison of five viral nucleic acid extraction kits for the efficient extraction of viral DNA and RNA from cell-free samples. *Trends Med.* 2019. 19(5). Šaltinis: 10.15761/tim.1000202
4. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MAA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. Identification of a Third Human Polyomavirus. *J Virol.* 2007. 81(8):4130–4136. Šaltinis: 10.1128/JVI.00028-07
5. Alternative Splice Site Predictor. [internetinė svetainė]. (ASSP). Sukurta: 2011; [atnaujinta: 2006; cituota: 2020-05-28] Adresas: <http://wangcomputing.com/assp/index.html>
6. Animal Diversity Web. [internetinė svetainė]. Armitage, D *Rattus norvegicus*. Sukurta: 2004; [atnaujinta: 2020; cituota: 2020-05-18] Adresas: <https://animaldiversity.org/>
7. Assetta B, Atwood WJ. The biology of JC polyomavirus. *Biol Chem.* 2017. 398(8):839–855. Šaltinis: 10.1515/hsz-2016-0345
8. Atkin SJL, Griffin BE, Dilworth SM. Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: History and perspectives. *Semin Cancer Biol.* 2009. 19(4):211–217. Šaltinis: 10.1016/j.semcancer.2009.03.001
9. Banér J, Nilsson M, Mendel-Hartvig M, Landegren UU. Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic Acids Res.* 1998. 26(22):5073–5078. Šaltinis: 10.1093/nar/26.22.5073
10. Banerji J, Rusconi S, Schaffner W. Expression of a  $\beta$ -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell.* 1981. 27(2 PART 1):299–308. Šaltinis: 10.1016/0092-8674(81)90413-X
11. Barouch DH, Harrison SC. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J Virol.* 1994. 68(6):3982–3989.
12. Becker M, Dominguez M, Greune L, Soria-Martinez L, Pflleiderer MM, Schowalter R, Buck CB, Blaum BS, Schmidt MA, Schelhaas M. Infectious Entry of Merkel Cell Polyomavirus. *J Virol.* 2019. 93(6). Šaltinis: 10.1128/jvi.02004-18
13. Berk AJ, Sharp PA. Spliced early mRNAs of simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978. 75(3):1274–1278. Šaltinis: 10.1073/pnas.75.3.1274
14. Bernier G, Morin M, Marsolais G. A Generalized Inclusion Body Disease in the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) Caused by a Papovavirus-Like Agent. *Avian Dis.* 1981. 25(4):1083–1092. Šaltinis: 10.2307/1590087
15. Bexfield N, Kellam P. Metagenomics and the molecular identification of novel viruses. *Vet J.* 2011. 190(2):191–198. Šaltinis: 10.1016/j.tvjl.2010.10.014
16. Bhattacharjee S, Chattaraj S. Entry, infection, replication, and egress of human polyomaviruses: an update. *Can J Microbiol.* 2017. 63:193–211. Šaltinis: [dx.doi.org/10.1139/cjm-2016-0519](https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0519)
17. Blackard JT, Davies SM, Laskin BL. BK polyomavirus diversity—Why viral variation matters. *Rev Med Virol.* 2020(e2102):1–10. Šaltinis: 10.1002/rmv.2102
18. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. [internetinė svetainė]. Sukurta: 2020; [atnaujinta: 1992; cituota: 2020-05-27] Adresas: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
19. Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Cocca N, Zaffaroni M, Riboni F, Monga G, Viscidi R. Serological evidence of vertical transmission of JC and BK polyomaviruses in

- humans. *J Gen Virol*. 2011. 92(Pt 5):1044–50. Šaltinis: 10.1099/vir.0.028571-0
20. Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Straif K, WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol*. 2012. 13(4):339–340. Šaltinis: 10.1016/S1470-2045(12)70125-0
  21. Brownlee C. Danna and Nathans: Restriction enzymes and the boon to modern molecular biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. 102(17):5909. Šaltinis: 10.1073/pnas.0502760102
  22. Brugge JS, Butel JS. Role of simian virus 40 gene A function in maintenance of transformation. *J Virol*. 1975. 15(3):619.
  23. Buck CB, Doorslaer K Van, Peretti A, Geoghegan EM, Tisza MJ, An P, Katz JP, Pipas JM, McBride AA, Camus AC, Mcdermott AJ, Dill JA, Delwart E, Ng TFF, Farkas K, Austin C, Kraberger S, Davison W, Pastrana D V, Varsani A. The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLOS Pathog*. 2016. 12(4)(e1005574). Šaltinis: 10.1371/journal.ppat.1005574
  24. Burke JM, Bass CR, Kincaid RP, Ulug ET, Sullivan CS. The Murine Polyomavirus MicroRNA Locus Is Required To Promote Viruria during the Acute Phase of Infection. *J Virol*. 2018. 92(16). Šaltinis: 10.1128/jvi.02131-17
  25. Calvignac-Spencer S, Feltkamp MCW, Daugherty MD, Moens U, Ramqvist T, Johne R, Ehlers B. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch Virol*. 2016. 161(6). Šaltinis: 10.1007/s00705-016-2794-y
  26. Carbone M, Rizzo P, Pass HI. Simian virus 40 , poliovaccines and human tumors : a review of recent developments. *Oncogene*. 1997. 15(June):1877–1888.
  27. Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc London*. 2001. 356:991–9. Šaltinis: 10.1098/rstb.2001.0889
  28. Conceição-Neto N, Zeller M, Lefrère H, De Bruyn P, Beller L, Deboutte W, Yinda CK, Lavigne R, Maes P, Van Ranst M, Heylen E, Matthijnsens J. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Sci Rep*. 2015. 5:16532. Šaltinis: 10.1038/srep16532
  29. Conow C, Fielder D, Ovadia Y, Libeskind-Hadas R. Jane: A new tool for the cophylogeny reconstruction problem. *Algorithms Mol Biol*. 2010. 5(1):16. Šaltinis: 10.1186/1748-7188-5-16
  30. Corrand L, Gelfi J, Albaric O, Etievant M, Pingret J-L, Guerin J-L. Pathological and epidemiological significance of Goose haemorrhagic polyomavirus infection in ducks. *Avian Pathol*. 2011. 40(4):355–360. Šaltinis: 10.1080/03079457.2011.582481
  31. Cutrone R, Lednicky J, Dunn G, Rizzo P, Bocchetta M, Chumakov K, Minor P, Carbone M. Some oral poliovirus vaccines were contaminated with infectious SV40 after 1961. *Cancer Res*. 2005. 65(22):10273–10279. Šaltinis: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2028
  32. Dang-Tan T, Mahmud SM, Puntoni R, Franco EL. Polio vaccines, Simian Virus 40, and human cancer: the epidemiologic evidence for a causal association. *Oncogene*. 2004. 23:6535–6540. Šaltinis: 10.1038/sj.onc.1207877
  33. Daniels R, Hebert DN. In Support of Simian Polyomavirus 40 VP4 as a Later Expressed Viroporin. 2020. 5(2). Šaltinis: 10.1128/mSphere.00187-20
  34. Danna K, Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971. 68(12):2913–2917. Šaltinis: 10.1073/pnas.68.12.2913
  35. Danna KJ, Nathans D. Bidirectional replication of Simian Virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972. 69(11):3097–3100. Šaltinis: 10.1073/pnas.69.11.3097
  36. Danna KJ, Sack GH, Nathans D. Studies of Simian virus 40 DNA. *J Mol Biol*. 1973. 78(2):363–376. Šaltinis: 10.1016/0022-2836(73)90122-8
  37. Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification.

- Genome Res.* 2001. 11(6):1095–9. Šaltinis: 10.1101/gr.180501
38. DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell.* 1988. 54(2):275–283. Šaltinis: 10.1016/0092-8674(88)90559-4
  39. Dehority WN, Eickman MM, Schwalm KC, Gross SM, Schroth GP, Young SA, Dinwiddie DL. Complete genome sequence of a KI polyomavirus isolated from an otherwise healthy child with severe lower respiratory tract infection. *J Med Virol.* 2016. 89(5):926–930. Šaltinis: 10.1002/jmv.24706
  40. DiMaio D. Small size, big impact: How studies of small DNA tumour viruses revolutionized biology. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2019. 374(1773). Šaltinis: 10.1098/rstb.2018.0300
  41. Doorslaer K Van, Kraberger S, Austin C, Farkas K, Bergeman M, Paunil E, Davison W, Varsani A. Fish polyomaviruses belong to two distinct evolutionary lineages. *J Gen Virol.* 2018. 99:567–73. Šaltinis: 10.1099/jgv.0.001041
  42. Eckhart W, Hutchinson MA, Hunter T. An Activity Phosphorylating Tyrosine in Polyoma T Antigen Immunoprecipitates. *Cell.* 1979. 18:925–933. Šaltinis: 10.1016/0092-8674(79)90205-8
  43. Eddy BE, Borman GS, Berkeley WH, Young RD. Tumors Induced in Hamsters by Injection of Rhesus Monkey Kidney Cell Extracts. *Exp Biol Med.* 1961. 107:191–197.
  44. Eddy BE, Borman GS, Grubbs GE, Young RD. Identification of the Oncogenic Substance in Rhesus Monkey Kidney Cell Cultures as Simian Virus 40. *Virology.* 1962. 17:65–75. Šaltinis: 10.1016/0042-6822(62)90082-X
  45. Ehlers B, Anoh AE, Salem N Ben, Broll S, Couacy-Hymann E, Fischer D, Gedvilaite A, Inghenütt N, Liebmann S, Martin M, Mossoun A, Mugisha L, Muyembe-Tamfum JJ, Pauly M, De Val BP, Preugschas H, Richter D, Schubert G, Szentiks CA, Teichmann T, Walter C, Ulrich RG, Wiersma L, Leendertz FH, Calvignac-Spencer S. Novel polyomaviruses in mammals from multiple orders and reassessment of polyomavirus evolution and taxonomy. *Viruses.* 2019. 11(930). Šaltinis: 10.3390/v11100930
  46. Fahsbender E, Altan E, Estrada M, Seguin MA, Young P, Leutenegger CM, Delwart E. Lyon-IARC Polyomavirus DNA in Feces of Diarrheic Cats. *Microbiol Resour Announc.* 2019. 8(29). Šaltinis: 10.1128/mra.00550-19
  47. Fanning E, Zhao K. SV40 DNA replication: From the A gene to a nanomachine. *Virology.* 2009. 384(2):352–359.
  48. Feng H, Kwun HJ, Liu X, Gjoerup O, Stolz DB, Chang Y, Moore PS. Cellular and Viral Factors Regulating Merkel Cell Polyomavirus Replication. *PLoS One.* 2011. 6(7). Šaltinis: 10.1371/journal.pone.0022468
  49. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science (80- ).* 2008. 319(5866):1096–1100. Šaltinis: 10.1126/science.1152586
  50. Fenner F. The Classification and Nomenclature of Viruses. *J Gen Virol.* 1976. 3(1):463–470.
  51. Gaboriaud P, Ferté M, Arnold F, Leblond V, Nicol J, Debare H, Le Meur M, Martini F, Tognon M, Touzé A. Age-specific seroprevalence of human polyomavirus 12 and Saint Louis and New Jersey polyomaviruses article. *Emerg Microbes Infect.* 2018. 7(1). Šaltinis: 10.1038/s41426-018-0026-0
  52. Gardner SD, Field AM, Coleman D V, New HB. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet Oncol.* 1971. 1(7712):1253–1257.
  53. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch G a, Sloots TP, Wang D. Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections. *PLoS Pathog.* 2007. 3(5):e64. Šaltinis: 10.1371/journal.ppat.0030064

54. Gedvilaite A, Tryland M, Ulrich RG, Schneider J, Kurmauskaite V, Moens U, Preugschas H, Calvignac-Spencer S, Ehlers B. Novel polyomaviruses in shrews (Soricidae) with close similarity to human polyomavirus 12. *J Gen Virol*. 2017. 624714:1–8. Šaltinis: 10.1099/jgv.0.000948
55. Geoghegan JL, Duchêne S, Holmes EC. Comparative analysis estimates the relative frequencies of co-divergence and cross-species transmission within viral families. Drosten C, sudarytojas. *PLoS Pathog*. 2017. 13(2):e1006215. Šaltinis: 10.1371/journal.ppat.1006215
56. Geoghegan JL, Holmes EC. Predicting virus emergence amid evolutionary noise. *Open Biol*. 2017. 7(170189). Šaltinis: 10.1098/rsob.170189
57. Gheit T, Dutta S, Oliver J, Robitaille A, Hampras S, Combes JD, McKay-Chopin S, Le Calvez-Kelm F, Fenske N, Cherpelis B, Giuliano AR, Franceschi S, McKay J, Rollison DE, Tommasino M. Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus. *Virology*. 2017. 506(March):45–54. Šaltinis: 10.1016/j.virol.2017.03.007
58. Griffith JD. Chromatin Structure : Deduced from a Minichromosome. *Science (80- )*. 1974. 187(22):1202–1203. Šaltinis: 10.1126/science.187.4182.1202
59. Gross L. A Filterable Agent, Recovered from Ak Leukemic Extracts, Causing Salivary Gland Carcinomas in C3H Mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953. 83(2):414–421. Šaltinis: 10.3181/00379727-83-20376
60. Gu R, Zhang Z, Decerbo JN, Gu RUI, Zhang ZUO, Carmichael GG. Gene regulation by sense – antisense overlap of polyadenylation signals. *RNA Soc*. 2009. 15:1154–1163. Šaltinis: 10.1261/rna.1608909.begins
61. Hall RJ, Wang J, Todd AK, Bissielo AB, Yen S, Strydom H, Moore NE, Ren X, Huang QS, Carter PE, Peacey M. Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *J Virol Methods*. 2014. 195:194–204. Šaltinis: 10.1016/j.jviromet.2013.08.035
62. Haque Hussain SS, Sterling JC. Polyomaviruses – be aware, be very aware. *Br J Dermatol*. 2019. 180(6):1284. Šaltinis: 10.1111/bjd.17909
63. Ho J, Jedrych JJ, Feng H, Natalie AA, Grandinetti L, Mirvish E, Crespo MM, Yadav D, Fasanella KE, Proksell S, Kuan S-FF, Pastrana D V., Buck CB, Shuda Y, Moore PS, Chang Y. Human polyomavirus 7-associated pruritic rash and viremia in transplant recipients. *J Infect Dis*. 2015. 211(10):1560–5. Šaltinis: 10.1093/infdis/jiu524
64. ICTV. [internetinė svetainė]. International Committee on Taxonomy of Viruses. Sukurta: 2015; [atnaujinta: 2020-02; cituota: 2020-04-17] Adresas: talk.ictvonline.org
65. Inoue T, Tsai B. How viruses use the endoplasmic reticulum for entry, replication, and assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013. 5(1). Šaltinis: 10.1101/cshperspect.a013250
66. Ishizu K-I, Watanabe H, Han S-I, Kanesashi S-N, Hoque M, Yajima H, Kataoka K, Handa H. Roles of Disulfide Linkage and Calcium Ion-Mediated Interactions in Assembly and Disassembly of Virus-Like Particles Composed of Simian Virus 40 VP1 Capsid Protein. *J Virol*. 2001. 75(1):61–72. Šaltinis: 10.1128/JVI.75.1.61–72.2001
67. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972. 69(10):2904–2909. Šaltinis: 10.1073/pnas.69.10.2904
68. Javier RT, Butel JS. The history of tumor virology. *Cancer Res*. 2008. 68(19):7693–7706.
69. Jensen F, Koprowski H, Pagano JS, Ponten J, Ravdin RG. Autologous and Homologous Implantation of Human Cells Transformed In Vitro by Simian Virus 40. *J Natl Cancer Inst*. 1963. 32:917–937.
70. Jeske K, Hiltbrunner M, Drewes S, Ryll R, Wenk M, Špakova A, Petraitytė-Burneikienė R, Heckel G, Ulrich RG. Field vole-associated Traemmersee hantavirus from Germany represents a novel hantavirus species. *Virus Genes*. 2019. 55(6):848–853. Šaltinis: 10.1007/s11262-019-01706-7

71. Johannessen M, Walquist M, Gerits N, Dragset M, Spang A, Moens U. BKV Agnoprotein Interacts with a-Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Fusion Attachment Protein, and Negatively Influences Transport of VSVG-EGFP. *PLoS One*. 2011. 6(9). Šaltinis: 10.1371/journal.pone.0024489
72. Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, Major EO, Ramqvist T, Norkin LC. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol*. 2011. 156(9):1627–1634. Šaltinis: 10.1007/s00705-011-1008-x
73. Johne R, Enderlein D, Nieper H, Muller H. Novel Polyomavirus Detected in the Feces of a Chimpanzee by Nested Broad-Spectrum PCR. *J Virol*. 2005. 79(6):3883–3887. Šaltinis: 10.1128/JVI.79.6.3883-3887.2005
74. Johne R, Müller H. Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family. *J Virol*. 2007. 81(21):11554–9. Šaltinis: 10.1128/JVI.01178-07
75. Johne R, Müller H, Rector A, van Ranst M, Stevens H. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol*. 2009. 17(5):205–211. Šaltinis: 10.1016/j.tim.2009.02.004
76. Kaján GL, Doszpoly A, Tarján ZL, Vidovszky MZ, Papp T. Virus–Host Coevolution with a Focus on Animal and Human DNA Viruses. *J Mol Evol*. 2020. 88(1):41–56.
77. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*. 1984. 39(3):499–509. Šaltinis: 10.1016/0092-8674(84)90457-4
78. Kamminga S, van der Meijden E, de Brouwer C, Feltkamp M, Zaaijer H. Prevalence of DNA of fourteen human polyomaviruses determined in blood donors. *Transfusion*. 2019. 59(12):3689–3697. Šaltinis: 10.1111/trf.15557
79. Kamminga S, Van Der Meijden E, Feltkamp MCW, Zaaijer HL. Seroprevalence of fourteen human polyomaviruses determined in blood donors. *PLoS One*. 2018. 13(10):1–11. Šaltinis: 10.1371/journal.pone.0206273
80. Kartenbeck J, Stukenbrok H, Helenius A. Endocytosis of Simian Virus 40 into the Endoplasmic Reticulum. *J Cell Biol*. 1989. 109(6):2721–2729.
81. Kazlauskas D, Varsani A, Koonin E V., Krupovic M. Multiple origins of prokaryotic and eukaryotic single-stranded DNA viruses from bacterial and archaeal plasmids. *Nat Commun*. 2019. 10(1):3425. Šaltinis: 10.1038/s41467-019-11433-0
82. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog*. 2009. 5(3). Šaltinis: 10.1371/journal.ppat.1000363
83. Kelly TJ, Smith HO. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. II. Base sequence of the recognition site. *J Mol Biol*. 1970. 51(2):393–409. Šaltinis: 10.1016/0022-2836(70)90150-6
84. Kilham L, Murphy HW. A Pneumotropic Virus Isolated from C3H Mice Carrying the Bittner Milk Agent. *Exp Biol Med*. 1953. 82. Šaltinis: <https://doi.org/10.3181/00379727-82-20044>
85. Kirschstein RL, Gerber P. Ependymomas produced after intracerebral inoculation of SV40 into new-born hamsters. *Nature*. 1962. 195(4838):299–300. Šaltinis: 10.1038/195299b0
86. Kiselev D, Matsvay A, Abramov I, Dedkov V, Shipulin G, Khafizov K. Current trends in diagnostics of viral infections of unknown etiology. *Viruses*. 2020. 12(2).
87. Koonin E V., Dolja V V., Krupovic M. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology*. 2015. 479–480:2–25. Šaltinis: 10.1016/J.VIROL.2015.02.039
88. Koprowski H, Ponten J. Transformation of cultures of human tissue infected with simian virus SV40. *J Cell Comp Physiol*. 1962.
89. Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, Trusch F, Hofmann J, Moens U, Sauer I, Voigt S, Schmuck R, Ehlers B. Identification of a Novel Human Polyomavirus in Organs of the Gastrointestinal Tract. Qiu J, sudarytojas. *PLoS One*. 2013. 8(3):e58021. Šaltinis: 10.1371/journal.pone.0058021

90. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018. 35(6):1547–1549. Šaltinis: 10.1093/molbev/msy096
91. Kurmauskaitė V. Poliomos virusų paieška Lietuvoje ir Čekijoje sugautų laukinių žiurkių audinių mėginiuose. [Magistro baigiamasis darbas] Vilnius: Vilniaus Universitetas; 2018.
92. Lagatie O, Tritsmans L, Stuyver LJ. The miRNA world of polyomaviruses. *Viro J.* 2013. 10:268.
93. Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 2018. 46(D1):D708–D717. Šaltinis: 10.1093/nar/gkx932
94. Lewandowska DW, Zagordi O, Geissberger F-D, Kufner V, Schmutz S, Böni J, Metzner KJ, Trkola A, Huber M. Optimization and validation of sample preparation for metagenomic sequencing of viruses in clinical samples. 2017. 5(1):94. Šaltinis: 10.1186/s40168-017-0317-z
95. Li JJ, Kelly TJ. Simian virus 40 DNA replication in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984. 81(22 I):6973–6977. Šaltinis: 10.1073/pnas.81.22.6973
96. Liimatainen H, Weseslindtner L, Strassl R, Aberle SW, Bond G, Auvinen E. Next-generation sequencing shows marked rearrangements of BK polyomavirus that favor but are not required for polyomavirus-associated nephropathy. *J Clin Virol.* 2020. 122(August 2019):104215. Šaltinis: 10.1016/j.jcv.2019.104215
97. Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, Stine OC, Skelton R, Brennan DC, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JI, Wang D. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology.* 2013. 436(2):295–303. Šaltinis: 10.1016/j.virol.2012.12.005
98. Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell.* 1979. 17(1):43–52. Šaltinis: 10.1016/0092-8674(79)90293-9
99. Liu SY, He K, Chen S De, Jin W, Murphy RW, Tang MK, Liao R, Li FJ. How many species of Apodemus and Rattus occur in China? A survey based on mitochondrial cyt b and morphological analyses. *Zool Res.* 2018. 39(5):309–320. Šaltinis: 10.24272/j.issn.2095-8137.2018.053
100. López-Bueno A, Mavian C, Labella AM, Castro D, Borrego JJ, Alcamí A, Alejo A. Concurrence of Iridovirus, Polyomavirus, and a Unique Member of a New Group of Fish Papillomaviruses in Lymphocystis Disease-Affected Gilthead Sea Bream. *J Virol.* 2016. 90:8768–8779. Šaltinis: 10.1128/JVI.01369-16
101. Madinda NF, Ehlers B, Wertheim JO, Akoua-Koffi C, Bergl RA, Boesch C, Akonkwa DBM, Eckardt W, Fruth B, Gillespie TR, Gray M, Hohmann G, Karhemere S, Kujirakwinja D, Langergraber K, Muyembe J-J, Nishuli R, Pauly M, Petrzalkova KJ, Robbins MM, Todd A, Schubert G, Stoinski TS, Wittig RM, Zuberbühler K, Peeters M, Leendertz FH, Calvignac-Spencer S. Assessing Host-Virus Codivergence for Close Relatives of Merkel Cell Polyomavirus Infecting African Great Apes. *J Virol.* 2016. 90(19):8531–8541. Šaltinis: 10.1128/jvi.00247-16
102. Maia FGM, de Souza WM, Sabino-Santos G, Fumagalli MJ, Modha S, Murcia PR, Figueiredo LTM. A novel polyomavirus in sigmodontine rodents from São Paulo State, Brazil. *Arch Virol.* 2018. 163(10):2913–2915. Šaltinis: 10.1007/s00705-018-3913-8
103. Matthews MR, Wang RC, Reddick RL, Saldivar VA, Browning JC. Viral-associated trichodysplasia spinulosa: A case with electron microscopic and molecular detection of the trichodysplasia spinulosa-associated human polyomavirus. *J Cutan Pathol.* 2011. 38(5):420–431. Šaltinis: 10.1111/j.1600-0560.2010.01664.x
104. Mazur S, Goodhardt M, Feunteun J, de La Roche Saint André C. In vivo replication of the hamster polyomavirus genome and generation of specific deletions in the process of

- lymphomagenesis. *J Virol.* 1994. 68(9):5629–37.
105. Mazzoni E, Guerra G, Casali MV, Pietrobon S, Bononi I, Puozzo A, Tagliapietra A, Nocini PF, Tognon M, Martini F. Antibodies Against Mimotopes of Simian Virus 40 Large T Antigen, the Oncoprotein, in Serum Samples From Elderly Healthy Subjects. *J Cell Physiol.* 2017. 232(1):176–181. Šaltinis: 10.1002/jcp.25405
  106. McGrath S, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. The impact of bacteriophage genomics. *Curr Opin Biotechnol.* 2004. 15(2):94–99. Šaltinis: 10.1016/j.copbio.2004.01.007
  107. McIlroy D, Halary F, Bressollette-Bodin C. Intra-patient viral evolution in polyomavirus-related diseases. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2019. 374(1773).
  108. van der Meijden E, Feltkamp M. The Human Polyomavirus Middle and Alternative T-Antigens; Thoughts on Roles and Relevance to Cancer. *Front Microbiol.* 2018. 9:398. Šaltinis: 10.3389/fmicb.2018.00398
  109. van der Meijden E, Janssens RWA, Lauber C, Bavinck JNB, Gorbalenya AE, Feltkamp MCW. Discovery of a new human polyomavirus associated with Trichodysplasia Spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog.* 2010. 6(7):1–10. Šaltinis: 10.1371/journal.ppat.1001024
  110. Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2010. 79(1):803–833. Šaltinis: 10.1155/2013/469538
  111. Mishra N, Pereira M, Rhodes RH, An P, Pipas JM, Jain K, Kapoor A, Briese T, Faust PL, Lipkin WI. Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy. *J Infect Dis.* 2014. 210(10):1595–9. Šaltinis: 10.1093/infdis/jiu250
  112. Moens U, Calvignac-Spencer S, Lauber C, Ramqvist T, Feltkamp MCW, Daugherty MD, Verschoor EJ, Ehlers B, ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *J Gen Virol.* 2017. 98:1159–60. Šaltinis: 10.1099/jgv.0.000839
  113. Moens U, Krumbholz A, Ehlers B, Zell R, Johne R, Calvignac-Spencer S, Lauber C. Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infect Genet Evol.* 2017. 54:18–38. Šaltinis: 10.1016/j.meegid.2017.06.011
  114. Muñoz LJ, Ludeña D, Gedvilaite A, Zvirbliene A, Jandrig B, Voronkova T, Ulrich RG, López DE. Lymphoma outbreak in a GASH:Sal hamster colony. *Arch Virol.* 2013. 158(11):2255–2265. Šaltinis: 10.1007/s00705-013-1737-0
  115. Nainys J. Laukinių graužikų naujų poliomos virusų paieška ir jų apibūdinimas. [Magistro baigiamasis darbas] Vilnius: Vilniaus Universitetas; 2015.
  116. Nainys J, Timinskas A, Schneider J, Ulrich RG, Gedvilaite A. Identification of Two Novel Members of the Tentative Genus Wukipolyomavirus in Wild Rodents. *PLoS One.* 2015. 10(10):e0140916. Šaltinis: 10.1371/journal.pone.0140916
  117. Neumann F, Borchert S, Schmidt C, Reimer R, Hohenberg H, Fischer N, Grundhoff A. Replication, Gene Expression and Particle Production by a Consensus Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) Genome. *Consens Merkel Cell Polyomavirus Genome PLoS ONE.* 2011. 6(12). Šaltinis: 10.1371/journal.pone.0029112
  118. Nguyen KD, Lee EE, Yue Y, Stork J, Pock L, North JP, Vandergriff T, Cockerell C, Hosler GA, Pastrana D V., Buck CB, Wang RC. Human polyomavirus 6 and 7 are associated with pruritic and dyskeratotic dermatoses. *J Am Acad Dermatol.* 2016. Šaltinis: 10.1016/j.jaad.2016.11.035
  119. Nieva JL, Madan V, Carrasco L. Viroporins: Structure and biological functions. *Nat Rev Microbiol.* 2012. 10(8):563–574. Šaltinis: 10.1038/nrmicro2820
  120. Norkienė M. Poliomos virusų VP1 baltymų biosintezės ypatybių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse tyrimas bei panaudojimas serologiniams tyrimams. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2018.
  121. Norkiene M, Stonyte J, Ziogiene D, Mazeike E, Sasnauskas K, Gedvilaite A. Production of recombinant VP1-derived virus-like particles from novel human polyomaviruses in yeast. *BMC Biotechnol.* 2015. 15(58):68. Šaltinis: 10.1186/s12896-015-0187-z



122. Olival KJ, Hosseini PR, Zambrana-Torrel C, Ross N, Bogich TL, Daszak P. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*. 2017. 546(7660):646–50. Šaltinis: 10.1038/nature22975
123. Orba Y, Kobayashi S, Nakamura I, Ishii A, Hang 'ombe BM, Mweene AS, Thomas Y, Kimura T, Sawa H. Detection and characterization of a novel polyomavirus in wild rodents. *J Gen Virol*. 2011. 92:789–95. Šaltinis: 10.1099/vir.0.027854-0
124. Padgett BL, Walker DL, Zurhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifunctional leucoencephalopathy. *Lancet Oncol*. 1971. 1(7712):1257–1260.
125. Parras-Moltó M, Rodríguez-Galet A, Suárez-Rodríguez P, López-Bueno A. Evaluation of bias induced by viral enrichment and random amplification protocols in metagenomic surveys of saliva DNA viruses. 2018. 6(1). Šaltinis: 10.1186/s40168-018-0507-3
126. Peretti A, Fitzgerald PC, Bliskovsky V, Pastrana D V, Buck CB. Genome Sequence of a Fish-Associated Polyomavirus, Black Sea Bass (*Centropristis striata*) Polyomavirus 1. *Genome Announc*. 2015. 3(1). Šaltinis: 10.1128/genomeA.01476-14
127. Pietropaolo V, Prezioso C, Bagnato F, Antonelli G. John Cunningham virus: an overview on biology and disease of the etiological agent of the progressive multifocal leucoencephalopathy. *New Microbiol*. 2018. 41(3):179–186.
128. Plyusnin A, Vaheri A, Lundkvist Å. Saaremaa hantavirus should not be confused with its dangerous relative, Dobrava virus [10]. *J Clin Microbiol*. 2006. 44(4):1608–1609. Šaltinis: 10.1128/JCM.44.4.1608-1611.2006
129. Ponten J, Jensen F, Koprowski H. Morphological and virological investigation of human tissue cultures transformed with SV40. *J Cell Comp Physiol*. 1963. 61:145–163. Šaltinis: 10.1002/jcp.1030610206
130. Popov VL, Tesh RB, Weaver SC, Vasilakis N. Electron microscopy in discovery of novel and emerging viruses from the collection of the world reference center for emerging viruses and arboviruses (WRCEVA). *Viruses*. 2019. 11(5).
131. Prado JCM, Monezi TA, Amorim AT, Lino V, Paladino A, Boccardo E. Human polyomaviruses and cancer: an overview. *Clinics*. 2018. 73(Suppl 1).
132. Rassoulzadegan M, Cowie A, Carr A, Glaichenhaus N, Kamen R, Cuzin F. The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature*. 1982. 300(9):713–718. Šaltinis: 10.1017/CBO9781107415324.004
133. Rayment I, Baker TS, Caspar DL, Murakami WT. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature*. 1982. 295(5845):110–5.
134. Reddy VB, Thimmappaya B, Dhar R, Subramanian KN, Zain BS, Pan J, Ghosh PK, Celma ML, Weissman SM. The genome of simian virus 40. *Science (80- )*. 1978. 200(4341):494–502. Šaltinis: 10.1126/science.205947
135. Rigatti LH, Toptan T, Newsome JT, Moore PS, Chang Y. Identification and Characterization of Novel Rat Polyomavirus 2 in a Colony of X-SCID Rats by P-PIT assay. 2016. 1(6):e00334-16. Šaltinis: 10.1128/mSphere.00334-16
136. Rinaldo CH, Hirsch HH. The human polyomaviruses: From orphans and mutants to patchwork family. 2013. 121(8):681–684. Šaltinis: 10.1111/apm.12125
137. Rockett R, Barraclough KA, Isbel NM, Dudley KJ, Nissen MD, Sloots TP, Bialasiewicz S. Specific rolling circle amplification of low-copy human polyomaviruses BKV, HPyV6, HPyV7, TSPyV, and STLPyV. *J Virol Methods*. 2015. 215–216:17–21. Šaltinis: 10.1016/j.jviromet.2015.02.004
138. Rodríguez-Pastor R, Escudero R, Lambin X, Vidal MD, Gil H, Jado I, Rodríguez-Vargas M, Luque-Larena JJ, Mougeot F. Zoonotic pathogens in fluctuating common vole (*Microtus arvalis*) populations: Occurrence and dynamics. *Parasitology*. 2019. 146(3):389–398. Šaltinis: 10.1017/S0031182018001543
139. Roldão A, Silva AC, Mellado MCM, Alves PM, Carrondo MJT. Viruses and virus-like particles in biotechnology: Fundamentals and applications. *Comprehensive Biotechnology*.

- Elsevier. p. 633–656.
140. Rotondo JC, Mazzoni E, Bononi I, Tognon M, Martini F. Association Between Simian Virus 40 and Human Tumors. *Front Oncol.* 2019. 9.
  141. Rzhetsky A, Nei M. A Simple Method for Estimating and Testing Minimum-Evolution Trees. *Mol Biol Evol.* 1992. 9(5):945–967. Šaltinis: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040771
  142. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987. 4(4):406–25. Šaltinis: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
  143. Salas EN, Kotschwar JL. Pathology in practice. *J Am Vet Med Assoc.* 2014. 245(3):291–293. Šaltinis: 10.2460/javma.245.3.291
  144. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes JC, Hutchison III CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage φX174 DNA. *Nature.* 1977. 265:687–695. Šaltinis: doi.org/10.1038/265687a0
  145. Sariyer IK, Saribas AS, White MK, Safak M. Infection by agnoprotein-negative mutants of polyomavirus JC and SV40 results in the release of virions that are mostly deficient in DNA content. *Virol J.* 2011. 8(255). Šaltinis: 10.1186/1743-422X-8-255
  146. Sasnauskas K, Bulavaite A, Hale A, Jin L, Knowles WA, Gedvilaite A, Dargevičiute A, Bartkevičiute D, Žvirbliene A, Staniulis J, Brown DWG, Ulrich R. Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Intervirolgy.* Vol. 45. p. 308–317.
  147. Sasnauskas K, Buzaitė O, Vogel F, Jandrig B, Razanskas R, Staniulis J, Scherneck S, Krüger DH, Ulrich R. Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biol Chem.* 1999. 380(3):381–6. Šaltinis: 10.1515/BC.1999.050
  148. Scherneck S, Ulrich R, Feunteun J. The hamster polyomavirus--a brief review of recent knowledge. *Virus Genes.* 2001. 22(1):93–101.
  149. Schlegel M, Ali HS, Stieger N, Groschup MH, Wolf R, Ulrich RG. Molecular identification of small mammal species using novel cytochrome b gene-derived degenerated primers. *Biochem Genet.* 2012. 50(5–6):440–447. Šaltinis: 10.1007/s10528-011-9487-8
  150. Schowalter RM, Pastrana D V., Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel Cell Polyomavirus and Two Novel Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin. *Cell Host Microbe.* 2010. 7(6):509–515. Šaltinis: 10.1016/j.chom.2010.05.006
  151. Schulze V, Lurz PWW, Ferrari N, Romeo C, Steele MA, Marino S, Mazzamuto MV, Calvignac-Spencer S, Schlottau K, Beer M, Ulrich RG, Ehlers B. Search for polyoma-, herpes-, and bornaviruses in squirrels of the family Sciuridae. *Virol J.* 2020. 17(1):42. Šaltinis: 10.1186/s12985-020-01310-4
  152. Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, Hengel H, Ehlers B. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol.* 2011. 85(9):4586–90. Šaltinis: 10.1128/JVI.02602-10
  153. Shah K, Nathanson N. Human Exposure To Sv40: Review and Comment. *Am J Epidemiol.* 1976. 103(1):1–12. Šaltinis: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112197
  154. Shein HM, Enders JF. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962. 48(1961):1164–1172.
  155. Sheu JC, Tran J, Rady PL, Dao H, Tying SK, Nguyen HP. Polyomaviruses of the skin: integrating molecular and clinical advances in an emerging class of viruses. *Br J Dermatol.* 2019. 180(6):1302–1311. Šaltinis: 10.1111/bjd.17592
  156. Sibold C, Ulrich R, Labuda M, Lundkvist A, Martens H, Schütt M, Gerke P, Leitmeyer K, Meisel H, Krüger DH. Dobrava hantavirus causes hemorrhagic fever with renal syndrome in central Europe and is carried by two different Apodemus mice species. *J Med Virol.* 2001. 63(2):158–67.
  157. Siddell SG, Walker PJ, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Dutilh BE, Harrach B, Harrison RL,

- Junglen S, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Nibert ML, Rubino L, Sabanadzovic S, Simmonds P, Varsani A, Zerbini FM, Davison AJ. Binomial nomenclature for virus species: a consultation. *Arch Virol*. 2020. 165(2):519–525. Šaltinis: 10.1007/s00705-019-04477-6
158. Siebrasse EA, Nguyen NL, Willby MJ, Erdman DD, Menegus MA, Wang D. Multiorgan WU Polyomavirus Infection in Bone Marrow Transplant Recipient. *Emerg Infect Dis*. 2016. 22(1):24–31. Šaltinis: 10.3201/eid2201.151384
159. Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JI, Wang D. Identification of MW Polyomavirus, a Novel Polyomavirus in Human Stool. *J Virol*. 2012. 86(19):10321–10326. Šaltinis: 10.1128/JVI.01210-12
160. da Silva MS, Cibulski SP, Alves CDBT, Weber MN, Budaszewski RF, Silveira S, Mósena ACS, Mayer FQ, Goltz L V., Campos R, Canal CW. New polyomavirus species identified in nutria, *Myocastor coypus polyomavirus 1*. *Arch Virol*. 2018. 163(11):3203–3206. Šaltinis: 10.1007/s00705-018-3985-5
161. Simmonds P, Aiewsakun P. Virus classification – where do you draw the line? *Arch Virol*. 2018. 163(8):2037–2046. Šaltinis: 10.1007/s00705-018-3938-z
162. Sowd GA, Fanning E. A Wolf in Sheep’s Clothing: SV40 Co-opts Host Genome Maintenance Proteins to Replicate Viral DNA. *PLoS Pathog*. 2012. 8(11). Šaltinis: 10.1371/journal.ppat.1002994
163. Stehle T, Harrison SCSC. Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. 1996. 15(4):183–194. Šaltinis: 10.2210/PDB1SID/PDB
164. Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathog*. 2010. 6(3):e1000801. Šaltinis: 10.1371/journal.ppat.1000801
165. Sweet BH, Hilleman MR. The Vacuolating Virus, S.V.40. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1960. 105(2):420–427. Šaltinis: 10.3181/00379727-105-26128
166. Tan Z, Gonzalez G, Sheng J, Wu J, Zhang F, Xu L, Zhang P, Zhu A, Qu Y, Tu C, Carr MJ, He B. Extensive genetic diversity of polyomaviruses in sympatric bat communities: host-switching versus co-evolution. *J Virol*. 2020(February). Šaltinis: 10.1128/JVI.02101-19
167. Tao Y, Shi M, Conrardy C, Kuzmin I V., Recuenco S, Agwanda B, Alvarez DA, Ellison JA, Gilbert AT, Moran D, Niezgodna M, Lindblade KA, Holmes EC, Breiman RF, Rupprecht CE, Tong S. Discovery of diverse polyomaviruses in bats and the evolutionary history of the Polyomaviridae. *J Gen Virol*. 2013. 94(PART4):738–748. Šaltinis: 10.1099/vir.0.047928-0
168. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ. Risk Factors for Human Disease Emergence. *Philos Trans Biol Sci*. 2001. 356:983–9.
169. Tisza MJ, Pastrana D V., Welch NL, Stewart B, Peretti A, Starrett GJ, Pang YYS, Krishnamurthy SR, Pesavento PA, McDermott DH, Murphy PM, Whited JL, Miller B, Brenchley J, Rosshart SP, Rehmann B, Doorbar J, Ta’ala BA, Pletnikova O, Troncoso JC, Resnick SM, Bolduc B, Sullivan MB, Varsani A, Segall AM, Buck CB. Discovery of several thousand highly diverse circular DNA viruses. *Elife*. 2020. 9. Šaltinis: 10.7554/eLife.51971
170. Torres C. Evolution and molecular epidemiology of polyomaviruses. *Infect Genet Evol*. 2020. 79(November 2019):104150. Šaltinis: 10.1016/j.meegid.2019.104150
171. Torres C, Barrios ME, Cammarata RV, Cisterna DM, Estrada T, Martini Novas S, Cahn P, Blanco Fernández MD, Mbayed VA. High diversity of human polyomaviruses in environmental and clinical samples in Argentina: Detection of JC, BK, Merkel-cell, Malawi, and human 6 and 7 polyomaviruses. *Sci Total Environ*. 2016. Šaltinis: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.047
172. Vasiliūnaitė E. Žmogaus poliomos virusų WU ir 7 VP1 baltymų į virusus panašių dalelių formavimosi *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse optimizavimas. [Kursinis darbas] Vilnius: Vilniaus universitetas; 2017.

173. Vinograd J, Lebowitz J, Radloff R, Watson R, Laipis P. The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1965. 53(5):1104–1111. Šaltinis: 10.1073/pnas.53.5.1104
174. Viscidi RP, Rollison DE, Sondak VK, Silver B, Messina JL, Giuliano AR, Fulp W, Ajidahun A, Rivanera D. Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, BK virus, and JC virus. *Clin Vaccine Immunol*. 2011. 18(10):1737–43. Šaltinis: 10.1128/CVI.05175-11
175. Waga S, Stillman B. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature*. 1994. 369(6477):207–212. Šaltinis: 10.1038/369207a0
176. Wang DY-C, Kumar S, Hedges SB. Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proc R Soc B Biol Sci*. 1999. 266:163–71.
177. Weil R, Vinograd J. The Cyclic Helix and Cyclic Coil Forms of Polyoma Viral DNA. *Proc Natl Acad Sci United States*. 1963. 50(January):730–738. Šaltinis: 10.1073/pnas.50.4.730
178. Welch NL, Yutin N, Dill JA, Camus AC, Pang Y-YS, Schiller JT, An P, Cantalupo PG, Pipas JM, Delwart E, Koda S, Subramaniam K, Waltzek TB, Bian C, Shi Q, Ruan Z, Koonin E V, Buck CB, Ng TFF. Adomaviruses: an emerging virus family provides insights into DNA virus evolution. 2019. Šaltinis: 10.1101/341131
179. Williams SH, Che X, Garcia JA, Klena JD, Lee B, Muller D, Ulrich W, Corrigan RM, Nichol S, Jain K, Lipkin WI. Viral Diversity of House Mice in New York City. *MBio*. 2018. 9(2):e01354-17. Šaltinis: 10.1128/mBio.01354-17
180. Wong C, Zhang S, Adam E, Paszat L, Butel JS. SV40 seroprevalence in two Latin American countries involved in field trials of candidate oral poliovaccines. *J Infect*. 2019. 78(6):476–483. Šaltinis: 10.1016/j.jinf.2019.04.007
181. Zerrahn J, Knippschild U, Winkler T, Deppert W. Independent expression of the transforming amino-terminal domain of SV40 large T antigen from an alternatively spliced third SV40 early mRNA. *EMBO J*. 1993. 12(12):4739–46.
182. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang R Di, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020. 579(7798):270–273. Šaltinis: 10.1038/s41586-020-2012-7
183. Zhou X, Bai H, Kataoka M, Ito M, Muramatsu M, Suzuki T, Li TC. Characterization of the self-assembly of New Jersey polyomavirus VP1 into virus-like particles and the virus seroprevalence in Japan. *Sci Rep*. 2019. 9(1). Šaltinis: 10.1038/s41598-019-49541-y

PRIEDAI

1 priedas. Tirti *Microtus* spp. inkstų mėginiai

Mėginiai surinkti Lietuvoje		
Eil. Nr.	Mėginio kodas	Rūšis
Padauginti naudojant Phi29		
1	2016-018-Ru	<i>M. agrestis</i>
2	2016-022-Ru	<i>M. oeconomus</i>
3	2016-025-Ru	<i>M. oeconomus</i>
4	2016-043-Ru	<i>M. agrestis</i>
5	2016-055-Ru	<i>M. agrestis</i>
6	2017-R46	<i>M. agrestis</i>
7	2017-R50	<i>M. oeconomus</i>
8	2017-R57	<i>M. agrestis</i>
9	2017-R65	<i>M. agrestis</i>
10	2017-R72	<i>M. oeconomus</i>
11	2017-R74	<i>M. oeconomus</i>
12	2016-3-Tr	<i>M. arvalis</i>
13	2016-4-Tr	<i>M. arvalis</i>
14	2016-7-Tr	<i>M. arvalis</i>
15	2016-20-Tr	<i>M. arvalis</i>
16	2016-21-Tr	<i>M. arvalis</i>
17	2016-23-Tr	<i>M. arvalis</i>
18	2016-27-Tr	<i>M. arvalis</i>
19	2017-Vab1	<i>M. arvalis</i>
20	2017- Vab 4	<i>M. oeconomus</i>
21	2017- Vab 5	<i>M. arvalis</i>
22	2017- Vab 11	<i>M. arvalis</i>
23	2017- Vab 18	<i>M. arvalis</i>
24	2017- Vab 23	<i>M. arvalis</i>
Padauginti naudojant EquiPhi29		
1	2016-006-Ru	<i>M. agrestis</i>
2	2016-011-Ru	<i>M. agrestis</i>
3	2016-020-Ru	<i>M. oeconomus</i>
4	2016-023-Ru	<i>M. oeconomus</i>
5	2016-024-Ru	<i>M. oeconomus</i>
6	2016-034-Ru	<i>M. oeconomus</i>
7	2016-045-Ru	<i>M. agrestis</i>
8	2016-059-Ru	<i>M. agrestis</i>
9	2016-064-Ru	<i>M. oeconomus</i>
10	2017-R6	<i>M. oeconomus</i>
11	2017-R13	<i>M. oeconomus</i>
12	2017-R18	<i>M. agrestis</i>
13	2017-R34	<i>M. oeconomus</i>
14	2017-R35	<i>M. oeconomus</i>
15	2017-R47	<i>M. agrestis</i>
16	2017-R51	<i>M. arvalis</i>

17	2017-R66	<i>M. oeconomus</i>
18	2017-R76	<i>M. oeconomus</i>
19	2017-T20	<i>M. oeconomus</i>
20	2016-11-Tr	<i>M. arvalis</i>
21	2016-22-Tr	<i>M. arvalis</i>
22	2016-24-Tr	<i>M. arvalis</i>
23	2016-28-Tr	<i>M. arvalis</i>
24	2017-Vab 2	<i>M. arvalis</i>
25	2017- Vab 6	<i>M. arvalis</i>
26	2017- Vab 12	<i>M. arvalis</i>
27	2017- Vab 13	<i>M. arvalis</i>
28	2017- Vab 15	<i>M. arvalis</i>
29	2017- Vab 16	<i>M. arvalis</i>
30	2017- Vab 17	<i>M. arvalis</i>
31	2017- Vab 19	<i>M. arvalis</i>
32	2017- Vab 20	<i>M. arvalis</i>
33	2017- Vab 22	<i>M. arvalis</i>
Mėginiai surinkti Vokietijoje		
Vokietijos šiaurė, Mecklenburg-Vorpommern regionas		
Eil. Nr.	Mėginio kodas	Rūšis
Padauginti naudojant Phi29		
1	KS10/2322	<i>M. arvalis</i>
2	KS10/2328	<i>M. arvalis</i>
3	KS10/2339	<i>M. arvalis</i>
4	KS10/2341	<i>M. arvalis</i>
5	KS10/2346	<i>M. arvalis</i>
6	KS10/2349	<i>M. arvalis</i>
7	KS10/3630	<i>M. arvalis</i>
8	KS10/3638	<i>M. arvalis</i>
9	KS10/3648	<i>M. arvalis</i>
10	KS10/3653	<i>M. arvalis</i>
11	KS11/0002	<i>M. arvalis</i>
12	KS11/0016	<i>M. arvalis</i>
13	KS11/1940	<i>M. arvalis</i>
14	KS11/2205	<i>M. arvalis</i>
15	KS15/0049	<i>M. arvalis</i>
16	KS15/0145	<i>M. arvalis</i>
17	KS15/0146	<i>M. arvalis</i>
18	KS15/0148	<i>M. arvalis</i>
19	KS15/0151	<i>M. arvalis</i>
20	KS15/0152	<i>M. arvalis</i>
21	KS15/0155	<i>M. arvalis</i>
22	KS15/0156	<i>M. arvalis</i>

23	KS15/0247	<i>M. arvalis</i>
24	KS15/0249	<i>M. arvalis</i>
Padauginti naudojant EquiPhi29		
1	KS10/2333	<i>M. arvalis</i>
2	KS10/3591	<i>M. arvalis</i>
3	KS10/3631	<i>M. arvalis</i>
4	KS10/3646	<i>M. arvalis</i>
5	KS11/0014	<i>M. arvalis</i>
6	KS11/0017	<i>M. arvalis</i>
7	KS11/2204	<i>M. arvalis</i>
8	KS13/0948	<i>M. arvalis</i>
9	KS15/0144	<i>M. arvalis</i>
10	KS15/0149	<i>M. arvalis</i>
11	KS15/0153	<i>M. arvalis</i>
12	KS15/0154	<i>M. arvalis</i>
13	KS15/0248	<i>M. arvalis</i>
<b>Vokietijos pietūs, Baden-Württemberg regionas</b>		
Eil. Nr.	Mėginio kodas	Rūšis
Padauginti naudojant Phi29		
1	KS10/1936	<i>M. arvalis</i>
2	KS10/1941	<i>M. arvalis</i>
3	KS10/1943	<i>M. arvalis</i>
4	KS10/1944	<i>M. arvalis</i>
5	KS10/1946	<i>M. arvalis</i>
6	KS11/1989	<i>M. arvalis</i>
7	KS11/1996	<i>M. arvalis</i>
8	KS11/1997	<i>M. arvalis</i>
9	KS11/1998	<i>M. arvalis</i>
10	KS11/2016	<i>M. arvalis</i>
11	KS11/2314	<i>M. arvalis</i>
12	KS11/2315	<i>M. arvalis</i>
13	KS11/2318	<i>M. arvalis</i>
14	KS11/2325	<i>M. arvalis</i>
15	KS15/0158	<i>M. arvalis</i>
16	KS15/0160	<i>M. arvalis</i>
17	KS15/0162	<i>M. arvalis</i>
18	KS15/0167	<i>M. arvalis</i>
19	KS15/0168	<i>M. arvalis</i>
20	KS15/0169	<i>M. arvalis</i>
21	KS15/0231	<i>M. arvalis</i>
22	KS15/0237	<i>M. arvalis</i>
23	KS15/0239	<i>M. arvalis</i>
24	KS15/0243	<i>M. arvalis</i>
Padauginti naudojant EquiPhi29		
1	KS10/1937	<i>M. arvalis</i>
2	KS10/1939	<i>M. arvalis</i>
3	KS10/1942	<i>M. arvalis</i>
4	KS10/1950	<i>M. arvalis</i>

5	KS10/1955	<i>M. arvalis</i>
6	KS10/3581	<i>M. arvalis</i>
7	KS11/1988	<i>M. arvalis</i>
8	KS11/1990	<i>M. arvalis</i>
9	KS11/2289	<i>M. arvalis</i>
10	KS11/2302	<i>M. arvalis</i>
11	KS11/2304	<i>M. arvalis</i>
12	KS11/2313	<i>M. arvalis</i>
13	KS11/2324	<i>M. arvalis</i>
14	KS15/0159	<i>M. arvalis</i>
15	KS15/0241	<i>M. arvalis</i>
16	KS15/0246	<i>M. arvalis</i>
<b>Mėginiai surinkti Čekijoje</b>		
Eil. Nr.	Mėginio kodas	Rūšis
Padauginti naudojant Phi29		
1	KS17/74	<i>M. arvalis</i>
2	KS17/78	<i>M. arvalis</i>
3	KS17/79	<i>M. arvalis</i>
4	KS17/81	<i>M. arvalis</i>
5	KS17/85	<i>M. arvalis</i>
6	KS17/90	<i>M. arvalis</i>
7	KS17/93	<i>M. arvalis</i>
8	KS17/94	<i>M. arvalis</i>
9	KS17/96	<i>M. arvalis</i>
10	KS17/97	<i>M. arvalis</i>
11	KS17/101	<i>M. arvalis</i>
12	KS17/103	<i>M. arvalis</i>
13	KS17/104	<i>M. arvalis</i>
14	KS17/106	<i>M. arvalis</i>
15	KS17/107	<i>M. arvalis</i>
16	KS17/108	<i>M. arvalis</i>
17	KS17/110	<i>M. arvalis</i>
18	KS17/111	<i>M. arvalis</i>
19	KS17/118	<i>M. arvalis</i>
20	KS17/120	<i>M. arvalis</i>
21	KS17/124	<i>M. arvalis</i>
22	KS17/126	<i>M. arvalis</i>
23	KS17/128	<i>M. arvalis</i>
24	KS17/131	<i>M. arvalis</i>
Padauginti naudojant EquiPhi29		
1	KS17/73	<i>M. arvalis</i>
2	KS17/77	<i>M. arvalis</i>
3	KS17/84	<i>M. arvalis</i>
4	KS17/86	<i>M. arvalis</i>
5	KS17/88	<i>M. arvalis</i>
6	KS17/92	<i>M. arvalis</i>
7	KS17/100	<i>M. arvalis</i>
8	KS17/112	<i>M. arvalis</i>
9	KS17/114	<i>M. arvalis</i>

10	KS17/116	<i>M. arvalis</i>
11	KS17/117	<i>M. arvalis</i>
12	KS17/123	<i>M. arvalis</i>
13	KS17/125	<i>M. arvalis</i>
14	KS17/127	<i>M. arvalis</i>
15	KS17/129	<i>M. arvalis</i>
16	KS17/132	<i>M. arvalis</i>
<b>Mėginiai surinkti Ispanijoje</b>		
Eil. Nr.	Mėginio kodas	Rūšis
<b>Padauginti naudojant Phi29</b>		
1	M785/15	<i>M. arvalis</i>
2	M829/15	<i>M. arvalis</i>
3	M833/15	<i>M. arvalis</i>
4	M844/15	<i>M. arvalis</i>
5	M858/15	<i>M. arvalis</i>
6	M862/15	<i>M. arvalis</i>
7	M867/15	<i>M. arvalis</i>
8	M870/15	<i>M. arvalis</i>
9	M952/15	<i>M. arvalis</i>
10	M956/15	<i>M. arvalis</i>
11	M957/15	<i>M. arvalis</i>
12	M960/15	<i>M. arvalis</i>
13	M961/15	<i>M. arvalis</i>
14	M970/15	<i>M. arvalis</i>
15	M972/15	<i>M. arvalis</i>

**2 priedas. Tirti *Apodemus* spp. mėginiai**

+ – tirtas mėginys, X – mėginio nėra

Eil. nr.	Mėginio kodas	Rūšis	Inkstai	Blužnis	Plaučiai	Krūtinės ertmės skystis
1	P2	<i>A.flavicollis</i>	+	X	X	+
2	P3	<i>A.flavicollis</i>	+	X	X	+
3	P4	<i>A.agrarius</i>	+	X	X	+
4	P5	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
5	P6	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
6	P7	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
7	P8	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
8	P9	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
9	P10	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
10	P11	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
11	P12	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
12	P13	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
13	P14	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
14	P15	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
15	P16	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
16	P30	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
17	P31	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
18	P32	<i>A.agrarius</i>	+	X	+	+
19	P33	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
20	P34	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
21	P35	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
22	P38	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
23	P41	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
24	P43	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
25	P46	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
26	P47	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
27	P48	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
28	P49	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
29	P50	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
30	P51	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
31	P52	<i>A.flavicollis</i>	+	+	+	+
32	P53	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
33	P54	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+
34	P55	<i>A.agrarius</i>	+	+	+	+



**3 priedas. Tirti *Rattus* spp. inkstų mėginiai**  
 Nr. 34 žiurkės buvo tirtas ir plaučių mėginys

Eilės nr.	Mėginio kodas	Rūšis
1	<b>R132</b>	<i>R.rattus</i>
2	<b>R133</b>	<i>R.rattus</i>
3	<b>R155</b>	<i>R.rattus</i>
4	<b>R156</b>	<i>R.rattus</i>
5	<b>R157</b>	<i>R.rattus</i>
6	<b>R158</b>	<i>R.rattus</i>
7	<b>R159</b>	<i>R.rattus</i>
8	<b>R160</b>	<i>R.rattus</i>
9	<b>R161</b>	<i>R.rattus</i>
10	<b>R162</b>	<i>R.rattus</i>
11	<b>R163</b>	<i>R.rattus</i>
12	<b>R164</b>	<i>R.rattus</i>
13	<b>R165</b>	<i>R.rattus</i>
14	<b>R166</b>	<i>R.rattus</i>
15	<b>R168</b>	<i>R.rattus</i>
16	<b>R169</b>	<i>R.rattus</i>
17	<b>R171</b>	<i>R.norvegicus</i>
18	<b>R172</b>	<i>R.norvegicus</i>
19	<b>R173</b>	<i>R.norvegicus</i>
20	<b>R174</b>	<i>R.norvegicus</i>
21	<b>R175</b>	<i>R.norvegicus</i>
22	<b>R176</b>	<i>R.norvegicus</i>
23	<b>R177</b>	<i>R.norvegicus</i>

24	<b>R178</b>	<i>R.norvegicus</i>
25	<b>R179</b>	<i>R.norvegicus</i>
26	<b>R180</b>	<i>R.rattus</i>
27	<b>R181</b>	<i>R.rattus</i>
28	<b>R182</b>	<i>R.rattus</i>
29	<b>R183</b>	<i>R.rattus</i>
30	<b>R184</b>	<i>R.rattus</i>
31	<b>R185</b>	<i>R.rattus</i>
32	<b>R186</b>	<i>R.norvegicus</i>
33	<b>R187</b>	<i>R.norvegicus</i>
34	<b>R188</b>	<i>R.rattus</i>
35	<b>R189</b>	<i>R.norvegicus</i>
36	<b>R190</b>	<i>R.norvegicus</i>
37	<b>R200</b>	<i>R.rattus</i>
38	<b>R201</b>	<i>R.rattus</i>
39	<b>R202</b>	<i>R.rattus</i>
40	<b>R208</b>	<i>R.rattus</i>
41	<b>R210</b>	<i>R.rattus</i>
42	<b>R212</b>	<i>R.rattus</i>
43	<b>R213</b>	<i>R.rattus</i>
44	<b>R215</b>	<i>R.rattus</i>
45	<b>R217</b>	<i>R.rattus</i>
46	<b>R218</b>	<i>R.rattus</i>
47	<b>R219</b>	<i>R.rattus</i>
48	<b>R226</b>	<i>R.norvegicus</i>
49	<b>R227</b>	<i>R.norvegicus</i>
50	<b>R235</b>	<i>R.rattus</i>

#### 4 priedas. Evoliucinės divergencijos tarp MarPyV2, MPtV ir CVPyV įvertinimas

Lentelėje pateikiamas skirtumų tarp MarPyV2, MPtV ir CVPyV DNR ir baltymų skaičius sekai. Skliausteliuose nurodyta sekų identiškumo dalis. Analizė atlikta MEGA X programine įranga, palyginys sudarytas naudojant Muscle algoritimą.

		LTag, ar										
		MarPyV2							MPtV	CVPyV	Ilgis, ar.	
		ISP_4	ISP_15	PV_17	PV_18	PV_19	PV_24	SV_7				
LTag, nt	MarPyV2	ISP_4		3 (0,99)	13 (0,97)	13 (0,97)	13 (0,97)	13 (0,97)	11 (0,98)	124 (0,8)	328 (0,49)	645
		ISP_15	3 (0,9984)		12 (0,9813)	12 (0,9813)	12 (0,9813)	12 (0,9813)	10 (0,9844)	125 (0,8062)	328 (0,493)	645
		PV_17	56 (0,971)	55 (0,9715)		0 (1)	0 (1)	0 (1)	9 (0,986)	122 (0,8102)	329 (0,4914)	643
		PV_18	58 (0,97)	57 (0,9705)	2 (0,9989)		0 (1)	0 (1)	9 (0,986)	122 (0,8102)	329 (0,4914)	643
		PV_19	58 (0,97)	57 (0,9705)	2 (0,9989)	0 (1)		0 (1)	9 (0,986)	122 (0,8102)	329 (0,4914)	643
		PV_24	57 (0,9705)	56 (0,971)	3 (0,9984)	1 (0,9994)	1 (0,9994)		9 (0,986)	122 (0,8102)	329 (0,4914)	643
		SV_7	58 (0,97)	57 (0,9705)	53 (0,9725)	51 (0,9735)	51 (0,9735)	50 (0,974)		120 (0,8133)	328 (0,493)	645
	MPtV	475 (0,7571)	475 (0,7571)	461 (0,7643)	460 (0,7648)	460 (0,7648)	459 (0,7653)	463 (0,7632)		333 (0,4892)	652	
	CVPyV	767 (0,6048)	768 (0,6043)	752 (0,6125)	750 (0,6136)	750 (0,6136)	749 (0,6141)	755 (0,611)	810 (0,5858)		647	
Ilgis, bp	1935	1935	1929	1929	1929	1929	1935	1956	1941			
		VP1, ar										
		MarPyV2							MPtV	CVPyV	Ilgis, ar.	
		ISP_4	ISP_15	PV_17	PV_18	PV_19	PV_24	SV_7				
VP1, nt	MarPyV2	ISP_4		0 (1)	1 (0,9972)	1 (0,9972)	1 (0,9972)	1 (0,9972)	2 (0,9944)	42 (0,8836)	235 (0,349)	361
		ISP_15	1 (0,999)		1 (0,9972)	1 (0,9972)	1 (0,9972)	1 (0,9972)	2 (0,9944)	42 (0,8836)	235 (0,349)	361
		PV_17	20 (0,9815)	21 (0,9806)		0 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (0,9972)	41 (0,8864)	235 (0,349)	361
		PV_18	20 (0,9815)	21 (0,9806)	0 (1)		0 (1)	0 (1)	1 (0,9972)	41 (0,8864)	235 (0,349)	361
		PV_19	20 (0,9815)	21 (0,9806)	0 (1)	0 (1)		0 (1)	1 (0,9972)	41 (0,8864)	235 (0,349)	361
		PV_24	20 (0,9815)	21 (0,9806)	0 (1)	0 (1)	0 (1)		1 (0,9972)	41 (0,8864)	235 (0,349)	361
		SV_7	27 (0,975)	28 (0,9741)	19 (0,9824)	19 (0,9824)	19 (0,9824)	19 (0,9824)		40 (0,8891)	235 (0,349)	361
	MPtV	266 (0,7584)	266 (0,7584)	266 (0,7584)	266 (0,7584)	266 (0,7584)	266 (0,7584)	264 (0,7602)		233 (0,3651)	367	
	CVPyV	422 (0,6037)	421 (0,6046)	419 (0,6065)	419 (0,6065)	419 (0,6065)	419 (0,6065)	419 (0,6065)	447 (0,594)		355	
Ilgis, bp	1083	1083	1083	1083	1083	1083	1083	1101	1065			

		GENOMAS, nt											
		MarPyV2							MPtV	CVPyV	Ilgis, bp		
		ISP_4	ISP_15	PV_17	PV_18	PV_19	PV_24	SV_7					
GENOMAS, nt	MarPyV2	ISP_4										4999	
		ISP_15	9 (0,9981)										4999
		PV_17	119 (0,9761)	124 (0,9751)									4985
		PV_18	101 (0,9797)	102 (0,9795)	26 (0,9947)								4991
		PV_19	121 (0,9757)	126 (0,9747)	2 (0,9995)	24 (0,9951)							4985
		PV_24	120 (0,9759)	125 (0,9749)	3 (0,9993)	25 (0,9949)	1 (0,9997)						4985
		SV_7	146 (0,9707)	150 (0,9699)	126 (0,9747)	134 (0,9731)	124 (0,9751)	123 (0,9753)					4997
	MPtV	1302 (0,7398)	1303 (0,7396)	1281 (0,744)	1285 (0,7432)	1280 (0,7442)	1279 (0,7444)	1290 (0,7422)				5005	
	CVPyV	1895 (0,6228)	1896 (0,6226)	1877 (0,6263)	1877 (0,6263)	1876 (0,6265)	1875 (0,6267)	1886 (0,6246)	1983 (0,6052)			5024	

## 5 priedas. Heksanukleotidinių pradmenų kūrimui naudotų sekų identifikaciniai kodai

AB038249.1	AB048576.1	AB077868.1	AB081600.1	AB103409.1
AB038250.1	AB048577.1	AB077869.1	AB081601.1	AB103410.1
AB038251.1	AB048578.1	AB077870.1	AB081602.1	AB103411.1
AB038252.1	AB048579.1	AB077871.1	AB081603.1	AB103412.1
AB038253.1	AB048580.1	AB077872.1	AB081604.1	AB103413.1
AB038254.1	AB048581.1	AB077873.1	AB081605.1	AB103414.1
AB038255.1	AB048582.1	AB077874.1	AB081606.1	AB103415.1
AB048545.1	AB074575.1	AB077875.1	AB081607.1	AB103416.1
AB048546.1	AB074576.1	AB077876.1	AB081608.1	AB103417.1
AB048548.1	AB074577.1	AB077877.1	AB081609.1	AB103418.1
AB048549.1	AB074578.1	AB077878.1	AB081610.1	AB103419.1
AB048550.1	AB074579.1	AB077879.1	AB081611.1	AB103420.1
AB048551.1	AB074580.1	AB081005.1	AB081612.1	AB103421.1
AB048552.1	AB074581.1	AB081006.1	AB081613.1	AB103422.1
AB048553.1	AB074582.1	AB081007.1	AB081614.1	AB103423.1
AB048554.1	AB074583.1	AB081008.1	AB081615.1	AB104487.1
AB048555.1	AB074584.1	AB081009.1	AB081616.1	AB113118.1
AB048556.1	AB074585.1	AB081010.1	AB081617.1	AB113119.1
AB048557.1	AB074586.1	AB081011.1	AB081618.1	AB113120.1
AB048558.1	AB074587.1	AB081012.1	AB081654.1	AB113121.1
AB048559.1	AB074588.1	AB081013.1	AB092578.1	AB113122.1
AB048560.1	AB074589.1	AB081014.1	AB092579.1	AB113123.1
AB048561.1	AB074590.1	AB081015.1	AB092580.1	AB113124.1
AB048562.1	AB074591.1	AB081016.1	AB092581.1	AB113125.1
AB048563.1	AB077855.1	AB081017.1	AB092582.1	AB113126.1
AB048564.1	AB077856.1	AB081018.1	AB092583.1	AB113127.1
AB048565.1	AB077857.1	AB081019.1	AB092584.1	AB113128.1
AB048566.1	AB077858.1	AB081020.1	AB092585.1	AB113129.1
AB048567.1	AB077859.1	AB081021.1	AB092586.1	AB113130.1
AB048568.1	AB077860.1	AB081023.1	AB092587.1	AB113132.1
AB048569.1	AB077861.1	AB081024.1	AB103387.1	AB113133.1
AB048570.1	AB077862.1	AB081025.1	AB103402.1	AB113134.1
AB048571.1	AB077863.1	AB081026.1	AB103404.1	AB113135.1
AB048572.1	AB077864.1	AB081027.1	AB103405.1	AB113136.1
AB048573.1	AB077865.1	AB081028.1	AB103406.1	AB113137.1
AB048574.1	AB077866.1	AB081029.1	AB103407.1	AB113138.1
AB048575.1	AB077867.1	AB081030.1	AB103408.1	AB113139.1

AB113140.1	AB126999.1	AB183539.1	AB211379.1	AB262405.1
AB113141.1	AB127000.1	AB183540.1	AB211381.1	AB262406.1
AB113142.1	AB127001.1	AB183541.1	AB211382.1	AB262407.1
AB113143.1	AB127002.1	AB183542.1	AB211383.1	AB262408.1
AB113144.1	AB127003.1	AB183543.1	AB211384.1	AB262409.1
AB113145.1	AB127004.1	AB183544.1	AB211385.1	AB262410.1
AB113216.1	AB127005.1	AB185020.1	AB211386.1	AB262411.1
AB113217.1	AB127006.1	AB190449.1	AB211387.1	AB262412.1
AB118231.1	AB127007.1	AB190450.1	AB211388.1	AB262413.1
AB118232.1	AB127008.1	AB190451.1	AB211389.1	AB263912.1
AB118233.1	AB127009.1	AB190452.1	AB211390.1	AB263913.1
AB118234.1	AB127010.1	AB190453.1	AB211391.1	AB263914.1
AB118235.1	AB127011.1	AB195639.1	AB212952.1	AB263915.1
AB118651.1	AB127012.1	AB195640.1	AB212953.1	AB263916.1
AB118652.1	AB127013.1	AB198940.1	AB212954.1	AB263917.1
AB118653.1	AB127014.1	AB198941.1	AB213487.1	AB263918.1
AB118654.1	AB127015.1	AB198942.1	AB217917.1	AB263919.1
AB118655.1	AB127016.1	AB198943.1	AB217918.1	AB263920.1
AB118656.1	AB127017.1	AB198944.1	AB217919.1	AB263921.1
AB118657.1	AB127018.1	AB198945.1	AB217920.1	AB263922.1
AB118658.1	AB127019.1	AB198946.1	AB217921.1	AB263923.1
AB118659.1	AB127021.1	AB198947.1	AB220939.1	AB263924.1
AB126981.1	AB127022.1	AB198948.1	AB220941.1	AB263925.1
AB126983.1	AB127023.1	AB198949.1	AB220942.1	AB263926.1
AB126984.1	AB127024.1	AB198950.1	AB260028.1	AB263927.1
AB126985.1	AB127027.1	AB198951.1	AB260029.1	AB263928.1
AB126986.1	AB127342.1	AB198952.1	AB260030.1	AB263929.1
AB126987.1	AB127343.2	AB198953.1	AB260031.1	AB263930.1
AB126988.1	AB127344.1	AB198954.1	AB260032.1	AB263931.1
AB126989.1	AB127345.2	AB211369.1	AB260033.1	AB263932.1
AB126990.1	AB127346.1	AB211370.1	AB262396.1	AB263934.1
AB126991.1	AB127347.1	AB211371.1	AB262397.1	AB263935.1
AB126992.1	AB127348.1	AB211372.1	AB262398.1	AB263936.1
AB126993.1	AB127349.1	AB211373.1	AB262399.1	AB263938.1
AB126994.1	AB127350.2	AB211374.1	AB262400.1	AB269824.1
AB126995.1	AB127351.2	AB211375.1	AB262401.1	AB269825.1
AB126996.1	AB127352.1	AB211376.1	AB262402.1	AB269826.1
AB126997.1	AB127353.1	AB211377.1	AB262403.1	AB269827.1
AB126998.1	AB183152.1	AB211378.1	AB262404.1	AB269828.1

AB269829.1	AB298942.1	AB365137.1	AB369095.1	AB588640.1
AB269830.1	AB298945.1	AB365138.1	AB369096.1	AB767294.1
AB269831.1	AB298946.1	AB365139.1	AB369097.1	AB767295.2
AB269832.1	AB298947.1	AB365140.1	AB369098.1	AB767297.1
AB269834.1	AB301086.1	AB365141.1	AB369099.1	AB767298.1
AB269836.1	AB301087.1	AB365142.1	AB369101.1	AB767299.2
AB269837.1	AB301089.1	AB365144.1	AB372036.1	AB873001.1
AB269838.1	AB301090.1	AB365145.1	AB372037.1	AB972940.1
AB269840.1	AB301091.1	AB365146.1	AB372038.1	AB972941.1
AB269841.1	AB301092.1	AB365148.1	AB453159.1	AB972942.1
AB269842.1	AB301093.1	AB365149.1	AB453160.1	AB972943.1
AB269843.1	AB301094.1	AB365150.1	AB453161.1	AB972944.1
AB269844.1	AB301095.1	AB365151.1	AB453162.1	AB972945.1
AB269845.1	AB301096.1	AB365153.1	AB453163.1	AB972946.1
AB269846.1	AB301097.1	AB365154.1	AB453164.1	AB972947.1
AB269847.1	AB301099.1	AB365156.1	AB453165.1	AF004349.1
AB269848.1	AB301100.1	AB365157.1	AB453166.1	AF004350.1
AB269849.1	AB301101.1	AB365158.1	AB464953.1	AF015526.1
AB269850.1	AB362351.1	AB365159.1	AB464954.1	AF015527.1
AB269851.1	AB362352.1	AB365160.1	AB464956.1	AF015528.1
AB269852.1	AB362353.1	AB365162.1	AB464957.1	AF015529.1
AB269853.1	AB362354.1	AB365164.1	AB464958.1	AF015530.1
AB269854.1	AB362355.1	AB365165.1	AB464960.1	AF015531.1
AB269855.1	AB362356.1	AB365166.1	AB464961.1	AF015532.1
AB269856.1	AB362357.1	AB365167.1	AB464962.1	AF015533.1
AB269857.1	AB362358.1	AB365168.1	AB485695.1	AF015534.1
AB269858.1	AB362359.1	AB365170.1	AB485696.1	AF015535.1
AB269859.1	AB362360.1	AB365173.1	AB485697.1	AF015536.1
AB269860.1	AB362361.1	AB365174.1	AB485698.1	AF015537.1
AB269861.1	AB362362.1	AB365175.1	AB485699.1	AF030085.1
AB269862.1	AB362363.1	AB365176.1	AB485700.1	AF038616.1
AB269863.1	AB362364.1	AB365178.1	AB485701.1	AF118150.1
AB269864.1	AB362365.1	AB369087.1	AB485703.1	AF155358.1
AB269865.1	AB362366.1	AB369088.1	AB485704.1	AF155359.1
AB269866.1	AB365130.1	AB369089.1	AB485707.1	AF156105.1
AB269867.1	AB365132.1	AB369090.1	AB485709.1	AF156107.1
AB269868.1	AB365133.1	AB369092.1	AB485710.1	AF156108.1
AB269869.1	AB365134.1	AB369093.1	AB485711.1	AF168994.2
AB298941.1	AB365136.1	AB369094.1	AB485712.1	AF180737.1

AF241169.1	AF300945.1	AF396429.1	AY382187.1	DM151883.1
AF241170.1	AF300946.1	AF396430.1	AY382188.1	DM151884.1
AF281599.1	AF300947.1	AF396431.1	AY386373.1	DM151885.1
AF281600.1	AF300948.1	AF396432.1	AY386374.1	DM151886.1
AF281601.1	AF300950.1	AF396433.1	AY386375.1	DM151887.1
AF281602.1	AF300951.1	AF396434.1	AY386376.1	DM151888.1
AF281603.1	AF300952.1	AF396435.1	AY386377.1	DM151889.1
AF281604.1	AF300953.1	AF442959.1	AY386378.1	DM151890.1
AF281605.1	AF300954.1	AY120890.1	AY536239.1	DM151891.1
AF281606.1	AF300955.1	AY121907.1	AY536240.1	DM151892.1
AF281607.1	AF300956.1	AY121908.1	AY536241.1	DM151893.1
AF281608.1	AF300957.1	AY121909.1	AY536242.1	DM151894.1
AF281609.1	AF300958.1	AY121910.1	AY536243.1	DQ192570.1
AF281610.1	AF300959.1	AY121911.1	AY538779.1	DQ192571.1
AF281611.1	AF300960.1	AY121912.1	AY628224.1	DQ218418.1
AF281612.1	AF300961.1	AY121913.1	AY628225.1	DQ305492.1
AF281613.1	AF300962.1	AY121914.1	AY628226.1	DQ435829.1
AF281614.1	AF300963.1	AY121915.1	AY628227.1	DQ660375.1
AF281615.1	AF300964.1	AY140894.1	AY628228.1	DQ875211.1
AF281616.1	AF300965.1	AY271816.1	AY628229.1	DQ875212.1
AF281617.1	AF300966.1	AY271817.1	AY628230.1	DQ989794.1
AF281618.1	AF300967.1	AY328376.1	AY628231.1	DQ989795.1
AF281619.1	AF316139.1	AY342299.1	AY628232.1	DQ989796.1
AF281620.1	AF316141.1	AY349147.1	AY628233.1	DQ989797.1
AF281621.1	AF332562.1	AY356539.1	AY628234.1	DQ989798.1
AF281622.1	AF332699.1	AY364314.1	AY628235.1	DQ989799.1
AF281623.1	AF345344.1	AY366359.1	AY628236.1	DQ989800.1
AF281624.1	AF345345.1	AY373463.1	AY628237.1	DQ989801.1
AF281625.1	AF363831.1	AY376828.1	AY628238.1	DQ989802.1
AF281626.1	AF363832.1	AY376829.1	AY672646.1	DQ989803.1
AF295731.1	AF363833.1	AY376830.1	AM748741.2	DQ989804.1
AF295732.1	AF363834.1	AY376831.1	BD102073.1	DQ989805.1
AF295733.1	AF396422.1	AY378084.1	BK010702.1	DQ989806.1
AF295734.1	AF396423.1	AY378085.1	D13942.1	DQ989807.1
AF295735.1	AF396424.1	AY378086.1	DM151862.1	DQ989808.1
AF295736.1	AF396425.1	AY378087.1	DM151872.1	DQ989809.1
AF295737.1	AF396426.1	AY382184.1	DM151878.1	DQ989810.1
AF295738.1	AF396427.1	AY382185.1	DM151881.1	DQ989811.1
AF295739.1	AF396428.1	AY382186.1	DM151882.1	DQ989812.1

DQ989813.1	FJ385773.1	GU296375.1	HM011554.1	JF424848.1
EF127906.1	FJ464337.1	GU296379.1	HM011555.1	JF424849.1
EF127907.1	FJ794068.1	GU296380.1	HM011556.1	JF424852.1
EF127908.1	FJ890981.1	GU296381.1	HM011558.1	JF424853.1
EF186666.1	FJ890982.1	GU296382.1	HM011559.1	JF424855.1
EF376992.1	FN356900.1	GU296384.1	HM011560.1	JF424861.1
EF444549.1	FN356901.1	GU296385.1	HM011561.1	JF424864.1
EF444550.1	FN812745.1	GU296386.1	HM011562.1	JF424865.1
EF444551.1	FR692334.1	GU296387.1	HM011563.1	JF424867.1
EF444552.1	FR692335.1	GU296388.1	HM011564.1	JF424869.1
EF444553.1	FR692336.1	GU296391.1	HM011565.1	JF424870.1
EF444554.1	FR720308.1	GU296392.1	HM011566.1	JF424874.1
EF520287.1	FR720309.1	GU296393.1	HM011567.1	JF424876.1
EF520289.1	FR720310.1	GU296395.1	HM011568.1	JF424879.1
EF579658.1	FR720311.1	GU296396.1	HM011569.1	JF424886.1
EF579659.1	FR720312.1	GU296398.1	HM355825.1	JF424894.1
EF579660.1	FR720313.1	GU296399.1	HQ218321.1	JF424895.1
EF579662.1	FR720315.1	GU296400.1	HQ385746.1	JF424902.1
EF579663.1	FR720317.1	GU296402.1	HQ385747.1	JF424910.1
EF579664.1	FR720318.1	GU296403.1	HQ385748.1	JF424911.1
EF579665.1	FR720320.1	GU296404.1	HQ385749.1	JF424912.1
EF579666.1	FR720321.1	GU296405.1	HQ385750.1	JF424914.1
EF579803.1	FR823284.2	GU296406.1	HQ385751.1	JF424922.1
EF579804.1	GQ331138.1	GU345044.1	HQ385752.1	JF424942.1
EU296475.1	GQ926975.1	GU452537.1	HQ681903.1	JF424943.1
EU358766.1	GQ926976.1	GU989205.1	HQ681904.1	JF424950.1
EU358767.1	GQ926977.1	HG764413.1	HQ681905.1	JF424951.1
EU358768.1	GQ926978.1	HM011538.1	HQ696595.1	JF424954.1
EU358769.1	GQ926979.1	HM011539.1	J02288.1	JF424956.1
EU375803.1	GQ926980.1	HM011540.1	J02289.1	JF424961.1
EU375804.1	GU296361.1	HM011541.1	J02400.1	JF424962.1
EU711054.1	GU296362.1	HM011542.1	JA822296.1	JF425488.1
EU711055.1	GU296364.1	HM011543.1	JA822377.1	JF425551.1
EU711056.1	GU296365.1	HM011544.1	JF304775.1	JF812999.1
EU711057.1	GU296366.1	HM011546.1	JF424834.1	JF813000.1
EU711058.1	GU296367.1	HM011548.1	JF424836.1	JF813001.1
EU835194.1	GU296371.1	HM011549.1	JF424838.1	JF813002.1
FJ173815.1	GU296372.1	HM011552.1	JF424839.1	JF813003.1
FJ188392.1	GU296373.1	HM011553.1	JF424843.1	JF894228.1



JN192431.1	JX159983.1	KC571694.1	KY341899.1	KM655817.1
JN192432.1	JX159984.1	KC571696.1	KY404016.1	KM655868.1
JN192433.1	JX159985.1	KC571698.1	KY487998.1	KM655869.1
JN192434.1	JX159986.1	KC571699.1	KY549442.1	KM893862.1
JN192435.1	JX159987.1	KC571700.1	KY612371.1	KP033140.2
JN192437.1	JX159988.2	KC571701.1	KY986576.1	KP071318.1
JN192438.1	JX159989.1	KC571702.1	KY986577.1	KP264963.1
JN192439.1	JX259273.1	KC571703.1	KY986578.1	KP412983.1
JN192440.1	JX262162.1	KC571704.1	KY986579.1	KP644238.1
JN383838.1	JX273163.1	KC571705.1	KY986580.1	KP644239.1
JN383839.1	JX308829.1	KC594077.1	KY986581.1	KP768176.1
JN383840.1	JX416849.1	KC660158.2	KY986582.1	KP890267.1
JN383841.1	JX416850.1	KC690147.1	KY986583.1	KP984526.1
JQ178241.1	JX416851.1	KC831440.1	KJ022619.1	KR065722.1
JQ237146.1	JX416852.1	KF055891.1	KJ128379.1	KR065723.1
JQ412134.1	JX416853.1	KF055892.1	KJ128380.1	KR065724.1
JQ479315.1	JX463183.1	KF055893.1	KJ128381.1	KR075944.1
JQ479316.1	JX463184.1	KF147833.1	KJ452212.1	KR075945.1
JQ479317.1	JX520657.1	KF266963.1	KJ577598.1	KR090570.1
JQ479320.1	JX520658.1	KF266964.1	KJ641705.1	KR090571.1
JQ713822.1	JX520659.1	KF266965.1	KJ641707.1	KR338953.1
JQ723730.1	JX520660.1	KF360862.1	KJ643309.1	KR612368.1
JQ823124.1	JX520661.1	KF444091.1	KJ659286.1	KR612369.1
JQ898291.1	JX520662.1	KF444092.1	KJ659287.1	KR612370.1
JQ898292.1	JX520664.1	KF444093.1	KJ659288.1	KR612371.1
JQ958886.1	K02562.2	KF444094.1	KJ659289.1	KR612372.1
JQ958887.1	K02737.1	KF444095.1	KJ725028.1	KR612373.1
JQ958888.1	KC202810.1	KF444097.1	KJ733012.1	KR612374.1
JQ958889.1	KC549586.1	KF444098.1	KJ733013.1	KT184855.1
JQ958890.1	KC549587.1	KF444099.1	KM007161.1	KT184856.1
JQ958891.1	KC549588.1	KF444100.1	KM085447.1	KT184857.1
JQ958892.1	KC549589.1	KF444101.1	KM111535.1	KT184858.1
JQ958893.1	KC549590.1	KF525270.1	KM225765.1	KT184859.1
JX036360.1	KC549591.1	KF530304.1	KM265136.1	KT184860.1
JX045708.1	KC549592.1	KF651951.1	KM282376.1	KT184861.1
JX045709.1	KC549593.1	KF954417.1	KM496323.1	KT184862.1
JX159980.1	KC571691.1	KY114802.1	KM496324.1	KT203762.1
JX159981.1	KC571692.1	KY114803.1	KM496325.1	KT203763.1
JX159982.1	KC571693.1	KY132094.1	KM496326.1	KT203764.1

KT203765.1	KX034825.1	KX771235.1	LC426670.1	LN846618.1
KT203766.1	KX034826.1	KX781279.1	LC426671.1	LN846619.1
KT203767.1	KX034827.1	KX787894.1	LC426672.1	LR215986.1
KT203768.1	KX034828.1	KX808699.1	LC426673.1	LR215996.1
KT203769.1	KX034829.1	KX827417.1	LC426674.1	LR215997.1
KT302407.1	KX034830.1	LC029413.1	LC426675.1	LR215999.1
KT878838.1	KX034831.1	LC148292.1	LC426676.1	LR216001.1
KT884050.1	KX034832.1	LC148293.1	LC426677.1	LR216002.1
KT987216.1	KX034833.1	LC148294.1	LC426678.1	LR216003.1
KT987217.1	KX034834.1	LC148295.1	LC426680.1	LR216004.1
KU049032.1	KX034835.1	LC148296.1	LC426681.1	LR216005.1
KU170643.1	KX034836.1	LC148297.1	LC426682.1	LR216009.1
KU200259.1	KX034837.1	LC148298.1	LC426683.1	LR216070.1
KU221329.1	KX034838.1	LC148299.1	LC426684.1	LR216071.1
KU533635.1	KX034839.1	LC148300.1	LC426685.1	LR216072.1
KU596573.1	KX249741.1	LC148301.1	LC426686.1	LR216073.1
KU672381.1	KX379630.1	LC148302.1	LC426687.1	LR216074.1
KU746835.1	KX379631.1	LC164349.1	LC426688.1	LR216075.1
KU865500.1	KX434762.1	LC164350.1	LC426690.1	LR216076.1
KU879245.1	KX455485.1	LC164351.1	LC426691.1	LR216077.1
KX008968.1	KX455486.1	LC164352.1	LC426692.1	LR216078.1
KX034805.1	KX509984.1	LC164353.1	LC426694.1	LR216083.1
KX034806.1	KX533457.1	LC164354.1	LC426695.1	LR216084.1
KX034807.1	KX574453.1	LC185213.1	LC426696.1	LR216085.1
KX034809.1	KX643371.1	LC185214.1	LC426697.1	LR216086.1
KX034810.1	KX650181.1	LC185215.1	LC426698.1	LR216088.1
KX034811.1	KX650182.1	LC185216.1	LC426699.1	LR216089.1
KX034812.1	KX650184.1	LC185217.1	LC426700.1	LR216090.1
KX034813.1	KX650185.1	LC185218.1	LC426701.1	LR216092.1
KX034814.1	KX650186.1	LC269976.1	LC426702.1	LR216093.1
KX034815.1	KX650187.1	LC269977.1	LC426703.1	LR216094.1
KX034816.1	KX650188.1	LC269978.1	LC426704.1	LR216096.1
KX034817.1	KX650189.1	LC269979.1	LC426705.1	LR216101.1
KX034818.1	KX650190.1	LC269980.1	LC426706.1	LR216102.1
KX034820.1	KX650191.1	LC269981.1	LC426707.1	LR216103.1
KX034821.1	KX650192.1	LC309239.1	LC426708.1	LR216104.1
KX034822.1	KX650193.1	LC309240.1	LC426709.1	LR216105.1
KX034823.1	KX756154.1	LC422956.1	LC426710.1	LR216106.1
KX034824.1	KX771234.1	LC426669.1	LC480521.1	LR216108.1

LR216109.1	LR216157.1	LR216214.1	LR216265.1	MF662187.1
LR216110.1	LR216158.1	LR216215.1	LR216266.1	MF662188.1
LR216111.1	LR216160.1	LR216217.1	LR216284.1	MF662189.1
LR216112.1	LR216161.1	LR216218.1	LR216285.1	MF662190.1
LR216113.1	LR216162.1	LR216219.1	LT605004.1	MF662191.1
LR216114.1	LR216163.1	LR216220.1	LT615219.1	MF662192.1
LR216115.1	LR216164.1	LR216221.1	LT615220.1	MF662194.1
LR216116.1	LR216165.1	LR216222.1	LT615221.1	MF662195.1
LR216117.1	LR216170.1	LR216223.1	LT615222.1	MF662196.1
LR216118.1	LR216171.1	LR216224.1	LT615223.1	MF662197.1
LR216119.1	LR216172.1	LR216225.1	LT960370.1	MF662198.1
LR216120.1	LR216173.1	LR216226.1	M20775.1	MF662199.1
LR216121.1	LR216174.1	LR216227.1	M23122.1	MF662200.1
LR216122.1	LR216175.1	LR216229.1	M26281.1	MF662201.1
LR216124.1	LR216177.1	LR216230.1	M30540.1	MF662202.1
LR216125.1	LR216178.1	LR216231.1	M55904.2	MF662203.1
LR216126.1	LR216179.1	LR216234.1	MF094821.1	MF662204.1
LR216127.1	LR216182.1	LR216236.1	MF094822.1	MF662205.1
LR216128.1	LR216183.1	LR216237.1	MF175082.1	MG190356.1
LR216129.1	LR216185.1	LR216238.1	MF358970.1	MG241567.1
LR216130.1	LR216186.1	LR216239.1	MF374995.1	MG241568.1
LR216131.1	LR216187.1	LR216240.1	MF374996.1	MG241569.1
LR216133.1	LR216188.1	LR216241.1	MF374997.1	MG241570.1
LR216135.1	LR216190.1	LR216243.1	MF374998.1	MG241579.1
LR216136.1	LR216191.1	LR216244.1	MF374999.1	MG241580.1
LR216137.1	LR216193.1	LR216245.1	MF375000.1	MG241581.1
LR216138.1	LR216195.1	LR216246.1	MF375001.1	MG241582.1
LR216139.1	LR216196.1	LR216248.1	MF401582.1	MG654476.1
LR216141.1	LR216197.1	LR216249.1	MF401583.1	MG654477.1
LR216142.1	LR216198.1	LR216251.1	MF624713.1	MG654478.1
LR216148.1	LR216199.1	LR216252.1	MF624714.1	MG654479.1
LR216149.1	LR216200.1	LR216254.1	MF627830.1	MG654480.1
LR216150.1	LR216204.1	LR216255.1	MF627831.1	MG654481.1
LR216151.1	LR216205.1	LR216257.1	MF662180.1	MG654482.1
LR216152.1	LR216206.1	LR216258.1	MF662182.1	MG674199.1
LR216153.1	LR216207.1	LR216260.1	MF662183.1	MG701350.1
LR216154.1	LR216208.1	LR216261.1	MF662184.1	MG701352.1
LR216155.1	LR216211.1	LR216263.1	MF662185.1	MG701353.1
LR216156.1	LR216213.1	LR216264.1	MF662186.1	MG701354.1

MG701355.1	MH084650.1	MH844627.1	MK516256.1	U27812.1
MG701356.1	MH118578.1	MK049348.1	MK561422.1	U27813.1
MG721015.1	MH118579.1	MK049349.1	MK898813.1	U61771.1
MG800627.1	MH182627.1	MK049350.1	MN135851.1	U73500.1
MG976810.1	MH351677.1	MK061528.1	MN417229.1	U73501.1
MH084641.1	MH643735.1	MK372231.1	NC_001538.1	U73502.1
MH084642.1	MH824512.1	MK377486.1	NC_001699.1	V01109.1
MH084644.1	MH824513.1	MK443498.1	NC_004764.2	X59849.1
MH084649.1	MH824514.1	MK513523.1	NC_007611.1	

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju vadovei dr. Almai Gedvilaitei už įdomią darbo temą, konsultacijas, idėjas, motyvaciją ir visapusišką pagalbą rašant darbą.

Dėkoju dr. Albertui Timinskui už bioinformatikos konsultacijas.

Ačiū visam laboratorijos kolektyvui: Danguolei už pagalbą, patarimus ir puikią kompaniją, Andriui, Linai, Rūtai, Dianai ir Sofjai už diskusijas ir gerą nuotaiką. Labai dėkoju Mildai už darbo laboratorijoje pagrindų pamokas.

Taip pat esu dėkinga visam EGIS kolektyvui už malonią darbo aplinką. Justui ir Alionai taip pat dėkoju už EM nuotraukas.