

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Sára Kheilová**

Extrachromozomální genetická informace kvasinek

Extrachromosomal genetic information of yeast

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Kristýna Lálíková

Praha, 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 29. 4. 2025

#### Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce Mgr. Kristýně Lalíkové za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při zpracování této bakalářské práce. Dále děkuji konzultantovi Mgr. Václavu Vopálenskému, Ph.D. za odborné připomínky a podněty. Poděkování patří také mé rodině za podporu během celého studia.

Tato práce byla financována z projektu Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU a z projektu OP JAK CZ.02.01.01/00/22\_008/0004575 RNA pro terapii, spolufinancováno Evropskou unií.

## Abstrakt

Tato bakalářská práce představuje přehled extrachromozomální genetické informace kvasinkových buněk. Zaměřuje se na tři hlavní typy extrachromozomálních genetických elementů – jaderný 2 micron plasmid, cytoplazmatické virům podobné partikule (VLP) a cytoplazmatické virům podobné elementy (VLE). Jaderný 2 micron plasmid představuje jeden z nejlépe prozkoumaných eukaryotních plasmidů. Je znám především svou vysokou stabilitou, schopností autonomní replikace a téměř přesnou segregací do dceřiných buněk. Virům podobné partikule jsou neinfekční dvouvláknové RNA mykoviry, které mohou hostitelským buňkám poskytovat konkurenční zvýhodnění prostřednictvím *killer* fenotypu. Virům podobné elementy představují lineární dvouvláknové DNA plasmidy vykazující některé virové charakteristiky. Podobně jako VLP mohou i tyto elementy poskytovat svému hostiteli konkurenční výhodu.

## Klíčová slova:

Extrachromozomální genetická informace, 2 micron plasmid, virům podobné partikule, VLP, virům podobné elementy, VLE, kvasinky, *killer* fenotyp

## Abstract

This bachelor's thesis examines the extrachromosomal genetic information found in yeasts cells, focusing on three main types of these elements – the nuclear 2 micron plasmid, cytoplasmic virus-like particles (VLPs) and cytoplasmic virus-like elements (VLEs). The nuclear 2 micron plasmid is one of the most well-characterized eukaryotic plasmids. It is especially known for its high stability, autonomous replication and nearly precise segregation into daughter cells. Virus-like particles are non-infectious double-stranded RNA mycoviruses that can provide their hosts with a competitive advantage through a killer phenotype. Virus-like elements are linear double-stranded DNA plasmids that exhibit certain viral characteristics. Like VLPs these VLEs may also provide their host with a competitive advantage.

## Key words:

Extrachromosomal genetic information, 2-micron plasmid, virus-like particles, VLP, virus-like elements, VLE, yeasts, killer phenotype

## Seznam použitých zkratek

Zkratka:	Význam:
bp	base pair
DNA	deoxyribonucleic acid
FRT	FLP recombination target
ITR	inverted terminal repeat
MAK geny	maintenance of killer genes
mRNA	messenger ribonucleic acid
ORF	open reading frame
ori	origin of replication
PaT	<i>Pichia acaciae</i> toxin
PiT	<i>Pichia inositovora</i> toxin
RAF1	REP Antagonizing Factor / Recombinase Activating Factor
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
SKI geny	superkiller genes
ssRNA	single-strand ribonucleic acid
SSB	single-stranded binding protein
STB	segregation and stability locus
TRF1	terminal region recognition factor 1
tRNA	transfer ribonucleic acid
VLEs	virus-like elements
VLPs	virus-like particles

<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2 KVASINKOVÝ 2 MICRON PLASMID.....</b>	<b>2</b>
2.1 GENETICKÁ ORGANIZACE 2 MICRON PLASMIDU.....	3
2.1.1 Replikační počátek.....	3
2.1.2 Dělicí lokus <i>STB</i> .....	4
2.1.3 <i>FRT</i> oblasti.....	4
2.1.4 <i>REP1</i> a <i>REP2</i> .....	4
2.1.5 <i>RAF1</i> .....	5
2.1.6 <i>FLP</i> .....	5
2.2 REPLIKACE PLASMIDU.....	6
2.2.1 <i>Theta</i> replikace.....	6
2.2.2 Replikace mechanismem valivé kružnice.....	7
2.3 SYSTÉM DĚLENÍ PLASMIDU.....	7
2.3.1 Model I.....	7
2.3.2 Model II.....	8
2.3.3 Hostitelské faktory využívané 2 micron plasmidem.....	8
2.3.3.1 Kohezin.....	9
2.3.3.2 Mikrotubuly.....	9
2.4 AMPLIFIKAČNÍ SYSTÉM.....	9
2.4.1 <i>Mechanismus amplifikace podle Futchera</i> .....	10
<b>3 NEINFEKČNÍ DSRNA VIRY.....</b>	<b>11</b>
3.1 DSRNA VIRY <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	11
3.1.1 Pomocný <i>L-A-dsRNA</i> virus.....	11
3.1.1.1 Replikace <i>L-A-dsRNA</i> viru.....	12
3.1.2 Satelitní <i>M-dsRNA</i> virus.....	13
3.1.2.1 Replikace <i>M-dsRNA</i> viru.....	15
<b>4 LINEÁRNÍ DSDNA PLASMIDY.....</b>	<b>17</b>
4.1 LINEÁRNÍ <i>pGKL</i> PLASMIDY.....	18
4.1.1 Plasmid <i>pGKL1</i> .....	19
4.1.2 Plasmid <i>pGKL2</i> .....	20
4.1.3 Replikace <i>pGKL</i> plasmidů.....	21
4.2 LINEÁRNÍ PLASMIDY <i>pPAC</i> .....	21
4.2.1 Plasmid <i>pPac1</i> .....	22
4.2.2 Plasmid <i>pPac2</i> .....	22
4.3 LINEÁRNÍ PLASMIDY <i>pPIN</i> .....	23
4.3.1 Plasmid <i>pPin1-3</i> .....	23
<b>5 ZÁVĚR.....</b>	<b>25</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>27</b>

# 1 Úvod

Genetická informace eukaryot je primárně uložena v jádře ve formě chromozomální DNA. U většiny eukaryot se však vyskytuje také extrachromozomální genetická informace, jejíž příkladem může být mitochondriální DNA nebo u rostlin také DNA plastidová. Další formu představují extrachromozomální genetické elementy, které se často nachází v cytoplazmě, ale mohou být přítomny také v jádře. U kvasinkových buněk se tyto elementy vyskytují například ve formě virům podobných partikulí, virům podobných elementů nebo jaderných plasmidů. Cílem této práce je vytvořit ucelený přehled těchto tří zmíněných extrachromozomálních elementů.

První kapitola je věnována cirkulárnímu 2 micron plasmidu vyskytujícímu se u kvasinkových kmenů rodu *Saccharomyces*. Tento plasmid, o délce zhruba 6,4 kb, se nachází v jádře hostitelské buňky a je považován za jeden z nejlépe prozkoumaných eukaryotních plasmidů. Kóduje čtyři funkční geny (REP1, REP2, FLP a RAF1) podílející se na jeho replikaci, udržení v hostiteli a segregaci do dceřiných buněk.

Druhá kapitola se zaměřuje na neinfekční virům podobné partikule (VLP), tedy dvouvláknové RNA mykoviry vyskytující se v cytoplazmě hostitelských kvasinek, zejména *Saccharomyces cerevisiae*. Konkrétně se jedná o pomocný L-A-dsRNA virus a satelitní M-dsRNA viry M1, M2 a M28. Přítomnost těchto elementů, poskytuje hostitelským buňkám konkurenční výhodu ve formě *killer* fenotypu.

Třetí kapitola se zabývá virům podobnými elementy (VLE), tedy lineárními dvouvláknovými DNA plasmidy vyskytujícími se v cytoplazmě kvasinkových buněk. Patří sem pGKL plasmidy u *Kluyveromyces lactis*, pPac plasmidy u *Pichia acaciae* a pPin plasmidy u *Pichia inositovora*. Tyto plasmidy vykazují určité podobnosti s viry infikujícími savčí buňky, mezi které patří například velmi kompaktní genom, schopnost autonomní replikace a transkripce nebo přítomnost terminálně vázaných proteinů. Podobně jako VLP mohou svým hostitelům poskytovat ochranu a jejich konkurenční zvýhodnění prostřednictvím *killer* fenotypu.

## 2 Kvasinkový 2 micron plasmid

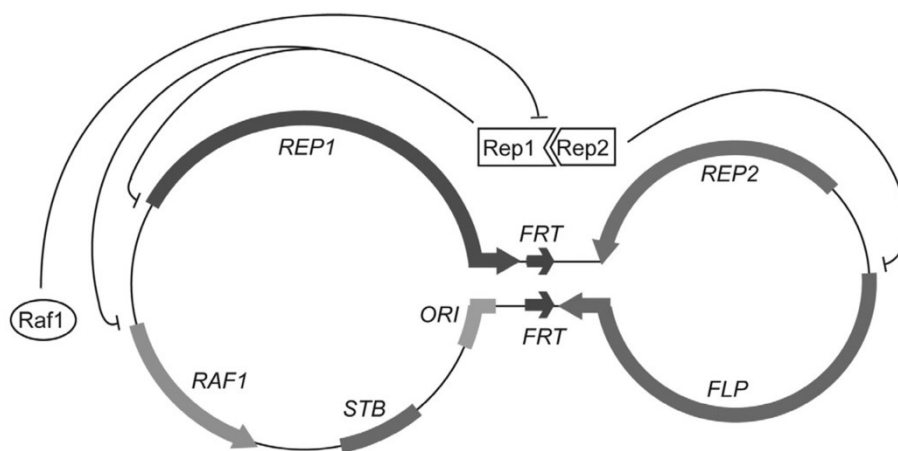
Kvasinkový 2 micron plasmid, poprvé pozorovaný na začátku 70. let 20. století (Stevens & Moustacchi, 1971), představuje kruhovou molekulu dvouvláknové DNA (z angl. *deoxyribonucleic acid*), jejíž jadernou extrachromozomální lokalizaci pozorujeme u některých kvasinkových kmenů rodu *Saccharomyces*, zejména u *Saccharomyces cerevisiae* (Tab. č. 1). Z hlediska velikosti obsahuje 6 094 bp (z angl. *base pair*) až 6 347 bp, což jej řadí mezi poměrně malé plasmidy. Tento mnohokopiový plasmid se v buňkách vyskytuje v přibližném počtu od 11 do 68 kopií v závislosti na vlastnostech konkrétního kmene a jeho růstových podmínkách (Strope et al., 2015). Přítomnost 2 micron plasmidu se pravděpodobně fenotypově neprojevuje a nepřináší tudíž hostitelské buňce žádné výhody (Futcher & Cox, 1983). Při zachování normálního kopiového čísla nemá negativní důsledky na životaschopnost kvasinek, což však neplatí v případě nadměrného počtu kopií, který způsobuje narušení buněčného cyklu a následně smrt buňky (Reynolds et al., 1987). Navzdory těmto okolnostem se jedná o velmi stabilní plasmid, jehož schopnost udržet se v hostitelské populaci je často přirovnávána ke stabilitě chromozomální DNA (Futcher & Cox, 1983). Stabilita je zprostředkována zejména plasmidovým systémem dělení a jeho amplifikačním systémem. Systém dělení zajišťuje rovnoměrné rozdělení nově zreplikovaných plasmidů do dceřiných buněk (Kikuchi, 1983). Amplifikační systém je poté zodpovědný za zvýšení počtu kopií plasmidu v případě, že systém dělení selže a požadovanou hodnotu počtu kopií nedokáže zajistit sám (Futcher, 1986). Zároveň také reguluje nadměrný počet kopií, který by vedl k narušení životaschopnosti kvasinkové buňky (Murray et al., 1987).

Druh	Počet testovaných kmenů	Počet kmenů s vyskytující se 2 $\mu$ plasmidem
<i>S. cerevisiae</i>	100	72
<i>S. paradoxus</i>	30	1
<i>S. uvarum</i>	58	13
<i>S. eubayanus</i>	2	1
<i>S. bayanus</i>	4	2

Tab. č. 1. Vybrané kvasinkové kmeny rodu *Saccharomyces* obsahující sekvence 2 micron plasmidu. (Převzato a upraveno z Strope et al., 2015).

## 2.1 Genetická organizace 2 micron plasmidu

Kompaktní plasmidový genom obsahuje čtyři regulační sekvence (ORI, STB a dvě FRT sekvence, viz dále) a čtyři otevřené čtecí rámce (z angl. *open reading frames*, ORF) kódující funkční geny (viz Obr. 1) (Hartley et al., 1980). Tyto geny plní funkce nezbytné pro replikaci plasmidu, jeho udržování v hostitelské buňce a přenos do dceřiných buněk. Jedná se o geny *REP1*, *REP2*, *RAF1* a *FLP*, které jsou transkribovány a následně translatovány do proteinů Rep1, Rep2, Raf1 a Flp (Rizvi et al., 2018). Kromě nich dále dochází k expresi několika dalších transkriptů o různé délce (700-2600 bp) s neznámými proteinovými produkty a funkcemi (Broach et al., 1979).



Obr. 1. Organizace genetické informace 2 micron plasmidu s regulačními sekvencemi ORI, STB a FRT & funkčními geny RAF1, FLP, REP1 a REP2. Obrázek dále znázorňuje molekulárně-regulační mechanismy zprostředkované proteinovými produkty těchto genů. (Převzato a upraveno z Chan et al., 2013).

### 2.1.1 Replikační počátek

Na plasmidu se nachází jeden replikační počátek zvaný *ori* (z angl. *origin of replication*), který z funkčního hlediska představuje obdobu kvasinkového chromozomálního replikačního počátku. Za normálních podmínek je aktivován pouze jednou během buněčného cyklu, což vede k jediné replikaci každé molekuly plasmidu za využití hostitelského replikačního aparátu (Zakian et al., 1979). Replikované plasmidy jsou následně rovnoměrně rozděleny mezi mateřskou a dceřinou buňku (Murray & Szostak, 1983).

### 2.1.2 Dělicí lokus STB

Dělicí lokus označovaný jako STB sekvence (z angl. *stability locus*) hraje klíčovou roli v dělení plasmidů a jejich segregaci do dceřiných buněk. Tato sekvence bývá ve starších publikacích často označována jako REP3 (viz Jayaram et al., 1985). Bylo zjištěno, že se STB lokusy mezi různými kmeny kvasinek mohou sekvenčně lišit, avšak z funkčního hlediska zůstávají zaměnitelné (Rank et al., 1994).

Ze strukturního hlediska lze STB sekvenci rozdělit, s ohledem na vzdálenosti vůči počátku replikace, na oblast proximální a distální (viz Obr. 2). Proximální oblast STB je složena z konsenzus elementu o délce 62 bp, který je uspořádaný v tandemu pětkrát za sebou (Murray & Cesareni, 1986). Spolu s Rep1 a Rep2 proteiny tvoří nezbytnou součást systému dělení plasmidů (Jayaram et al., 1983). Distální oblast STB obsahuje transkripční terminátory a *silencing* element, jejichž působením je zamezena transkripce v proximální oblasti STB, která může způsobit narušení funkce STB sekvence a tím ji udržuje aktivní (Murray & Cesareni, 1986).



Obr. 2. Grafické znázornění STB sekvence skládající se z proximální a distální oblasti, dále je znázorněna regulační sekvence ORI, funkční gen *RAF1*, restriční místa *Pst I*, *Hpa I* a *Ava I*. (Převzato a upraveno z Chan et al., 2013).

### 2.1.3 FRT oblasti

Na plasmidu se nachází dvě repetitivní FRT sekvence (z angl. *FLP recombination target*) (Hartley & Donelson, 1980). Tyto sekvence hrají klíčovou roli v rekombinačním procesu plasmidu, který je zprostředkován plasmidem kódovanou Flp rekombinázou (Senecoff et al., 1985). Rekombinace mezi FRT sekvencemi umožňuje amplifikaci plasmidu a je tedy nezbytnou součástí amplifikačního systému (viz kapitola 1.4) (Volkert & Broach, 1986).

### 2.1.4 REP1 a REP2

Produkty genů REP1 a REP2 jsou proteiny Rep1 a Rep2 souhrnně označované jako Rep proteiny. Bylo zjištěno, že Rep proteiny v jádře hostitelské buňky vytvářejí homo a heterokomplexy poblíž shluků 2 micron plasmidů (Scott-Drew et al., 1998).

Rep1 a Rep2 spolu s STB sekvencí tvoří systém dělení plasmidu a zodpovídají za rovnoměrné rozdělení plasmidů mezi mateřskou a dceřinou buňkou (Kikuchi, 1983). Experimentální výsledky naznačují, že pravděpodobně zajišťují fyzické připojení plasmidů na chromozomy, které tvoří základ pro rovnoměrné rozdělení plasmidů během segregace hostitelských chromozomů v rámci buněčného dělení (Sengupta et al., 2001).

Rep1-Rep2 komplexy zároveň fungují jako regulátory exprese plasmidových genů (viz Obr. 1), čímž se významně podílí také na regulaci kopiového čísla 2 micron plasmidů. Jejich účinek spočívá v represivním působení vůči genům FLP, RAF1 a REP1. Naopak gen REP2 je exprimován stabilně v konstantní hladině (Som et al., 1988). Vysoké hladiny Rep1–Rep2 represoru vedou ke snížení exprese genů FLP a RAF1, které jsou klíčové pro amplifikační systém 2 micron plasmidů (Murray et al., 1987). Nicméně bylo zjištěno, že dochází i k negativní regulaci exprese samotného REP1 genu, což představuje protektivní zpětnovazebnou smyčku zabraňující úplnému zastavení amplifikace (Som et al., 1988); Reynolds et al., 1987). Nízké hladiny Rep1 proteinu a potažmo Rep1-Rep2 represoru následně umožní opětovnou expresi FLP a RAF1 genů. Tato dynamická genetická regulace představuje kombinaci možnosti rychlé amplifikace plasmidů a ochrany hostitelské buňky před nadměrným zvyšováním kopiového čísla (Murray et al., 1987).

### 2.1.5 RAF1

Protein Raf1 (z angl. *REP Antagonizing Factor* nebo *Recombinase Activating Factor*) funguje jako antagonist repesoru Rep1-Rep2. Transkripce genu RAF1 je negativně regulována komplexem Rep1-Rep2. Naopak proteinový produkt Raf1 zmírňuje represivní účinky Rep proteinů na expresi genu FLP a podporuje tak amplifikační systém (viz kapitola 1.4) (Murray et al., 1987).

### 2.1.6 FLP

Produktem genu FLP je Flp rekombináza, která zprostředkovává místně-specifickou rekombinaci nezbytnou pro amplifikaci plasmidu. Expresi tohoto genu zesiluje protein Raf1 snížením represivních účinků Rep proteinů. Jakmile dojde ke zvýšení kopiového čísla plasmidu na normální hladinu, exprese genu FLP je inhibována proteinovým komplexem Rep1-Rep2, čímž je zabráněno další amplifikaci plasmidu (Murray et al., 1987).

## 2.2 Replikace plasmidu

K semikonzervativní replikaci 2 micron plasmidu může docházet mechanismem theta replikace nebo mechanismem valivé kružnice (angl. *rolling circle replication*) (Rizvi et al., 2017). Replikace plasmidu je nezávislá na replikaci chromozomální DNA hostitele, avšak plasmid využívá hostitelský replikační aparát a řadu hostitelských faktorů, včetně proteinů interagujících s mikrotubuly, které jsou nezbytné pro rovnoměrnou segregaci plasmidu do dceřiných buněk (Prajapati et al., 2017).

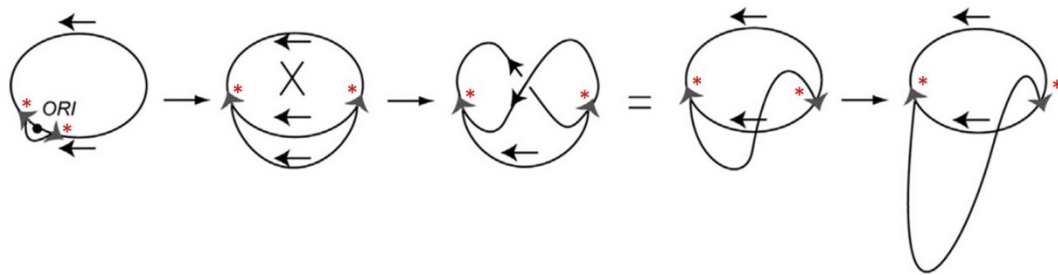
K theta replikaci dochází za standardních podmínek. Jedná se o obdobu dělení chromozomů (Zakian et al., 1979), kdy replikace probíhá obousměrně v důsledku putování dvou replikačních vidliček směrem od sebe na opačnou stranu. Při tomto způsobu replikace nedochází k žádnému štěpení ani zlomům plasmidové DNA (Lilly & Camps, 2015). Replikace mechanismem valivé kružnice probíhá v případě, kdy je potřeba zvýšit kopiové číslo plasmidu. Tento způsob replikace probíhá jednosměrně a je indukován rekombinací mezi FRT oblastmi plasmidu, která je zprostředkována FIP rekombinázou (viz dále) (Volkert & Broach, 1986).

Za standardních podmínek je replikační počátek 2 micron plasmidu aktivován pouze jednou během buněčného cyklu, čímž je zabráněno nárůstu počtu kopií plasmidu na úroveň, která by byla pro hostitele letální (Zakian et al., 1979).

### 2.2.1 Theta replikace

K iniciaci replikace pomocí theta mechanismu dochází v oblasti replikačního počátku (*ori*). Po zahájení replikace se replikační vidličky pohybují obousměrně od *ori* na opačné strany. Během tohoto procesu jsou zároveň syntetizována obě vlákna DNA, přičemž k syntéze dochází do chvíle, dokud nedojde ke střetu replikačních vidliček, čímž je replikace ukončena. Tímto způsobem dojde ke vzniku dvou identických kopií plasmidu (Lilly & Camps, 2015).

Jedna ze dvou invertovaných repetitivních sekvencí FRT (z angl. *FLP recombination target*) je replikována dříve, což vede k přítomnosti tří sekvencí FRT na jednom plasmidu. Právě v tomto okamžiku může dojít k rekombinaci (viz Obr. 3), kterou zprostředkuje místně specifická Flp rekombináza, mezi jednou z již zreplikovaných sekvencí FRT a sekvencí FRT, která zatím nebyla zreplikována. Tato rekombinace hraje klíčovou roli v amplifikaci plasmidu, jelikož může vést k přechodu na replikaci mechanismem valivé kružnice (Futcher, 1986).



Obr. 3. Znárodnění rekombinace mezi FRT sekvencemi plasmidu, která způsobí přechod replikace na mechanismus pomocí valivé kružnice. Druhá rekombinace mezi FRT sekvencemi vede k zastavení replikace. Výsledkem tohoto mechanismu je amplifikace plasmidu. Šipky označené hvězdičkou znázorňují směr replikace. Ostatní šipky představují FRT sekvence a směr jejich orientace (Převzato a upraveno z Chan et al., 2013).

### 2.2.2 Replikace mechanismem valivé kružnice

K replikaci mechanismem valivé kružnice u 2 micron plasmidu dochází v případě, kdy je potřeba zvýšit počet jeho kopií v hostitelské buňce. Zvýšení počtu kopií je zajištěno amplifikačním systémem (Futcher, 1986). Z obecného hlediska se jedná o mechanismus replikace, při kterém dochází k naštěpení jednoho z vláken kruhové dvouřetězcové DNA. K syntéze nového vlákna dochází kontinuálně pomocí hostitelské DNA polymerázy, zatímco původní vlákno je postupně vytěšňováno. Posléze je vytěšněné vlákno použito jako templát pro dosyntetizování komplementárního vlákna (Ruiz-Masó et al., 2015).

### 2.3 Systém dělení plasmidu

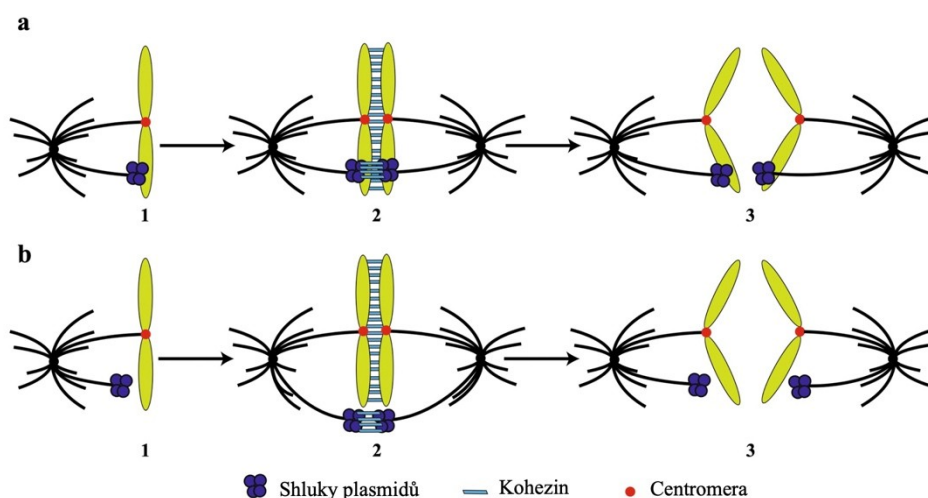
Systém dělení 2 micron plasmidu se skládá z proteinů Rep1, Rep2 a dělicího STB lokusu, který je zodpovědný za samotné rozdělení nově zreplikovaných plasmidů mezi dceřiné buňky (Kikuchi, 1983). Segregace plasmidu je zajištěna interakcí Rep-STB proteinů spolu s kohezinem, který je nezbytný pro vzájemné propojení zreplikovaných plasmidů (Ghosh et al., 2009; Jayaram et al., 1983). Přesný mechanismus dělení plasmidu není stále zcela objasněn, avšak existují dva teoretické modely popisující tento proces (viz dále) (Mehta et al., 2002).

### 2.3.1 Model I

Podle prvního modelu jsou shluky plasmidů přichyceny na chromozomech kvasinkové buňky. Rep proteiny zajišťují preferovanou vazbu kohezinu do oblasti STB sekvence, přičemž plasmidy jsou pomocí kohezinu propojeny podobně jako sesterské chromatidy hostitelské buňky. Při rozchodu sesterských chromatid je kohezin mezi chromatidami i plasmidy rozštěpen a plasmidy přichycené na chromatidách spolu s nimi následně segregují do dceřiných buněk (viz Obr. 4a) (Mehta et al., 2002).

### 2.3.2 Model II

Druhý model předpokládá, že nově zreplikované plasmidy jsou také propojeny pomocí kohezinu, ovšem na rozdíl od prvního modelu nejsou přichyceny na chromozomech kvasinkové buňky. Po rozštěpení kohezinu shluky plasmidů migrují k opačným pólům buňky, přičemž molekulární mechanismus tohoto pohybu zůstává stále neobjasněn (viz Obr. 4b) (Mehta et al., 2002).



Obr. 4. Znárodnění mechanismu segregace plasmidů pomocí Modelu I a Modelu II. a) Model I předpokládá přichycení plasmidů na hostitelské chromozomy a jejich segregaci spolu s chromatidami během buněčného dělení. b) Model II naopak přichycení plasmidů na chromozomy nepředpokládá, plasmidy po rozštěpení kohezinu migrují k opačným pólům. (Převzato a upraveno z Rizvi et al., 2017)

### 2.3.3 Hostitelské faktory využívané 2 micron plasmidem

Mezi hostitelské faktory kvasinkové buňky, které se podílejí na dělení plasmidu, patří například kohezinový komplex (Mehta et al., 2002), mikrotubuly (Mehta et al., 2005), faktory Bik1 a Bim1 (Prajapati et al., 2017), motorový protein Kip1 (Cui et al., 2009) a remodelační komplex RSC (Wong et al., 2002).

#### 2.3.3.1 Kohezin

Mezi hostitelské faktory, které se podílí na rovnoměrném rozdělení 2 micron plasmidů do dceřiných buněk patří mimo jiné i kohezinový komplex. Tento komplex, který běžně zajišťuje propojení sesterských chromatid, je zde cíleně naváděn pomocí Rep1 a Rep2 proteinů do oblasti plasmidové STB sekvence, kde propojuje nově zreplikované kopie plasmidů. K vazbě kohezinu do oblasti STB sekvence dochází v průběhu S fáze buněčného cyklu hostitelské kvasinky (Mehta et al., 2002).

#### 2.3.3.2 Mikrotubuly

Mikrotubuly a s nimi spojené proteiny hrají klíčovou roli v rozdělení nově zreplikovaných plasmidů do dceřiných buněk. Při absenci mikrotubulů dochází k narušení soudržnosti shluků plasmidů a ke změnám jejich správné lokalizace v rámci buňky. Právě lokalizace plasmidů v blízkosti pólů je důležitá pro navádění dalších hostitelských faktorů nezbytných pro rovnoměrné rozdělení plasmidů (Mehta et al., 2005).

Mezi hostitelské faktory, kterým mikrotubulární systém umožňuje napojení do oblasti STB sekvence, patří již dříve zmiňovaný kohezin a dále také faktory Bik1 a Bim1. Tyto proteiny jsou potřebné pro stabilizaci mikrotubulů a také pravděpodobně slouží jako adaptérové proteiny zajišťující propojení mezi mikrotubuly a plasmidy. Bylo zjištěno, že absence těchto proteinů vede k nerovnoměrné segregaci plasmidů (Prajapati et al., 2017). Dalším proteinem asociovaným s mikrotubuly je motorový protein Kip1, který umožňuje dosažení správné lokalizace plasmidů v rámci procesu dělení plasmidů. K vazbě Kip1 do oblasti STB sekvence dochází za účasti Rep1 a Rep2 proteinů (Cui et al., 2009).

## 2.4 Amplifikační systém

Amplifikační systém 2 micron plasmidu zajišťuje udržení stabilní hladiny kopiového čísla. V případě, že dojde k poměrně vzácné nerovnoměrné segregaci 2 micron plasmidu do dceřiných buněk během buněčného dělení, může být spuštěna amplifikace pomocí mechanismu

valivé kružnice, která obnoví počet kopií na normální hladinu. Předpokládá se, že amplifikační proces neprobíhá současně u všech plasmidů přítomných v buňce, ale pouze u části, zatímco ostatní plasmidy jsou replikovány standardním mechanismem pomocí theta replikace. Jakmile je dosaženo stabilní hladiny kopiového čísla 2 micron plasmidu, je amplifikace zastavena (Futcher, 1986).

Obecně uznávaným modelem amplifikace je Futcherův model z 80. let 20. století. Tento model popisuje rekombinaci mezi dvěma FRT sekvencemi, při níž dochází k přechodu z theta replikace na replikaci mechanismem valivé kružnice (Futcher, 1986). Amplifikace je umožněna aktivitou plasmidem kódované Flp rekombinázy, která katalyzuje rekombinační proces (Sadowski, 1995).

#### 2.4.1 Mechanismus amplifikace podle Futchera

Podle Futcherova modelu dojde pomocí Flp rekombinázy k inverzi jedné ze dvou obousměrných replikačních vidliček vůči druhé replikační vidličce, což vede k jejich stejnosměrné orientaci. Tato stejnosměrná orientace zabráňuje setkání replikačních vidliček, které by vedlo k ukončení replikace. Tímto způsobem vzniká mnohokopiový plasmid, dokud nedojde k druhé Flp rekombinázou zprostředkované rekombinaci, která opět invertuje jednu z replikačních vidliček a umožní zastavení replikace. Vzniklý konkatemer plasmidu je později rozštěpen na jednotlivé jednokopiové plasmidy (viz Obr. 3) (Futcher, 1986; Petes & Williamson, 1994).

### 3 Neinfekční dsRNA viry

Mezi další extrachromozomální genetické elementy kvasinek patří neinfekční dsRNA viry. Genetická informace těchto virů je tvořena dvouvláknovou RNA (z angl. *ribonucleic acid*). Tyto viry se vyskytují v cytoplazmě hostitelských kvasinek, zejména *Saccharomyces cerevisiae*, ve formě virům podobných partikulí (z angl. *virus-like particles*, VLPs), kde je jejich genom obklopen proteinovou kapsidou. Jsou označovány jako neinfekční, protože nedochází k jejich extracelulárnímu přenosu. Šíření těchto virů probíhá pouze vertikálně nebo prostřednictvím indukované fúze kvasinkových buněk (Wickner, 1996).

Mezi neinfekční dsRNA viry vyskytující se u *Saccharomyces cerevisiae* patří pomocný L-A-dsRNA virus, který kóduje proteiny nezbytné pro vlastní replikaci a tvorbu kapsidy. K nim přidružené satelitní M-dsRNA viry poté kódují killer fenotyp a zároveň využívají L-A-dsRNA viry ke své replikaci a enkapsidaci. Další skupinu pak tvoří L-BC-dsRNA viry (Field et al., 1982).

#### 3.1 dsRNA viry *Saccharomyces cerevisiae*

##### 3.1.1 Pomocný L-A-dsRNA virus

L-A-dsRNA viry patří do rodu *Totivirus*, čeledi *Totiviridae*, které zahrnují mykoviry s genomem tvořeným dvouvláknovou RNA. Patří mezi neinfekční VLP, které se vyskytují v cytoplazmě hostitele a přenášejí se především vertikálně při buněčném dělení z mateřské buňky do dceřiné. Další možnost přenosu je prostřednictvím tzv. „*heterokaryon formation*“, kdy dochází ke splynutí dvou kvasinkových buněk. Samotná přítomnost L-A-dsRNA VLP bez souběžného výskytu satelitních M-dsRNA VLP se u hostitelských kvasinek fenotypově nijak neprojevuje ani buňce nezpůsobuje žádné konkurenční znevýhodnění (Wickner, 1996). Virová částice má ikosahedrální tvar a je tvořena obalovým proteinem *Gag*, který je kódován virovým genomem (Cheng et al., 1994).

L-A-dsRNA viry mají nesegmentovaný genom o velikosti 4,6 kb. Jejich (+) ssRNA vlákno obsahuje dva otevřené čtecí rámce (ORF), které se překrývají o 130 nukleotidů. ORF1 kóduje hlavní obalový protein *Gag*, z kterého je složena virová kapsida, zatímco ORF2 kóduje protein *Pol* exprimovaný jako fúzní protein *Gag-Pol* s funkcí RNA-dependentní RNA polymerázy. Tato RNA polymeráza je exprimována v podobě fúzního proteinu vznikajícího

spojením výše uvedených otevřených čtecích rámců. K fúzi dochází pomocí ribozomálního posunu čtecího rámce o jeden nukleotid (-1) (angl. *ribosomal frameshift*) (Icho et al., 1989).

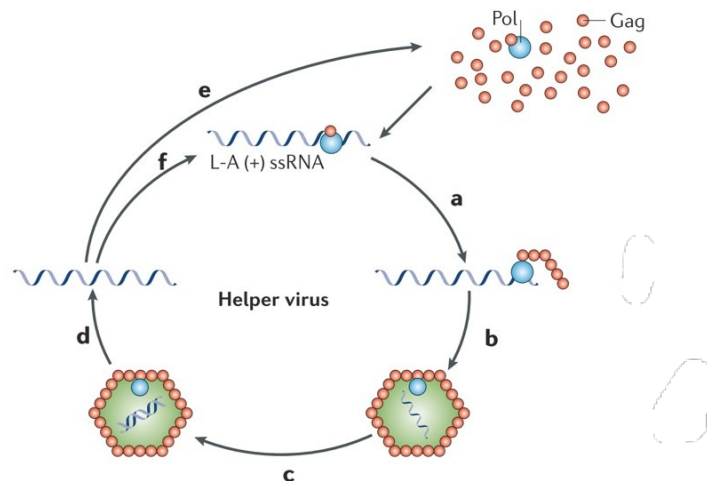
Ačkoliv jsou L-A-dsRNA VLP do jisté míry samostatné díky kódování vlastních proteinů, využívají také řadu chromozomálně kódovaných hostitelských faktorů. Tyto hostitelské geny lze rozdělit do dvou hlavních skupin: *MAK* geny (z angl. *maintenance of killer genes*) a *SKI* geny (z angl. *superkiller genes*) (Ball et al., 1984). Role *MAK* genů zahrnuje zejména úpravu Gag proteinů pro správné složení virové kapsidy, stabilizaci virionů a také jejich propagaci (Tercero et al., 1993). Naprosto odlišná je poté předpokládaná úloha *SKI* genů, která spočívá v regulaci translace a regulaci stability a degradace virové mRNA (z angl. *messenger RNA*). Mutace *SKI* genů vede k dramatickému zvýšení produkce a sekrece toxinu a rozvoji takzvaného „*superkiller*“ fenotypu (Widner et al. 1993). *MAK* a *SKI* geny jsou důležité také pro M-dsRNA, které dále využívají i hostitelské Kex proteázy nezbytné pro posttranslační úpravy virového *killer* preprotoxinu (Bussey et al., 1983).

Kvasinky obsahující pouze L-A-dsRNA viry jsou citlivé na toxiny produkované jinými kvasinkami, protože samy toxin ani imunitu vůči němu nekódují. Naopak kvasinky, které kromě L-A-dsRNA obsahují i satelitní M-dsRNA viry, produkují toxiny, které inhibují růst senzitivních kvasinkových kmenů (Schmitt et al., 2002).

### 3.1.1.1 Replikace L-A-dsRNA viru

K replikaci L-A-dsRNA viru dochází nezávisle na replikaci hostitelské buňky. Jedná se o replikaci konzervativní, při níž dochází k transkripci (+) ssRNA vlákna (z angl. *single strand ribonucleic acid*), které je uvolněno z kapsidy do cytoplazmy hostitele. Tato (+) ssRNA následně plní dvě funkce. Jednak může sloužit jako mRNA templát pro translaci virových proteinů. Druhý možný scénář pak představuje enkapsidaci (+) ssRNA vlákna a vznik nové virové částice. Uvnitř takto vzniklé virové částice dochází k dosyntetizování komplementárního (-) ssRNA vlákna za využití virem kódované RNA-dependentní RNA polymerázy. Tímto způsobem je generován kompletní virový genom a potažmo také maturovaná virová partikule (viz Obr. 5) (Schmitt et al., 2006).





Obr. 5. Grafické znázornění životního cyklu L-A-dsRNA viru (helper virus). Schéma znázorňuje (a) enkapsidaci (+)ssRNA genomu, (b) sestavení virové kapsidy, (c) dosyntetizování komplementárního vlákna a vznik dsRNA, (d) syntézu (+)ssRNA vlákna, (e) translaci virového transkriptu a vznik proteinů Gag a Gag-Pol a (f) navázání polymerázy na ssRNA vlákno. (Převzato a upraveno z Schmitt et al., 2006).

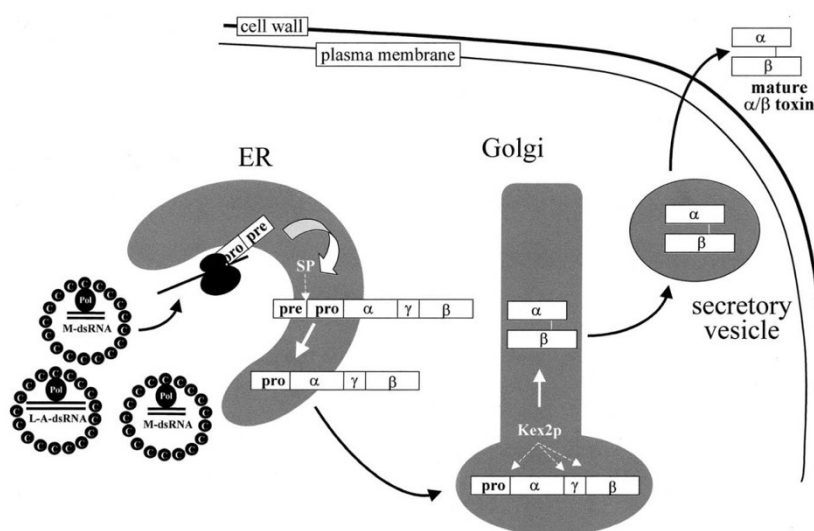
### 3.1.2 Satelitní M-dsRNA virus

U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo identifikováno několik druhů satelitních M-dsRNA virů – M1, M2 a M28 (s velikostí genomu přibližně 1,6 kb, 1,5 kb a 1,8 kb). Každý z těchto virů kóduje odlišný toxin, který inhibuje růst senzitivních buněk (viz Tab. č. 2) (Schmitt et al., 2006). Satelitní viry zároveň zajišťují imunitu vůči toxinu, který samy produkují, což jejich hostitelským kvasinkám poskytuje konkurenční výhodu (Breinig et al., 2006).

Virus	Funkce viru	Velikost dsRNA genomu (kb)	Proteiny kódované virem	Reference
L-A-dsRNA	Pomocný virus	4,6	Gag, Gag-Pol	(Icho et al., 1989)
M1-dsRNA	Satelitní virus	1,6	K1 preprotoxin	(Hanes et al., 1986)
M2-dsRNA	Satelitní virus	1,5	K2 preprotoxin	(Dignard et al., 1991)
M28-dsRNA	Satelitní virus	1,8	K28 preprotoxin	(Schmitt et al., 1995)

Tabulka č. 2. Tabulka neinfekčních dsRNA virů kvasinkových kmenů *Saccharomyces cerevisiae*. (Převzato a upraveno z Schmitt et al., 2006).

Genetická informace satelitních M-dsRNA virů je tvořena dsRNA a obsahuje pouze jeden otevřený čtecí rámec, který kóduje gen pro preprotoxin skládající se z pre-sekvence, pro-sekvence a tří toxinových podjednotek. Pomocí posttranslačních úprav dochází k přeměně prekurzorového preprotoxinu na funkční toxin (viz Obr. 6) (Skipper et al., 1984). Na začátku tohoto procesu je preprotoxin obsahující signální N-terminální pre-sekvenci transportován do lumen endoplazmatického retikula, kde dochází k odštěpení signální pre-sekvence. Zároveň dochází k N-glykosylaci gama podjednotky, která od sebe odděluje alfa a beta podjednotku. Posléze dochází k tvorbě jedné nebo více disulfidických vazeb mezi alfa a beta podjednotkami. Následně je v Golgiho aparátu za účasti hostitelských Kex proteáz odstraněna pro-sekvence a N-glykosylovaná gama podjednotka, což vede k vytvoření maturovaného toxinu. Tento maturovaný toxin je následně sekretován z buňky pomocí sekretorických váčků (Bostian et al., 1984).



Obr. 6. Mechanismus zpracování preprotoxinu ve funkční toxin. Gen pro preprotoxin je transkribován z genomu M-dsRNA viru a v cytoplazmě hostitelské buňky translatován v preprotoxin. Preprotoxin je přenesen do endoplazmatického retikula (ER), kde je odstraněna signální sekvence a N-glykosylována gama podjednotka. Následně je protoxin transportován do Golgiho aparátu, kde dochází k odštěpení prosekvence a N-glykosylované gama podjednotky pomocí hostitelem kódované proteázy. Maturovaný toxin je poté zabalen do sekrečních váčků a vylučován ven z hostitelské buňky. (Převzato a upraveno z Schmitt et al., 2002).

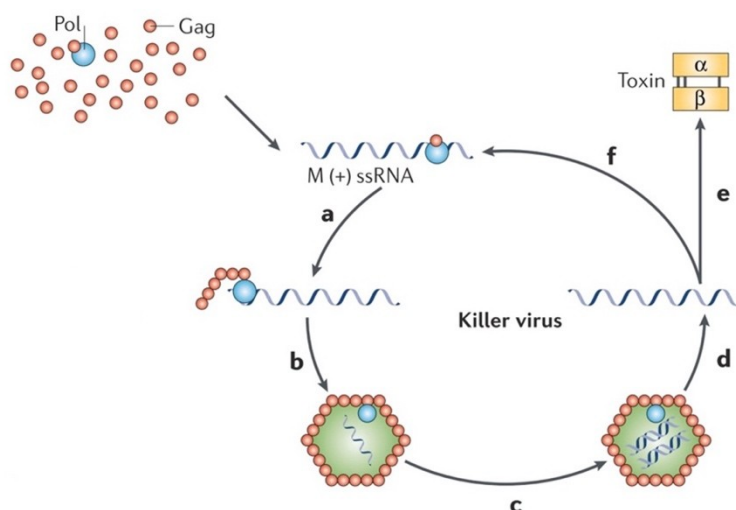
Toxiny interagují s receptory v buněčné stěně senzitivních kvasinek. Vazba toxinu na primární receptor v buněčné stěně je následována interakcí s druhým receptorem v cytoplazmatické membráně. U satelitních virů M1 a M2, produkujících toxiny K1 a K2, bylo zjištěno, že jako primární receptor slouží  $\beta$ -1-6-D-glucan (Hutchins et al., 1983). Toxin K28, produkovaný virem M28, se váže na receptor  $\alpha$ -1,3-mannoprotein buněčné stěny kvasinek (Schmitt et al., 1988).

Mechanismus účinku se v případě toxinu K28 a toxinů K1 a K2 značně liší. Nízké dávky *killer* toxinu K28 indukují u citlivých buněk apoptózu vyvolanou zejména hromaděním reaktivních kyslíkových forem (z angl. *reactive oxygen species*, ROS), která je zprostředkována kvasinkovou kaspázou Yca1p. Vyšší koncentrace toxinu K28 poté vede k zastavení buněčného cyklu a nekróze buňky (Reiter et al., 2005). Letální efekt působení K1 a K2 toxinů spočívá ve vytvoření pórů v cytoplazmatické membráně a následnému úniku iontů a metabolitů, který vede k destabilizaci kvasinkové buňky (Ahmed et al., 1999; Orentaite et al., 2016).

### 3.1.2.1 Replikace M-dsRNA viru

K replikaci satelitních M-dsRNA virů dochází velmi podobným způsobem jako v případě replikace pomocných L-A-dsRNA virů (viz Obr. 7). Satelitní viry však nekódují vlastní obalové proteiny ani RNA polymerázu, ale místo toho využívají obalových proteinů a RNA polymerázy kódovaných L-A-dsRNA viry. Od L-A-dsRNA virů se liší také tím, že jedna virová částice může obsahovat až dvě kopie genomu M-dsRNA viru (Esteban et al., 1986).





Obr. 7. Grafické znázornění životního cyklu M-dsRNA (killer virus). Schéma znázorňuje (a) enkapsidaci virového genomu pomocí Gag obalových proteinů syntetizovaných L-A-dsRNA virem, (b) dokončení sestavení kapsidy, (c) syntézu komplementárního vlákna a vznik dvouvláknového RNA genomu, (d) uvolnění genomového transkriptu, který slouží jako mRNA pro translaci virového preprotoxinu, (e) posttranslační zpracování preprotoxinu ve funkční toxin, (f) nasednutí Gag-Pol RNA polymerázy kódované pomocným L-A-dsRNA virem. (Převzato a upraveno z Schmitt et al., 2006).

## 4 Lineární dsDNA plasmidy

Mezi lineární plasmidy kvasinek, jejichž genetická informace je tvořena dvouvláknovou DNA, patří plasmidy vyskytující se u několika kvasinkových druhů. Tyto plasmidy se nacházejí v cytoplazmě hostitelské buňky (Gunge et al., 1981) a jsou označovány jako virům podobné elementy (z angl. *virus-like elements*, VLEs). Označení vychází z určitých podobností těchto plasmidů s některými viry, např. poxviry, adenoviry či bakteriofágy, například schopnosti autonomní replikace, kódování vlastních polymeráz a přítomností navázaných terminálních proteinů na 5' koncích DNA (Stillman, 1983; Dufour et al., 2003; Sýkora et al., 2018).

VLE lze rozdělit na plasmidy autonomní a neautonomní. Autonomní plasmidy kódují geny nezbytné pro svou replikaci a transkripci. Naproti tomu neautonomní plasmidy jsou závislé na přítomnosti autonomního plasmidu, přičemž samy kódují geny pro tzv. *killer* toxin spolu s geny zajišťujícími imunitu hostitele vůči tomuto toxinu (Gunge & Yamane, 1984; Klassen & Meinhardt, 2003; Paluszynski et al., 2007). *Killer* fenotyp byl dosud identifikován pouze u některých VLE - *Kluyveromyces lactis* (toxin kódovaný plasmidem pGKL1), *Pichia inositovora* (pPin1-3), *Pichia acaciae* (pPac1-2) a *Debaryomyces robertsiae* (pWR1A, synonymum *Wingea robertsiae*) (viz Tab. č. 3) (Satwika et al., 2012).

V této práci budou popsány pGKL plasmidy u *Kluyveromyces lactis*, pPac plasmidy u *Pichia acaciae* a pPin plasmidy u *Pichia inositovora*.

Kvasinkový druh	dsDNA plasmidy	Velikost (kb)	Kódovaný toxin	Reference
<i>Kluyveromyces lactis</i>	pGKL1	8,9	zymocin	(Gunge et al., 1981) (Stark et al., 1986)
	pGKL2	13,4		(Gunge et al., 1981)
<i>Pichia acaciae</i>	pPac1	13,6		(Worsham & Bolen, 1990)
	pPac2	7,3	PaT	(Worsham & Bolen, 1990) (Jeske & Meinhardt, 2006)
<i>Pichia inositovora</i>	pPin1-1	18		(Ligon et al., 1989)
	pPin1-2	13		(Ligon et al., 1989)
	pPin1-3	10	PiT	(Kast et al., 2014)
<i>Debaryomyces robertsiae</i>	pWR1A	8,3	DrT	(Cong et al., 1994) (Klassen et al., 2014)
	pWR1B	14,6		(Cong et al., 1994)

Tabulka č. 3. Tabulka kvasinkových druhů s killer fenotypem, jejich dsDNA plasmidy, velikosti těchto plasmidů a plasmidy kódovanými toxiny. (Převzato a upraveno z Satwika et al., 2012)

#### 4.1 Lineární pGKL plasmidy

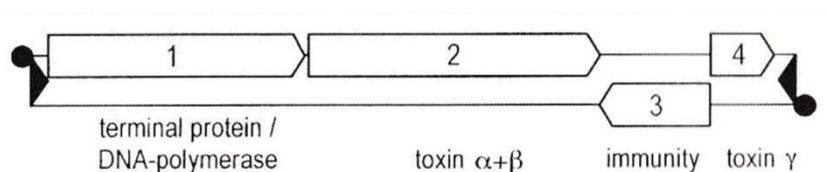
V cytoplazmě *killer* kmenů kvasinek *Kluyveromyces lactis* se vyskytují dva typy lineárních plasmidů, a to v počtu zhruba 50-100 kopií na buňku. Jedná se o plasmid pGKL1 o velikosti 8,9 kb a plasmid pGKL2 o velikosti 13,4 kb, přičemž oba plasmidy vykazují cytoplazmatickou dědičnost (Gunge, 1983). Mezi charakteristické znaky pGKL plasmidů patří přítomnost invertovaných terminálních repetitiv (z angl. *inverted terminal repeat*, ITR), vysoké zastoupení adeninových a thyminových bází a kovalentně vázané terminální proteiny na 5' koncích, které slouží jako primery pro plasmidem kódovanou DNA polymerázu během replikačního procesu (Jung et al., 1987).

Autonomní pGKL2 slouží jako „pomocný“ plasmid, jelikož zajišťuje svou vlastní replikaci a expresi genetické informace, stejně jako expresi genů neautonomního plasmidu

pGKL1 (Heneghan et al., 2025). Plasmid pGKL1 kóduje geny pro *killer* toxin a jeho přítomnost je nezbytná pro projev *killer* fenotypu (Gunge et al., 1981). Toxin se nazývá zymocin (někdy také označován jako gama toxin) a jedná se o heterotrimerní protein skládající se z alfa, beta a gama podjednotky o celkové molekulové hmotnosti zhruba 160 kDa (viz dále) (Stark et al., 1986).

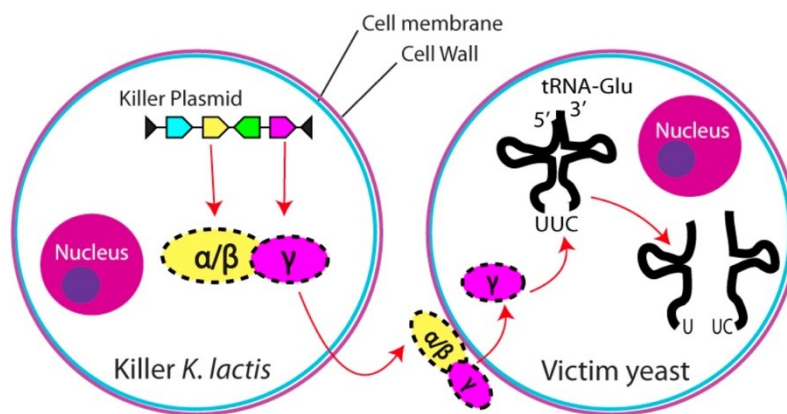
#### 4.1.1 Plasmid pGKL1

Genetická informace plasmidu pGKL1 je tvořena čtyřmi otevřenými čtecími rámci (viz Obr. 8), z nichž většina souvisí s *killer* fenotypem. ORF1 kóduje gen pro pGKL1 specifickou DNA polymerázu a terminální protein. ORF2 kóduje gen pro alfa a beta podjednotku toxinu zymocinu, zatímco ORF4 kóduje gama podjednotku. Alfa a beta podjednotky jsou posttranslačně upravovány za účasti hostitelských Kex proteáz (Stark et al., 1986). ORF3 kóduje protein poskytující hostitelské buňce imunitu vůči působení toxinu (Tokunaga et al., 1987).



Obr. 8. Znárodnění genetické organizace pGKL1 plasmidu. Na plasmidu se nachází čtyři otevřené čtecí rámce (znázorněné šipkami, které odpovídají směru transkripce) nesoucí geny pro terminální protein / DNA polymerázu, podjednotky toxinu a gen zajišťující imunitu vůči toxinu. Černá kolečka na koncích znázorňují terminální proteiny a černé šipky terminální invertované repetice. (Převzato a upraveno z Meinhardt & Schaffrath, 2001).

Zymocin se ve formě holotoxinu váže na chitinové receptory v buněčné stěně senzitivních kvasinkových buněk (viz Obr. 9), přičemž prvotní interakce s receptorem je zprostředkována alfa podjednotkou toxinu, která vykazuje chitinázovou aktivitu (Butler, et al., 1991). Beta podjednotka se poté účastní membránového transportu toxické gama podjednotky, která vstupuje do hostitelské buňky, kde štěpí tRNA (z angl. *transfer ribonucleic acid*) s modifikovaným nukleosidem 5- methoxykarbonylmethyl-2-thiouridinem (mcm5s2U), čímž dochází k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (Butler et al., 1991; Lu et al., 2005).

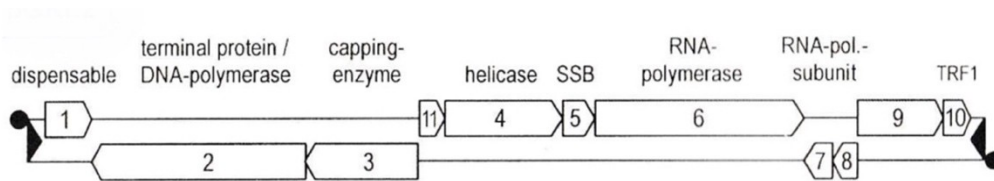


Obr. 9. Mechanismus účinku zymocinu produkovaného kvasinkovými killer kmeny *Klyveromyces lactis*. Vlevo killer kvasinka se znázorněním pGKL1 plasmidu a na něm přítomných ORF, z nichž žlutý a fialový kódují podjednotky killer toxinu. Toxin je sekretován ven z kvasinkové buňky, kde se váže na receptor senzitivní buňky (pravá část obrázku). Poté gama podjednotka vstupuje do cytoplazmy, kde štěpí například zde znázorněnou tRNA-Glu (UUC), což vede k zastavení translace a buněčné smrti. (Převzato a upraveno z Heneghan et al., 2025).

#### 4.1.2 Plasmid pGKL2

Genom plasmidu pGKL2 je tvořen jedenácti otevřenými čtecími rámci (viz Obr. 10), z nichž některé mají dobře charakterizované funkce, zatímco funkce jiných zůstává stále neznámá. ORF1 je příkladem genu, jehož proteinovému produktu nebyla přiřazena žádná specifická funkce (Schaffrath et al., 1992). ORF2 kóduje gen pro pGKL2-specifickou DNA polymerázu a terminální protein vážící se na 5' koncích pGKL2 plasmidu (Tommasino et al., 1988). ORF3 s největší pravděpodobností kóduje *capping* enzym zodpovědný za syntézu 5' čepičky na mRNA (Larsen et al., 1998). ORF4 pravděpodobně kóduje RNA helikázu, tedy enzym zodpovědný za rozvolňování DNA při replikaci

a transkripci (Stark et al., 1990). ORF5 dává vzniknout SSB proteinu (z angl. *single stranded binding protein*) vázajícímu jednovláknovou DNA, který je důležitý zejména v procesu replikace (Meinhardt & Schaffrath, 2001). Transkripci genů zajišťuje RNA polymeráza kódovaná geny ORF6 a ORF7 (Schaffrath et al., 1995). Funkce ORF8 a ORF9 stále není známa. ORF10 kóduje protein TRF1 (z angl. *terminal region recognition factor 1*), který se váže na terminální sekvence plasmidů a také se účastní jejich replikace (McNeel & Tamanoi, 1991). ORF11 kóduje funkční gen, kterému zatím nebyla přiřazena žádná konkrétní funkce (Larsen & Meinhardt, 2000).



Obr. 10. Znárodnění genetické organizace pGKL2 plasmidu se zahrnutím popisu předpokládaných funkcí jednotlivých genů. Na plasmidu se nachází jedenáct ORF (znázorněné šipkami, které odpovídají směru transkripce). Černá kolečka na koncích znázorňují terminální proteiny a černé šipky terminální invertované repetice. (Převzato a upraveno z Meinhardt & Schaffrath, 2001).

#### 4.1.3 Replikace pGKL plasmidů

Elektronová mikroskopie prokázala, že k replikaci pGKL1 a pGKL2 plasmidů dochází mechanismem vytlačování řetězce (z angl. *strand displacement replication*) (Fujimura et al., 1988). Jedná se o obdobu replikačního mechanismu u některých adenovirů, při kterém jako primery slouží terminálně vázané proteiny na 5' koncích plasmidu (Stillman, 1983). Replikace je nezávislá na replikačním aparátu hostitelské buňce a je zajištěna plasmidem kódovanou DNA polymerázou (Tommasino et al., 1988).

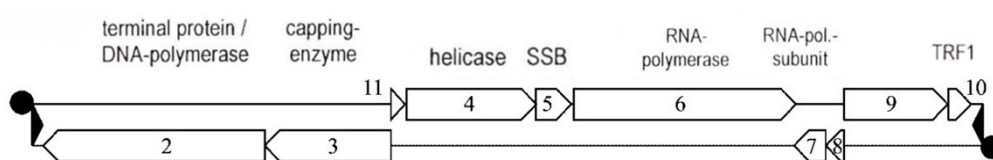
#### 4.2 Lineární plasmidy pPac

Plasmidy pPac se vyskytují v cytoplazmě kvasinek *Pichia acaciae* ve dvou formách: pPac1 a pPac2 o velikosti 13,6 kb a 7,3 kb. Bylo zjištěno, že přítomnost obou plasmidů je nezbytná pro produkci *killer* toxinů touto kvasinkou (Worsham et al. 1990). Menší z těchto plasmidů, pPac2, je označován jako neautonomní, jelikož je jeho replikace a transkripce závislá na větším, autonomním plasmidu pPac1. Plasmid pPac2 nese geny

kódující *killer* toxin nazývaný PaT (z angl. *Pichia acaciae* toxin) a imunitu vůči němu (Jeske et al. 2006).

#### 4.2.1 Plasmid pPac1

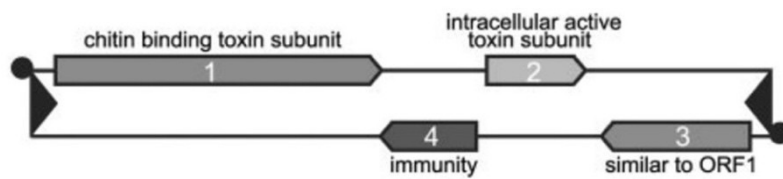
Genetická informace pPac1 plasmidu je tvořena deseti otevřenými čtecími rámci, přičemž se některé z těchto rámců překrývají (viz Obr. 11). Aminokyselinové sekvence a pravděpodobně také předpokládané funkce pPac1 ORF odpovídají genům pGKL2 plasmidu kvasinky *Kluyveromyces lactis*. ORF2-7 a ORF10 kódují proteiny nezbytné pro replikaci a transkripci plasmidu, zatímco funkce ORF8, ORF9 a ORF11 není stále objasněna. Samotný plasmid se vyznačuje vysokou kódující kapacitou, kdy nekódující sekvence tvoří méně než tři procenta genomu, dále krátkými invertovanými terminálními repeticemi a vysokým procentuálním zastoupením adeninových a thyminových bází (Jeske et al. 2006).



Obr. 11. Znárodnění genetické organizace pPac1 plasmidu. Předpokládané funkce ORF pravděpodobně odpovídají genům pGKL2 plasmidu, s výjimkou ORF1, který u pPac1 chybí. (Převzato a upraveno z Jeske & Meinhardt, 2006).

#### 4.2.2 Plasmid pPac2

Genom plasmidu pPac2 se skládá ze čtyř otevřených čtecích rámců (viz Obr. 12), přičemž ORF1, ORF2 a ORF3 kódují sekretované proteiny obsahující signální sekvenci. Tyto proteiny pravděpodobně tvoří podjednotky *killer* toxinu (Klassen et al., 2004). ORF4 neobsahuje signální sekvenci a s největší pravděpodobností kóduje protein zajišťující imunitu vůči toxinu PaT (Paluszynski et al. 2007). Toxin je tedy složen ze tří odlišných podjednotek o molekulových hmotnostech 110 kDa, 39 kDa a 38 kDa, přičemž jeho celková molekulová hmotnost činí 187 kDa. Bylo zjištěno, že stejně jako zymocin se toxin PaT váže na chitinové receptory v buněčné stěně kvasinkových buněk a svou tRNázovou aktivitou způsobuje zastavení buněčného cyklu v S fázi (Klassen et al., 2004, 2008; Mccracken et al., 1994)



Obr. 12. Znárodnění genetické organizace pPac2 plasmidu. Na plasmidu se nachází čtyři ORF (znázorněné šipkami, které odpovídají směru transkripce). ORF1, ORF2 a ORF3 pravděpodobně kódují geny pro podjednotky toxinu, ORF4 kóduje gen zajišťující imunitu vůči toxinu. Černá kolečka na koncích znázorňují terminální proteiny a černé šipky terminální invertované repetice. (Převzato a upraveno z Paluszynski et al., 2007).

### 4.3 Lineární plasmidy pPin

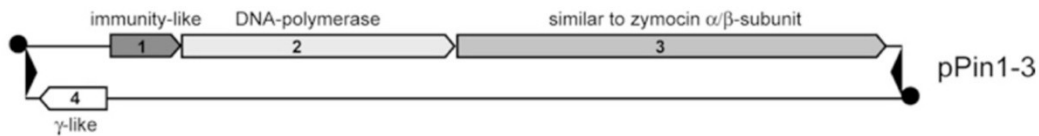
Plasmidy pPin se vyskytují v cytoplazmě kvasinek *Pichia inositovora* ve třech formách, a to jako plasmid pPin1-1 o velikosti 18 kb, pPin1-2 o velikosti 13 kb a pPin1-3 o velikosti 10 kb. Plasmid pPin1-3 zodpovědný za *killer* fenotyp se však nikdy nevyskytuje samostatně, ale vždy v přítomnosti jednoho nebo obou z pPin1-1 a pPin1-2 plasmidů (Hayman et al. 1991). S projevem *killer* fenotypem jsou pravděpodobně asociovány pouze plasmidy pPin1-3 a pPin1-1, zatímco přítomnost pPin1-2 není nezbytná pro produkci toxinu. Přesná funkce pPin1-1 a pPin1-2 není stále zcela objasněna (Magliani et al., 1997).

#### 4.3.1 Plasmid pPin1-3

Plasmid pPin1-3 je neautonomní plasmid, jehož genetická informace je tvořena čtyřmi otevřenými čtecími rámci (viz Obr. 13). První z těchto čtecích rámců, ORF1, pravděpodobně kóduje gen zajišťující imunitu, a tudíž ochranu hostitelské kvasinky před *killer* toxinem kódovaným pPin1-3 plasmidem. ORF2 kóduje DNA polymerázu nezbytnou pro replikaci plasmidu pPin1-3.

Plasmid také kóduje prekurzor *killer* toxinu PiT (z angl. *Pichia inositovora toxin*) o velikosti přibližně 100 kDa, který se skládá ze tří podjednotek. Tyto podjednotky jsou pravděpodobně kódovány ORF3 a ORF4. ORF3 kóduje prekurzor podjednotek vykazujících sekvenční podobnost s alfa a beta podjednotkami zymocinu kódovaného pGKL1 plasmidem u kvasinky *Kluyveromyces lactis*. ORF4 pak kóduje třetí podjednotku, která vykazuje sekvenční podobnost s gama podjednotkou zymocinu (Klassen et al. 2003).

Toxin se váže specificky na chitinové receptory v buněčné stěně senzitivních kvasinek (Klassen et al. 2003). Na rozdíl od dvou výše zmíněných *killer* toxinů, PaT a zymocinu, které cílí na tRNA, toxin PiT kódovaný plasmidem pPin1-3 indukuje fragmentaci rRNA (z angl. *ribosomal ribonucleic acid*) (Kast et al., 2014).



Obr. 13. Znárodnění genetické organizace plasmidu pPin1-3. Plasmid obsahuje čtyři ORF (znázorněné šipkami, které odpovídají směru transkripce). ORF1 kóduje gen zajišťující imunitu vůči toxinu, ORF2 kóduje gen pro DNA polymerázu ORF3 a ORF4 nesou geny pro podjednotky toxinu. Černá kolečka na koncích znázorňují terminální proteiny a černé šipky terminální invertované repetice. (Převzato a upraveno z Klassen & Meinhardt, 2003).

## 5 Závěr

V rámci této práce byl vytvořen přehled tří hlavních typů extrachromozomálních genetických elementů kvasinek. Byla charakterizována extrachromozomální genetická informace ve formě 2 micron plasmidu, virům podobných partikulí (VLP) a virům podobných elementů (VLE). Tyto extrachromozomální elementy nezpůsobují hostitelským kvasinkovým buňkám žádné konkurenční znevýhodnění, naopak jim mohou poskytovat výhodu v konkurenčním prostředí. Extrachromozomální genetická informace kvasinek však není tvořena pouze těmito elementy, ale patří sem i mitochondriální DNA nebo extrachromozomální rDNA kroužky, které rovněž představují podstatnou část genetické informace kvasinek.

Prostor byl věnován genetické organizaci 2 micron plasmidu, jenž představuje modelový eukaryotní plasmid. Byly popsány jím kódované geny, mechanismy replikace, způsob segregace do dceřiných buněk a amplifikační systém, který umožňuje regulaci počtu kopií plasmidu v hostitelské buňce a přispívá k jeho dlouhodobé stabilitě v populaci.

Jako další byly popsány virům podobné partikule (VLP) představující neinfekční cytoplazmatické dvouvláknové RNA mykoviry, jejichž přítomnost v hostitelských kvasinkách umožňuje expresi *killer* fenotypu. Ten poskytuje kvasinkovým buňkám selekční výhodu v konkurenčním prostředí prostřednictvím produkce toxinů působících proti citlivým kmenům. Exprese tohoto fenotypu je podmíněna přítomností pomocného L-A-dsRNA viru, který zajišťuje replikaci a tvorbu obalové kapsidy M-dsRNA viru, který zajišťuje expresi *killer* toxinu a imunitu chránící hostitelskou buňku vůči tomuto toxinu.

Poslední skupinu, která byla v textu popsána, představují virům podobné elementy (VLE), tedy dvouvláknové DNA plasmidy nacházející se v cytoplazmě kvasinkových buněk. Jejich označení vychází z určitých podobností s některými poxviry, adenoviry nebo bakteriofágy. Mezi tyto podobnosti patří kompaktní genom, přítomnost terminálně vázaných proteinů nebo schopnost autonomní replikace či transkripce. Stejně jako u VLP byly i zde identifikovány kvasinkové rody nesoucí *killer* fenotyp, jenž poskytuje hostitelským buňkám konkurenční zvýhodnění prostřednictvím produkce toxinů.

Přestože byly tyto elementy popsány a analyzovány na sekvenční i genomové úrovni, zůstává řada aspektů jejich fungování neobjasněna. Stále například není známá jejich přesná interakce s hostitelským genomem, jaké funkce plní některé z jejich genů, ani proč nebyly v průběhu evoluce ztraceny, ale naopak se s tak vysokou stabilitou udržují v hostitelských buňkách. Právě tyto neobjasněné aspekty mohou představovat směr pro další výzkum.

## Seznam použité literatury

- Ahmed, A., Sesti, F., Ilan, N., Shih, T. M., Sturley, S. L., & Goldstein, S. A. N. (1999). A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell*, *99*(3), 283–291. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81659-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81659-1)
- Ball, S. G., Tirtiaux, C., & Wickner, R. B. (1984). Genetic control of L-A and L-(BC) dsRNA copy number in killer systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *107*(2), 199–217. <https://doi.org/10.1093/genetics/107.2.199>
- Bostian, K. A., Elliott, Q., Bussey, H., Burn, V., Smith, A., & Tipper, D. J. (1984). Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: Multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell*, *36*, 741–751. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90354-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90354-4)
- Breinig, F., Sendzik, T., Eisfeld, K., & Schmitt, M. J. (2006). Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(10), 3810–3815. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510070103>
- Broach, J. R., Atkins, J. F., McGill, C., & Chow, L. (1979). Identification and mapping of the transcriptional and translational products of the yeast plasmid, 2mu circle. *Cell*, *16*(4), 827–839. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90098-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90098-9)
- Bussey, H., Saville, D., Greene, D., Tipper, D. J., & Bostian, K. A. (1983). Secretion of *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin: processing of the glycosylated precursor. *Molecular and Cellular Biology*, *3*(8), 1362–1370. <https://doi.org/10.1128/mcb.3.8.1362-1370.1983>
- Butler, A. R., O'Donnell, R. W., Martin, V. J., Gooday, G. W., & Stark, M. J. (1991). *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *European Journal of Biochemistry*, *199*(2), 483–488. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16147.x>
- Butler, A. R., White, J. H., & Stark, M. J. (1991). Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. *Journal of General Microbiology*, *137*(7), 1749–1757. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-7-1749>
- Challberg, M., & Kelly, T. J., J. (1979). Adenovirus DNA replication in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(2), 655–659. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.655>
- \*Chan, K. M., Liu, Y. T., Ma, C. H., Jayaram, M., & Sau, S. (2013). The 2 micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: a miniaturized selfish genome with optimized functional competence. *Plasmid*, *70*(1), 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.03.001>
- Cheng, R. H., Caston, J. R., Wang, G. J., Gu, F., Smith, T. J., Baker, T. S., Bozarth, R. F., Trus, B. L., Cheng, N., Wickner, R. B., & Steven, A. C. (1994). Fungal virus capsids, cytoplasmic compartments for the replication of double-stranded RNA, formed as icosahedral shells of asymmetric Gag dimers. *Journal of Molecular Biology*, *244*(3), 255–258. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1726>

- Cong, Y. S., Yarrow, D., Li, Y. Y., & Fukuhara, H. (1994). Linear DNA plasmids from *Pichia etchellsii*, *Debaryomyces hansenii* and *Wingea robertsiae*. *Microbiology (Reading, England)*, 140(Pt 6), 1327–1335. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-6-1327>
- Cui, H., Ghosh, S. K., & Jayaram, M. (2009). The selfish yeast plasmid uses the nuclear motor Kip1p but not Cin8p for its localization and equal segregation. *Journal of Cell Biology*, 185(2), 251–264. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810130>
- Dignard, D., Whiteway, M., Germain, D., Tessier, D., & Thomas, D. Y. (1991). Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Molecular & General Genetics : MGG*, 227(1), 127–136. <https://doi.org/10.1007/BF00260717>
- Dufour, E., Rodríguez, I., Lázaro, J. M., de Vega, M., & Salas, M. (2003). A conserved insertion in protein-primed DNA polymerases is involved in primer terminus stabilisation. *Journal of Molecular Biology*, 331(4), 781–794. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00788-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00788-5)
- Esteban, R., & Wickner, R. B. (1986). Three different M1 RNA-containing viruslike particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: in vitro M1 double-stranded RNA synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, 6(5), 1552–1561. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.5.1552-1561.1986>
- Field, L. J., Bobek, L. A., Brennan, V. E., Reilly, J. D., & Bruenn, J. A. (1982). There are at least two yeast viral double-stranded RNAs of the same size: an explanation for viral exclusion. *Cell*, 31(1), 193–200. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90419-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90419-6)
- Fujimura, H., Yamada, T., Hishinuma, F., & Gunge, N. (1988). DNA replication in vivo of linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 49(3), 441–444. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02772.x>
- Futcher, A. B. (1986). Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Theoretical Biology*, 119(2), 197–204. [https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(86\)80074-1](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(86)80074-1)
- Futcher, A. B., & Cox, B. S. (1983). Maintenance of the 2 microns circle plasmid in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 154(2), 612–622. <https://doi.org/10.1128/jb.154.2.612-622.1983>
- Ghosh, S. K., Huang, C. C., Hajra, S., & Jayaram, M. (2009). Yeast cohesin complex embraces 2 micron plasmid sisters in a tri-linked catenane complex. *Nucleic Acids Research*, 38(2), 570–584. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp993>
- \*Gunge, N. (1983). Yeast DNA plasmids. *Annual Review of Microbiology*, 37, 253–276. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001345>
- Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, A. F., & Sakaguchi, K. (1981). Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *Journal of Bacteriology*, 145(1), 382–390. <https://doi.org/10.1128/jb.145.1.382-390.1981>

- Gunge, N., & Yamane, C. (1984). Incompatibility of Linear DNA Killer Plasmids pGKL1 and pGKL2 from *Kluyveromyces lactis* with Mitochondrial DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, *159*(2), 533–539. <https://doi.org/10.1128/jb.159.2.533-539.1984>
- Hanes, S. D., Burn, V. E., Sturley, S. L., Tipper, D. J., & Bostian, K. A. (1986). Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene: implications for processing and immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(6), 1675–1679. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.6.1675>
- Hartley, J. L., & Donelson, J. E. (1980). Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature*, *286*(5776), 860–865. <https://doi.org/10.1038/286860a0>
- Hayman, G. T., & Bolen, P. L. (1991). Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. *Current Genetics*, *19*(5), 389–393. <https://doi.org/10.1007/BF00309600>
- Heneghan, P. G., Salzberg, L. I., Ó Cinnéide, E., Dewald, J. A., Weinberg, C. E., & Wolfe, K. H. (2025). Ancient origin and high diversity of zymocin-like killer toxins in the budding yeast subphylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *122*(7), e2419860122. <https://doi.org/10.1073/pnas.2419860122>
- Hutchins, K., & Bussey, H. (1983). Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 leads to 6)-beta-D-glucan. *Journal of Bacteriology*, *154*(1), 161–169. <https://doi.org/10.1128/jb.154.1.161-169.1983>
- Icho, T., & Wickner, R. B. (1989). The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(12), 6716–6723. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)83488-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)83488-3)
- Jayaram, M., Li, Y. Y., & Broach, J. R. (1983). The yeast plasmid 2mu circle encodes components required for its high copy propagation. *Cell*, *34*(1), 95–104. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90139-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90139-3)
- Jayaram, M., Sutton, A., & Broach, J. R. (1985). Properties of REP3: a cis-acting locus required for stable propagation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 microns circle. *Molecular and Cellular Biology*, *5*(9), 2466–2475. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.9.2466-2475.1985>
- Jeske, S., & Meinhardt, F. (2006). Autonomous cytoplasmic linear plasmid pPac1-1 of *Pichia acaciae*: molecular structure and expression studies. *Yeast*, *23*(6), 479–486. <https://doi.org/10.1002/yea.1367>
- Jung, G. H., Leavitt, M. C., & Ito, J. (1987). Yeast killer plasmid pGKL1 encodes a DNA polymerase belonging to the family B DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, *15*(21), 9088. <https://doi.org/10.1093/nar/15.21.9088>
- Kast, A., Klassen, R., & Meinhardt, F. (2014). rRNA fragmentation induced by a yeast killer toxin. *Molecular Microbiology*, *91*(3), 606–617. <https://doi.org/10.1111/mmi.12481>

- Kikuchi, Y. (1983). Yeast plasmid requires a cis-acting locus and two plasmid proteins for its stable maintenance. *Cell*, *35*(2 Pt 1), 487–493. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90182-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90182-4)
- Klassen, R., Kast, A., Wünsche, G., Paluszynski, J. P., Wemhoff, S., & Meinhardt, F. (2014). Immunity factors for two related tRNA<sup>Gln</sup> targeting killer toxins distinguish cognate and non-cognate toxic subunits. *Current Genetics*, *60*(3), 213–222. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0426-1>
- Klassen, R., & Meinhardt, F. (2003). Structural and functional analysis of the killer element pPin1-3 from *Pichia inositovora*. *Molecular Genetics and Genomics : MGG*, *270*(2), 190–199. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0920-5>
- Klassen, R., Paluszynski, J. P., Wemhoff, S., Pfeiffer, A., Fricke, J., & Meinhardt, F. (2008). The primary target of the killer toxin from *Pichia acaciae* is tRNA<sup>(Gln)</sup>. *Molecular Microbiology*, *69*(3), 681–697. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06319.x>
- Klassen, R., Teichert, S., & Meinhardt, F. (2004). Novel yeast killer toxins provoke S-phase arrest and DNA damage checkpoint activation. *Molecular Microbiology*, *53*(1), 263–273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04119.x>
- Larsen, M., Gunge, N., & Meinhardt, F. (1998). *Kluyveromyces lactis* killer plasmid pGKL2: evidence for a viral-like capping enzyme encoded by ORF3. *Plasmid*, *40*(3), 243–246. <https://doi.org/10.1006/plas.1998.1367>
- Larsen, M., & Meinhardt, F. (2000). Identification of a new gene encoded by pGKL2. *Current Genetics*, *38*(3), 271–275. <https://doi.org/10.1007/s002940000167>
- Ligon, J., Bolen, P., Hill, D. S., Bothast, R. J., & Kurtzman, C. P. (1989). Physical and biological characterization of linear DNA plasmids of the yeast *Pichia inositovora*. *Plasmid*, *21*(3), 185–194. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(89\)90042-5](https://doi.org/10.1016/0147-619x(89)90042-5)
- \*Lilly, J., & Camps, M. (2015). Mechanisms of Theta Plasmid Replication. *Microbiology Spectrum*, *3*(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0029-2014>
- Lu, J., Huang, B., Esberg, A., Johansson, M. J., & Byström, A. S. (2005). The *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin targets tRNA anticodons. *RNA (New York, N.Y.)*, *11*(11), 1648–1654. <https://doi.org/10.1261/rna.2172105>
- \*Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., & Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews*, *10*(3), 369–400. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.3.369>
- Mccracken, D. A., Martin, V. J., Stark, M. J., & Bolen, P. L. (1994). The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia acaciae*: characterization and comparison with the toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology (Reading, England)*, *140*(Pt 2), 425–468. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-2-425>
- McNeel, D. G., & Tamanoi, F. (1991). Terminal region recognition factor 1, a DNA-binding protein recognizing the inverted terminal repeats of the pGKI linear DNA plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(24), 11398–11402. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11398>

- Mehta, S., Yang, X. M., Chan, C. S., Dobson, M. J., Jayaram, M., & Velmurugan, S. (2002). The 2 micron plasmid purloins the yeast cohesin complex: A mechanism for coupling plasmid partitioning and chromosome segregation? *Journal of Cell Biology*, *158*(4), 625–637. <https://doi.org/10.1083/jcb.200204136>
- Mehta, S., Yang, X.-M., Jayaram, M., & Velmurugan, S. (2005). A novel role for the mitotic spindle during DNA segregation in yeast: promoting 2 microm plasmid-cohesin association. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(10), 4283–4298. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.10.4283-4298.2005>
- \*Meinhardt, F., & Schaffrath, R. (2001). Extranuclear inheritance: Cytoplasmic linear double-stranded DNA killer elements of the dairy yeast *Kluyveromyces lactis*. *Progress in Botany*, *62*, 51–70. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-56849-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56849-7_4)
- Murray, A. W., & Szostak, J. W. (1983). Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. *Cell*, *34*(3), 961–970. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90553-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90553-6)
- Murray, J. A., & Cesareni, G. (1986). Functional analysis of the yeast plasmid partition locus STB. *The EMBO Journal*, *5*(12), 3391–3399. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04655.x>
- Murray, Scarpa, M., Rossi, N., & Cesareni, G. (1987). Antagonistic controls regulate copy number of the yeast 2 mu plasmid. *The EMBO Journal*, *6*(13), 4205–4212. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02768.x>
- Orentaite, I., Poranen, M. M., Oksanen, H. M., Daugelavicius, R., & Bamford, D. H. (2016). K2 killer toxin-induced physiological changes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *16*(2). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow003>
- Paluszynski, J. P., Klassen, R., & Meinhardt, F. (2007). *Pichia acaciae* killer system: genetic analysis of toxin immunity. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(13), 4373–4378. <https://doi.org/10.1128/AEM.00271-07>
- Petes, T. D., & Williamson, D. H. (1994). A novel structural form of the 2 micron plasmid of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, *10*(10), 1341–1345. <https://doi.org/10.1002/yea.320101011>
- Prajapati, H. K., Rizvi, S. M., Rathore, I., & Ghosh, S. K. (2017). Microtubule-associated proteins, Bik1 and Bim1, are required for faithful partitioning of the endogenous 2 micron plasmids in budding yeast. *Molecular Microbiology*, *103*(6), 1046–1064. <https://doi.org/10.1111/mmi.13608>
- Rank, G. H., Xiao, W., & Arndt, G. M. (1994). Evidence for Darwinian selection of the 2-micron plasmid STB locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome*, *37*(1), 12–18. <https://doi.org/10.1139/g94-002>
- Reiter, J., Herker, E., Madeo, F., & Schmitt, M. J. (2005). Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *The Journal of Cell Biology*, *168*(3), 353–358. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408071>

- Reynolds, A. E., Murray, A. W., & Szostak, J. W. (1987). Roles of the 2 microns gene products in stable maintenance of the 2 microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 7(10), 3566–3573.  
<https://doi.org/10.1128/mcb.7.10.3566-3573.1987>
- \*Rizvi, S. M. A., Prajapati, H. K., & Ghosh, S. K. (2017). The 2 micron plasmid: a selfish genetic element with an optimized survival strategy within *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 64(1), 25–42. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0719-2>
- \*Ruiz-Masó, J. A., Machón, C., Bordanaba-Ruiseco, L., Espinosa, M., Coll, M., & Del Solar, G. (2015). Plasmid Rolling-Circle Replication. *Microbiology Spectrum*, 3(1).  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0035-2014>
- Sadowski, P. D. (1995). The Flp recombinase of the 2-microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 51, 53–91.
- \*Satwika, D., Klassen, R., & Meinhardt, F. (2012). Anticodon nuclease encoding virus-like elements in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2), 345–356.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4349-9>
- Schaffrath, R., Soond, S. M., & Meacock, P. A. (1995). The DNA and RNA polymerase genes of yeast plasmid pGKL2 are essential loci for plasmid integrity and maintenance. *Microbiology (Reading, England)*, 141(Pt 10), 2591–2599.  
<https://doi.org/10.1099/13500872-141-10-2591>
- Schaffrath, R., Stark, M. J., Gunge, N., & Meinhardt, E. (1992). *Kluyveromyces lactis* killer system: ORF1 of pGKL2 has no function in immunity expression and is dispensable for killer plasmid replication and maintenance. *Current Genetics*, 21(4–5), 357–363.  
<https://doi.org/10.1007/BF00351695>
- \*Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 257–276.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x>
- \*Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(3), 212–221. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1347>
- Schmitt, M. J., & Tipper, D. J. (1995). Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. *Virology*, 213(2), 341–351.  
<https://doi.org/10.1006/viro.1995.0007>
- Schmitt, M., & Radler, F. (1988). Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 170(5), 2192–2196.  
<https://doi.org/10.1128/jb.170.5.2192-2196.1988>
- Scott-Drew, S., & Murray, J. A. (1998). Localisation and interaction of the protein components of the yeast 2 mu circle plasmid partitioning system suggest a mechanism for plasmid inheritance. *Journal of Cell Science*, 111(Pt 13), 1779–1789.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.111.13.1779>

- Sengupta, A., Blomqvist, K., Pickett, A. J., Zhang, Y., Chew, J. S., & Dobson, M. J. (2001). Functional domains of yeast plasmid-encoded Rep proteins. *Journal of bacteriology*, *183*(7), 2306–2315. <https://doi.org/10.1128/JB.183.7.2306-2315.2001>
- Senecoff, J. F., Bruckner, R. C., & Cox, M. M. (1985). The FLP recombinase of the yeast 2-micron plasmid: characterization of its recombination site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*(21), 7270–7274.
- Som, T., Armstrong, K. A., Volkert, F. C., & Broach, J. R. (1988). Autoregulation of 2 micron circle gene expression provides a model for maintenance of stable plasmid copy levels. *Cell*, *52*(1), 27–37. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90528-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90528-4)
- \*Stark, M. J., Boyd, A., Milehams, A. J., & Romanos, M. A. (1990). The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. *Yeast (Chichester, England)*, *6*(1), 1–29. <https://doi.org/10.1002/yea.320060102>
- Stark, M. J., Boyd, A., & Pritchard, R. H. (1986). The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *The EMBO Journal*, *5*(8), 1995–2002. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04455.x>
- Stevens, B. J., & Moustacchi, E. (1971). ADN satellite gamma et molécules circulaires torsadées de petite taille chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [Gamma satellite DNA and small twisted circular molecules in yeast *Saccharomyces cerevisiae*]. *Experimental Cell Research*, *64*(2), 259–266. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(71\)90075-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(71)90075-9)
- Stillman, B. W. (1983). The replication of adenovirus DNA with purified proteins. *Cell*, *35*(1), 7–9. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90201-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90201-5)
- Strope, P. K., Kozmin, S. G., Skelly, D. A., Magwene, P. M., Dietrich, F. S., & McCusker, J. H. (2015). 2 $\mu$  plasmid in *Saccharomyces* species and in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *15*(8), fov090. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov090>
- Sýkora, M., Pospíšek, M., Novák, J., Mrvová, S., Krásný, L., & Vopálenský, V. (2018). Transcription apparatus of the yeast virus-like elements: Architecture, function, and evolutionary origin. *PLoS Pathogens*, *14*(10), e1007377. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007377>
- Tercero, J. C., Dinman, J. D., & Wickner, R. B. (1993). Yeast MAK3 N-acetyltransferase recognizes the N-terminal four amino acids of the major coat protein (gag) of the L-A double-stranded RNA virus. *Journal of Bacteriology*, *175*(10), 3192–3194. <https://doi.org/10.1128/jb.175.10.3192-3194.1993>
- Tokunaga, M., Wada, N., & Hishinuma, F. (1987). Expression and identification of immunity determinants on linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 in *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Research*, *15*(3), 1031–1046. <https://doi.org/10.1093/nar/15.3.1031>
- Tommasino, M., Ricci, S., & Galeotti, C. L. (1988). Genome organization of the killer plasmid pGK12 from *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Research*, *16*(13), 5863–5878. <https://doi.org/10.1093/nar/16.13.5863>

- Volkert, F. C., & Broach, J. R. (1986). Site-specific recombination promotes plasmid amplification in yeast. *Cell*, *46*(4), 541–550. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90879-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90879-2)
- \*Wickner, R. B. (1996). Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, *60*(1), 250–265. <https://doi.org/10.1128/mr.60.1.250-265.1996>
- Widner, W. R., & Wickner, R. B. (1993). Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(7), 4331–4341. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.7.4331-4341.1993>
- Wong, M. C., Scott-Drew, S. R., Hayes, M. J., Howard, P. J., & Murray, J. A. (2002). RSC2, encoding a component of the RSC nucleosome remodeling complex, is essential for 2 micron plasmid maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(12), 4218–4229. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.12.4218-4229.2002>
- Worsham, P. L., & Bolen, P. L. (1990). Killer toxin production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. *Current Genetics*, *18*(1), 77–80. <https://doi.org/10.1007/BF00321119>
- Zakian, V. A., Brewer, B. J., & Fangman, W. L. (1979). Replication of each copy of the yeast 2 micron DNA plasmid occurs during the S phase. *Cell*, *17*(4), 923–934. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90332-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90332-5)