

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



Methylace virových RNA

**Anna Šimonová**  
Praha, 2023

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Školící pracoviště: Laboratoř Chemické biologie nukleových kyselin

Ústav organické chemie a biochemie

Flemingovo náměstí 542/2

160 00, Praha 6

Školitelka: Ing. Hana Macíčková Cahová, Ph.D.

Dizertační práce bude nejméně 5 pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.



## Abstrakt

Viry svým působením zasáhly vývoj všech organizmů. Mají jednoduchou vnitřní organizaci a obsahují menší množství, většinou dobře popsanych RNA. V případě (+)ssRNA virů slouží genomová RNA rovněž jako mRNA. Díky tomu se viry jeví jako ideální modelový systém pro získání informací o nových RNA modifikacích a zároveň k pochopení funkce modifikací již popsanych.

V této práci byl jako modelový systém studován zástupce retrovirů, virus lidské imunitní nedostatečnosti typ 1 (HIV-1). V další studii byly testovány čtyři zástupci pikornavirů pro popis methylačního spektra. Pro získání informace o RNA methylacích byla použita kombinace dvou technik, kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) a sekvenačních technik. Výsledky LC-MS analýzy odhalily velké množství 1-methyladenosinu ( $m^1A$ ) v RNA izolované z HIV-1. Mapovací technika vytvořená pro  $m^1A$  pak potvrdila přítomnost methylace pouze v přibalených tRNA. Tento výsledek následně vedl k přepočítání RNA složení virové partikule HIV-1.

V případě pikornavirů odhalila LC-MS  $m^1A$  pouze u dvou hmyzích virů (virus pytlíčkovitého plodu, SBV a virus deformovaných křídel, DWV). Stejně tak byla potvrzena i přítomnost 5-methylcytidinu ( $m^5C$ ). Následné sekvenační techniky ( $m^1A$  mapování a bisulfitové sekvenování) potvrdily přítomnost  $m^1A$  a  $m^5C$  pouze v tRNA. Tento objev ukazuje, že si i další viry, nejen HIV, přibalují hostitelskou tRNA. Navíc, tRNA není balena náhodně, ale typy tRNA balené lidským HIV-1 virem a včelími pikornaviry jsou velmi podobné, což by mohlo znamenat, že viry partikulární tRNA využívají při infekci.

**Klíčová slova:** RNA modifikace, LC-MS, RNA-seq, 1-methyladenosin, HIV-1, pikornaviry, tRNA, tRNA fragmenty

## Abstract

Viruses are the major force that shapes the evolution of both pro- and eukaryotic organisms. They have a simple inner organization and contain only a few, usually well-described RNAs. In the case of +(ss)RNA viruses, their genomic RNA serves also as mRNA. This makes them a perfect model system for searching for new mRNA modifications as well as for understanding the role of already known modifications.

In this work, Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) from the *Retroviridae* family was used as a model system. In the following study, four representatives from the *Picornaviridae* family were tested for RNA methylation profile. To get the information, a combination of two techniques was developed, liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS) and sequencing techniques. Results of LC-MS reveal a surprisingly high amount of 1-methyladenosine (m<sup>1</sup>A) in RNA isolated from HIV-1. Nevertheless, the m<sup>1</sup>A mapping sequencing technique confirm m<sup>1</sup>A position only in co-packed tRNA. This led to the recalculation of HIV-1 virion RNA composition.

In the case of *Picornaviridae*, LC-MS revealed m<sup>1</sup>A and 5-methylcytidine (m<sup>5</sup>C) in two insect viruses (Sacbrood virus, SBV and Deformed wing virus, DWV). RNA seq techniques (m<sup>1</sup>A mapping and bisulfite sequencing) confirmed the presence of m<sup>1</sup>A and m<sup>5</sup>C only in tRNA. Further analysis revealed that tRNAs are present in the form of 3' and 5' fragments. This finding shows that also other viruses co-pack tRNAs. Surprisingly, the types of co-packed tRNAs are similar in distinct virus families: HIV-1 and *Picornaviridae*. This finding may indicate that particular co-packed tRNAs play some important general role in viral infection.

**Key words:** RNA modifications, LC-MS, RNA-seq, 1-methyladenosine, HIV-1, *Picornaviridae*, tRNA, tRNA fragments

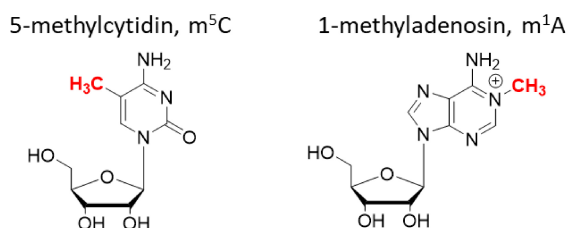
## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>6</b>
1.1 Modifikace RNA .....	6
1.1.1 5-methylcytidin (m <sup>5</sup> C) .....	6
1.1.2 1-methyladenosin (m <sup>1</sup> A) .....	7
1.2 Metody detekce .....	7
1.2.1 Kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) .....	7
1.2.2 RNA sekvenační techniky (RNA-seq) .....	8
1.3 Viry .....	9
1.3.1 Retroviry .....	9
1.3.1.1 Virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) .....	9
1.3.2 Pikornaviry .....	9
1.3.2.1 Lidské pikornaviry .....	10
1.3.2.2 Včelí pikornaviry .....	10
1.3.3 Modifikace ve virech .....	11
1.3.3.1 5-methylcytidin (m <sup>5</sup> C) .....	11
<b>2. Hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>12</b>
<b>3. Metodika</b> .....	<b>13</b>
3.1 Příprava virových partikulí HIV-1 .....	13
3.2 Příprava pikornavirů .....	13
3.3 LC-MS RNA z HIV-1 .....	13
3.4 LC-MS RNA izolované z vybraných pikornavirů .....	14
3.5 Mapování m <sup>1</sup> A .....	14
3.6 Bisulfitové sekvenování .....	15
3.7 Northern blot analýza .....	15
3.8 Bioinformatická analýza .....	16
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>17</b>
4.1 Studium RNA modifikací ve virové RNA z HIV-1 .....	17
4.1.1 Analýza RNA izolované z HIV-1 virových partikulí .....	17
4.1.2 Mapování m <sup>1</sup> A .....	19
4.1.3 Northern blot analýza tRNA z HIV-1 virových partikulí .....	21
4.2 Studium RNA methylací ve vybraných pikornavirech .....	22
4.2.1 Analýza RNA izolované z různých pikornavirů .....	22
4.2.2 Mapování m <sup>1</sup> A a bisulfitové sekvenování pikornavirů .....	23
4.2.3 Northern blot analýza pikornavirů .....	25
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>26</b>
5.1 Studium RNA modifikací ve virové RNA z HIV-1 .....	26
5.2 Studium RNA methylací ve vybraných pikornavirech .....	27
<b>6. Závěr</b> .....	<b>29</b>
<b>7. Použitá literatura</b> .....	<b>30</b>
<b>8. Seznam publikací</b> .....	<b>34</b>

# 1. ÚVOD

## 1.1 Modifikace RNA

Chemické modifikace RNA jsou známy od 50. let 20. století (Davis and Allen 1957) a byly potvrzeny u eukaryot, prokaryot, archeí a jejich virů (Potužník and Cahová 2020, Boccaletto, Stefaniak et al. 2022). I když je přítomnost modifikací v RNA známa již několik desítek let, jejich důležitost a klíčová role v biologických dějích v buňce byla objevena až nedávno. Během posledních let se díky značnému zdokonalení detekčních technik podařilo nalézt mnoho dalších modifikací a to i v méně zastoupených RNA (Li and Mason 2014). U mnoha z nich je však jejich funkce stále neznámá. V dnešní době je známo kolem 170 RNA modifikací (Boccaletto, Machnicka et al. 2018), které byly nalezeny v různých typech RNA. Nejlépe prozkoumané jsou rRNA a tRNA, tedy tzv. funkční RNA, jejichž množství činí přes 90 % všech RNA v buňce (v závislosti na organismu). V jednotlivých skupinách tRNA bylo nalezeno největší množství modifikací (Suzuki 2021). Oproti tRNA je rRNA méně modifikovaná, ale i v jejím případě je poloha a typ modifikace esenciální pro správné fungování molekuly (Sloan, Warda et al. 2017). V kódujících mRNA, zastoupené přibližně z 5 %, pak bylo nalezeno kolem deseti modifikací (Li and Mason 2014). Modifikace v tRNA a rRNA ovlivňují hlavně funkčnost molekuly. V mRNA přítomnost modifikací ovlivňuje schopnost kódovat informaci, kterou mRNA nese. Tento fakt vyvolal velkou vlnu zájmu a položil základy tzv. epitranskriptomiky (Jurga and Barciszewski 2021). Postranskripční modifikace nukleosidů v RNA ovlivňují široké spektrum vlastností RNA. Mají často vliv na stabilitu molekuly nebo na správné poskládání translačního mechanismu buňky. To pak dále ovlivňuje např. tvorbu proteinů. Role modifikací byla také prokázána v regulaci genové exprese (Meyer and Jaffrey 2014), embryonálním vývoji, diferenciaci kmenových buněk (Batista, Molinie et al. 2014) a mnoha dalších dějů. Velké odvětví výzkumu modifikací se věnuje i jejich vlivu na lidská onemocnění a jejich případnou léčbu (Batista 2017, Nombela, Miguel-López et al. 2021). Následující podkapitoly se budou věnovat RNA modifikacím, kterými se práce zabývala (Obr.1).



Obr. 1: Struktury vybraných modifikovaných nukleosidů.

### 1.1.1 5-methylcytidin (m<sup>5</sup>C)

5-methylcytidin byl popsán nejdříve v DNA před více než 70 lety (Hotchkiss 1948). V RNA byl m<sup>5</sup>C poprvé potvrzen v roce 1975 ve virové mRNA (Dubin and Stollar 1975). m<sup>5</sup>C byl také detekován ve všech majoritně zastoupených RNA. V tRNA je jeho přítomnost důležitá pro dosažení správné struktury (Helm 2006). Pozice m<sup>5</sup>C v rRNA ovlivňuje poskládání ribozomální jednotky, její stabilitu a proces translace (Sloan, Warda et al. 2017). V mRNA byl studován jeho vliv na translaci, transport a stabilitu molekuly. Podle publikovaných studií závisí efektivita translace mRNA na tom, v jakém úseku mRNA se m<sup>5</sup>C vyskytuje. V případě, že se m<sup>5</sup>C vyskytuje v kódující sekvenci mRNA, dá se jeho vliv na translaci považovat za negativní (Huang, Chen et al. 2019). Pokud je ale zvýšené množství m<sup>5</sup>C detekováno v 3'-UTR (nepřekládaná oblast, untranslated region), vliv na translaci mRNA se jeví jako pozitivní (Schumann, Zhang et al. 2020). m<sup>5</sup>C je také nezbytný pro navázání exportního proteinu (ALYREF) a podílí se tedy na regulaci transportu molekuly z jádra (Yang, Yang et al. 2017). Ani v případě vlivu na stabilitu mRNA nejsou názory na přítomnost m<sup>5</sup>C jednotné. Studie provedená na modelovém organismu (Dánie

pruhované) přichází se závěrem, že během aktivace embryonálního genomu (MTZ, maternal-to-zygotic transition) byla pozorována vyšší stabilita mateřské mRNA v případě, že byla modifikována (Yang, Wang et al. 2019). Některé další studie ale vliv methylace mRNA na stabilitu mRNA nepozorovaly (David, Burgess et al. 2017). Role m<sup>5</sup>C je diskutována i v oblasti výzkumu rakoviny, např. jako biomarker u pacientů s hepatocelulárním karcinomem (Xue, Zhao et al. 2020).

### 1.1.2 1-methyladenosin (m<sup>1</sup>A)

Modifikace m<sup>1</sup>A byla poprvé popsána v 60. letech (Dunn 1961). Její přítomnost byla potvrzena v tRNA, rRNA a v nedávné době i v mRNA (Dominissini, Nachtergaele et al. 2016, Li, Xiong et al. 2016). Za fyziologických podmínek nese m<sup>1</sup>A kladný náboj, což může ovlivňovat strukturu RNA a/nebo RNA-protein interakci. Methylová skupina v pozici N<sup>1</sup> blokuje klasické Watson-Crick párování bází, tedy A:U nebo A:T. m<sup>1</sup>A je však schopný vytvořit vodíkový můstek i s jinými bázemi (Hoosteen párování bází). Tato vazba je však v porovnání s klasickou vazbou A:U nebo A:T méně stabilní (Xiong, Li et al. 2018). Methylovou skupinu lze chemicky *in vitro* přemístit z pozice N<sup>1</sup> na pozici N<sup>6</sup> adeninu (Dimrothův přesmyk). Reakce probíhá za alkalických podmínek, kdy dochází k otevření kruhu a přesmyku methylu (Macon and Wolfenden 1968).

V tRNA je přítomnost m<sup>1</sup>A nezbytná pro stabilizaci struktury a správného fungování molekuly (Liu, Clark et al. 2016). Modifikace v pozici 1322 lidské 28S rRNA výrazně napomáhá tvorbě 60S ribozomální podjednotky (Sharma, Hartmann et al. 2018). Studie zabývající se počtem m<sup>1</sup>A v mRNA jsou prozatím nejednoznačné. V lidské mRNA identifikoval Li et al. (Li, Xiong et al. 2017) stovky m<sup>1</sup>A, oproti tomu Safra et al. (Safra, Sas-Chen et al. 2017) popsal pouze desítku modifikovaných míst. Obě studie se ale shodují, že m<sup>1</sup>A obsažen v kódující oblasti mitochondriální mRNA, brání díky narušení Watson-Crick interakci modifikovaných kodonů translaci.

## 1.2 Metody detekce

Díky stále citlivějším technikám detekce stoupá počet objevených RNA modifikací. Pro pochopení biologické funkce jednotlivých modifikací je však zásadní znát nejen o jakou modifikaci se jedná, ale i identifikovat RNA, ve které se nachází, a následně její pozici v řetězci.

### 1.2.1 Kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (LC-MS)

I v dnešní době zůstává kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) (Obr. 2) velmi důležitou technikou využívanou k potvrzení přítomnosti modifikace ve vzorku RNA. Izolovaná RNA, ve které má být modifikace potvrzena, je enzymaticky štěpena do formy nukleotidů nebo nukleosidů. Takto připravené vzorky jsou podrobeny analýze LC-MS. Obrovskou výhodou této metody je její citlivost a robustnost (Globisch, Pearson et al. 2011, Gaston and Limbach 2014). Analýza jednoho vzorku je schopná podat informace o více modifikacích ve vzorku obsažených. V kombinaci s izotopově značenými sloučeninami je tato technika také schopna podat informace o množství identifikované modifikace ve vzorku (Brückl, Globisch et al. 2009). Díky způsobu, jakým jsou vzorky připravovány však zaniká informace o poloze hledané modifikace v sekvenci, i z jakého typu RNA modifikace pochází. Proto je příprava a čistota testované RNA esenciálním krokem. I drobná kontaminace, zvláště pak typy RNA, které obsahují větší množství modifikací (např. tRNA, rRNA) může vést k zavádějícímu závěru. Ve srovnání se sekvenačními technikami, je pro hmotnostní analýzu potřebné poměrně velké množství vstupního materiálu, tedy izolované RNA.

## 1.2.2 RNA sekvenační techniky (RNA-seq)

Sekvenační techniky jsou oproti LC-MS schopné podat informaci o pozici modifikace v sekvenci RNA (Mortazavi, Williams et al. 2008). Tyto metody všeobecně využívají reverzní transkriptázu, která přepisuje RNA do cDNA. cDNA je pak znásobena během polymerázové řetězové reakce (PCR). Výhodou RT při detekci některých modifikací je především její schopnost reagovat na přítomnost modifikované báze v sekvenci RNA buď zastavením přepisu do cDNA nebo vložím jiné/nepárujícího nukleotidu do vznikajícího řetězce cDNA. Kombinováním této techniky s metodami, které jsou schopné označit polohu modifikované báze, dochází k obrovskému posunu v mapování RNA modifikací.

Nejčastější metodou značení různých typů modifikací v řetězci RNA je chemická úprava modifikované báze. Taková úprava z pravidla vede ke zvýraznění pozice modifikované báze a přesnější reakcí RT při přepisu.

Další technikou kombinovanou s RNA-seq je imunoprecipitace (IP). V případě této metody dochází po fragmentaci RNA k reakci modifikované báze se specifickou protilátkou. Následná IP by pak měla selektovat pouze fragmenty obsahující danou modifikaci. Používání protilátek se však již dnes ukazuje jako metoda, která přináší poměrně velké množství falešně pozitivních výsledků (pozic testované modifikace), protože protilátky nebývají tak specifické, jak by se očekávalo (Helm, Lyko et al. 2019).

Nevýhodou sekvenačních technik oproti LC-MS je nutnost vytvoření specifické metody pro každou hledanou RNA modifikaci. Dalším problémem mohou být chyby vnesené během složité přípravy sekvenačních knihoven nebo nesprávné zpracování získaných dat.

### *5-methylcytidin ( $m^5C$ )*

Jedna z metod, které využívá protilátky pro detekci  $m^5C$  se nazývá  $m^5C$ -RIP (Edelheit, Schwartz et al. 2013). Další technikou využívající protilátky je Aza-IP. Tato technika k detekci  $m^5C$  využívající metabolické značení (5-azacytidin) v kombinaci s proteinovou imunoprecipitací (Khoddami and Cairns 2013). Proteinovou precipitací využívá i technika miCLIP. Ta využívá mutantní NSUN2, proti kterému jsou pak použity protilátky (Linder, Grozhik et al. 2015).

Odlišnou technikou je bisulfitové sekvenování, které je založeno na různé specifické chemické reakci cytidinu a 5-methylcytidinu. Metoda byla původně vytvořena pro detekci 5-methyldeoxycytidinu v DNA, ale postupně byla upravena pro RNA (Schaefer, Pollex et al. 2009). Toto sekvenování je založeno na předpokladu, že působením činidla dochází ke konverzi C na U,  $m^5C$  však zůstává beze změny. Podrobněji bude tato technika popsána dále v práci.

### *$N^1$ -methyladenosin ( $m^1A$ )*

$m^1A$ -seq je klasická sekvenační technika využívající různé typy reverzních transkriptáz (RT). Podle typu RT dochází při přepisu v místě  $m^1A$  buď k zastavení transkripce (Hauenschild, Tserovski et al. 2015) nebo k vnesení jiného nukleotidu (Safra, Sas-Chen et al. 2017).

Protilátky proti  $m^1A$ , následná imunoprecipitace fragmentů, které obsahují modifikovanou bázi a přepis do cDNA pomocí RT bylo použito u technik  $m^1A$ -meRIP (Dominišini, Nachtergaele et al. 2016),  $m^1A$ -ID-seq (Li, Xiong et al. 2016) a  $m^1A$ -MAP (Li, Xiong et al. 2017). Hlavními rozdíly mezi metodami je příprava kontrolních vzorků a použití různých typů reverzních transkriptáz. V případě  $m^1A$ -meRIP byl pro přípravu kontrolních vzorků použit Dimrothův přesmyk. Li a jeho skupina využívali pro přípravu kontrolních vzorků demethylázu ALKB. V případě  $m^1A$ -ID-seq byla použita AMV RT, která by měla zastavit přepis při setkání s  $m^1A$  a v případě  $m^1A$ -MAP byla pak použita TGIRT RT, která by měla při setkání s  $m^1A$  vnést jinou bázi. Vzhledem k tomu, že velká část této práce je věnována právě mapování  $m^1A$ , budou technické detaily a způsob tvoření knihoven uvedeny a diskutovány níže.

## 1.3 Viry

Viry jsou drobní vnitrobuněční cizopasníci pohybující se na pomezí mezi živým a neživým. Často bývají označovány jako nebuněčné formy života. Jedná se o velmi různorodou skupinu. Oproti buňkám nejsou viry schopné se samostatně dělit, růst, vytvářet energii nebo proteiny. Ke své reprodukci využívají aparát hostitelské buňky.

Viry obsahují pouze svoji genetickou informaci, kódovanou buď v RNA nebo DNA. Podle typu nukleové kyseliny se viry dělí do 7 skupin (Baltimorův systém klasifikace)

V rámci vypracování této dizertační práce byla pozornost věnována studiu dvěma typům virů (retroviry a pikornaviry). Proto se další část práce bude věnovat popisu těchto skupin a zástupcům v práci použitých.

### 1.3.1 Retroviry

Retroviry jsou čeled' virů způsobující závažné onemocnění hlavně u lidí, dalších savců a ptáků. Jedná se o kulovité, obalené viry o průměru 80-100 nm. Vnější lipidový obal prostupují glykoproteiny. Obal kryje kapsida, která ukrývá dvě kopie +ssRNA, každá o délce 7000-11000 nukleobází. Po průniku do buňky a uvolnění gRNA (genomová RNA) dochází k přepisu gRNA do cDNA pomocí reverzní transkriptázy. Virová dsDNA je inkorporována integrazou do genomu hostitelské buňky. Hostitelská buňka není schopná virovou DNA rozpoznat a dochází tedy k přepisu a následnému využití buněčné mašinerie k tvorbě nových virů (Oxford, Collier et al. 2016).

#### 1.3.1.1 Virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV)

HIV patří do podčeledi *Lentivirus*, které zpravidla způsobují dlouho trvající onemocnění, kterému může předcházet i poměrně dlouhá doba latence. HIV má dva podtypy. HIV-1 je světově rozšířen a má vyšší infektivitu oproti HIV-2, který není tak infekční a jeho výskyt se drží převážně v západní Africe (Visseaux, Damond et al. 2016). Pro účely této práce byl zvolen subtyp HIV-1.

HIV-1 je kulovitý virus s vnějším obalem o průměru cca 120 nm. Obal je tvořen lipidovou dvouvrstvou, kterou prostupují glykoproteiny gp120 a gp41. Vnější obal obsahuje matrixový protein p17 a kryje proteinová kapsida (p24), která obsahuje dvě kopie genomové +ssRNA viru. Obě vlákna jsou pevně navázána na nukleokapsidový protein p7. Kapsida dále obsahuje enzymy reverzní transkriptázu, integrázu, proteázu a další fragmenty RNA z hostitelské buňky (Oxford, Collier et al. 2016).

Jedno genomové vlákno je cca 9750 nt dlouhé, má na 5' konci čepičku a je polyadenylováno na 3' konci. gRNA obsahuje 9 genů kódujících 3 polyproteiny a 6 proteinů. Gag polyprotein je proteolyticky štěpen na matrix (MA, p17), kapsidu (CA, p24), nukleokapsidu (NC, p7) a p6 protein. Tyto proteiny jsou zodpovědné převážně za interní strukturu virové partikule. Gag-Pol polyprotein obsahuje proteázu (PR, p15), reverzní transkriptázu (RT, p66, p51), integrázu (IN, p31). Env polyprotein (gp160) je složen z gp120 a gp41 strukturních glykoproteinů, zodpovědných za navázání virové partikule k receptoru CD4 a sekundárních koreceptorů. Další šest genů kódují regulační (Tat, Rev) a doplňkové proteiny (Vif, Vpr, Vpu, Nef) ovlivňující schopnost viru infikovat buňku a tvorbu nových virových částic (Foley, Leitner et al. 2015).

### 1.3.2 Pikornaviry

V této práci byly studovány dva lidské viry z čeledi *Picornaviridae* a dva včelí viry z čeledi *Iflaviridae*.

### 1.3.2.1 Lidské pikornaviry

Jako zástupci lidských pikornavirů byly v této práci studovány dva zástupci z čeledi *Picornaviridae*, oba z rodu enterovirů, lidský echovirus 18 a lidský rhinovirus typu 2. Enteroviry jsou velmi početným rodem pikornavirů, čítajících 15 druhů (Enteroviry A-L, Rhinoviry A-C) (Taxonomy 2019). Lidskými enteroviry A-D a rhinoviry A-C se ročně nakazí miliony lidí po celém světě (Harvala, Broberg et al. 2018). Nejčastější formou přenosu je fekálně orální cesta u enterovirů nebo přenosem sekretu dýchacích cest u rhinovirů. Infekce často probíhá bez příznaků, ale nákaza se může projevit i jako horečka, bolest hlavy, onemocnění horních a dolních cest dýchacích nebo onemocnění trávicího traktu. Některé enteroviry jsou schopné napadat nervovou soustavu. Klinicky byla jejich přítomnost prokázána u virových meningitid (zánět mozkových blan), encefalitid (zánět mozku), myelitid (zánětlivé onemocnění míchy), při akutní chabé paréze (periferní obrna) a dalších (Chen, Lee et al. 2020). Nejznámějším neuropatickým enterovirem je poliovirus, patřící mezi enteroviry C, způsobující poliomyelitidu (dětskou obrnu). Díky očkování však bylo toto onemocnění prakticky vymýceno. Studie provedené v Evropě uvádějí, že 66 % non-polio enterovirových onemocnění (rhinoviry nejsou zahrnuty) se týkalo dětí do 5 let. U 45 % všech testovaných vzorků byla infekce provázená neurologickými příznaky, ty mohou být u takto malých dětí zvláště nebezpečné (Bubba, Broberg et al. 2020).

Enteroviry mají ikosahedrální neobalené virové partikule o průměru 30 nm s T= pseudo3 symetrií. Kapsida chrání jednovláknovou gRNA, průměrně 8000 nt dlouhou. gRNA má na 5' konci kovalentně navázaný VPg protein, který je nutný pro replikaci. Dlouhá nepřekládaná oblast (UTR, untranslated region) na 5' konci obsahuje IRES motiv (internal ribosome entry site). IRES umožňuje přímou syntézu polyproteinu (Martínez-Salas, Francisco-Velilla et al. 2015). 3' konec je polyadenylován a je důležitý nejen pro tvorbu negativního vlákna RNA, ale také pro translaci a RNA stabilitu (Agol and Gmyl 2018). Inetakce s receptorem nebo vystavení kyselému prostředí v endozómech aktivuje enterovirovou kapsidu do stavu, kdy dochází k uvolnění gRNA. Enterovirům slouží RNA i jako mRNA a je překládána do jednoho polyproteinu, který je následně štěpen na funkční kapsidové podjednotky (VP1, 2, 3 a 4), proteázy a RDRP. Strukturní proteiny tvoří protomer, který je základním stavebním kamenem pro ikosahedrální kapsidu. Celá kapsida je tvořena 60 protomery, které jsou uspořádány do pentamerových jednotek (Duvaud, Gabella et al. 2021).

V práci byly použity dva zástupci lidských pikornavirů:

**Echovirus 18,**

**Rhinovirus 2.**

### 1.3.2.2 Včelí pikornaviry

Jako zástupci hmyzích virů byly studovány virus pytlíčkovitého plodu (*Sacbrood virus-CZ, SBV-CZ*) a virus deformovaných křídel (*Deformed wing virus, DWV*), oba z čeledi *Iflaviridae*, oba napadající včelu medonosnou (*Apis mellifera*). Včela medonosná se vyskytuje po celém světě a hraje významnou roli v zemědělství, protože mnoho zemědělských plodin závisí na opylování prováděném především včelou. I proto je včela nedílnou součástí ekosystému a jeho stability. Virové infekce včel mohou vést k likvidaci včelích kolonií a tím i celkovému poklesu výskytu včel. To způsobuje velké finanční ztráty v zemědělství a narušuje ekosystém (Brutscher, McMenemy et al. 2016, Gisder and Genersch 2017). K rychlejšímu a efektivnějšímu přenosu včelích virů napomáhá i vnější parazit včely, kleštíček včelí (*Varroa destructor*) (Traynor, Mondet et al. 2020).

Viry z čeledi *Iflaviridae* mají neobalené virové partikule, ikosahedrálního tvaru s T = 3 symetrií a velikostí 30-40 nm. Genom kóduje jeden polyprotein, který je během transkripce i po transkripci rozdělen na funkční jednotky proteázami, které si virus kóduje. Vznikají tak strukturní proteiny a proteiny (VP1, 2, 3), které slouží k tvorbě nových virů. Přítomnost VP4 strukturního proteinu nebyla prokázána ani u SBV ani u DWV. V 5' UTR se nachází IRES. 3' konec je polyadenylován. Studium struktury a pochopení, jakým způsobem viry uvolňují svoji genetickou informaci, jsou stěžejní pro vývoj terapeutik, které zabrání šíření



virů. Tuto práci komplikuje fakt, že pro včelí model neexistuje žádná stabilní tkáňová kultura. Vytvořené modely a přístupy jsou testovány na jednotlivých včelách, popřípadě jejich koloniích.

V práci byly použity dva zástupci včelích pikornavirů:

**Virus pytlíčkovitého plodu** (Sacbrood virus-CZ, SBV-CZ,)

**Virus deformovaných křídel** (Deformed wing virus, DWV).

### 1.3.3 Modifikace ve virech

Přítomnost RNA modifikací ve virové gRNA nebo mRNA má různý vliv na mechanismus tvorby viru. Některé modifikace narušují klasické Watson-Crick párování bází (m<sup>1</sup>A, I). Díky tomu mohou být tyto modifikované báze při přepisu RT nebo RNA-dependentní-RNA polymerázou „chybně“ přečteny a spárovány s jinou bází (Potapov, Fu et al. 2018). Stejná situace může nastat i během translace. V posledních letech je velmi studována i přítomnost a/nebo absence m<sup>6</sup>A a jeho vliv na životní cyklus viru.

#### 1.3.3.1 5-methylcytidin (m<sup>5</sup>C)

Přítomnost m<sup>5</sup>C byla prokázána u některých retrovirů, kde je podle všeho zodpovědná za zvýšení genové exprese. Bylo popsáno, že buněčná methyltransferáza (NSUN2) je schopná methylovat též virový transkript a tím ovlivnit jeho životní cyklus. Inhibice této methyltransferázy vedla ke snížení počtu m<sup>5</sup>C míst ve virové RNA a dále inhibici translace HIV-1 (Courtney, Tsai et al. 2019). I v případě viru myší leukemie (murine leukemia virus, MLV) došlo inhibicí NSUN2 ke snížení produkce viru (Courtney, Chalem et al. 2019). 5-methylcytidin byl potvrzen i v genomové RNA SARS-Cov-2 (Kim, Lee et al. 2020).

## 2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

V nedávné době byly u mRNA popsány různé modifikace. Informace o množství a typu modifikací se s přesnějšími technikami mění. Testovaná mRNA, bývá často kontaminována více zastoupenými a více modifikovanými nekódujícími RNA. Viry mají jednoduchou vnitřní organizaci a obsahují menší množství, většinou dobře popsaných RNA. V případě (+)ssRNA virů slouží genomová RNA rovněž jako mRNA. Díky tomu se viry jeví jako ideální modelový systém pro získání informací o nových RNA modifikacích a zároveň k pochopení funkce modifikací již popsaných. V současné době je asi nejlépe prostudovanou a nejvíce zastoupenou modifikací v mRNA *N*<sup>6</sup>-methyladenosin. V posledních letech byla několika skupinami prezentována přítomnost 1-methyladenosinu v mRNA. V závislosti na technice provedení experimentu se množství m<sup>1</sup>A pohybovalo od tisíců po jednotky pozic v mRNA. Přesná funkce m<sup>1</sup>A v mRNA však nebyla dokonale popsána a výskyt m<sup>1</sup>A ve virech v době tvorby práce publikován nebyl. Proto se práce zaměřuje přednostně na tuto metylaci.

Cíle práce:

- I. Připravit dostatečné množství čistých virových partikulí HIV-1 pro izolaci RNA.
- II. Vytvoření vhodné LC-MS metody k detekci adenosinových modifikací v RNA izolované HIV-1 a jejich kvantifikaci.
- III. Vytvoření mapovací techniky pro m<sup>1</sup>A (RNA-seq) a stanovení původu a pozici methylace.
- IV. Zhodnocení významu methylace na kompozici RNA obsažených ve virové partikuli HIV-1
- V. Připravit dostatečné množství čistých virových partikulí pro izolaci RNA vybraných pikornavirů.
- VI. Vytvoření vhodné LC-MS metody k detekci methylací RNA vybraných pikornavirů a jejich kvantifikaci.
- VII. Aplikace sekvenačních technik pro získání informace o pozici testovaných modifikací.
- VIII. Zhodnocení významu testovaných methylací na RNA kompozici virové partikule vybraných pikornavirů.

### 3. METODIKA

#### 3.1 Příprava virových partikulí HIV-1

Příprava virových partikulí HIV-1 probíhala v BSL-3 laboratoři Virologie ÚOCHB, Praha. Virové partikule byly připraveny RNDr. Janou Trylčovou, Ph.D. a Ing. Barborou Benoni.

#### 3.2 Příprava pikornavirů

Pikornaviry byly připraveny v laboratoři Strukturní virologie doc. Mgr. Pavla Plevky, Ph.D. (CEITEC, Brno). SBV virové partikule byly připraveny Mgr. Karlem Škubníkem, Ph.D. a DWV virové partikule byly připraveny Mgr. Michaelou Procházkovou, Ph.D.. Lidské pikornaviry (E18 a RV2) byly připraveny Mgr. Lenkou Šmerdovou, Ph.D..

#### 3.3 LC-MS RNA z HIV-1

Izolovaná RNA (1-4  $\mu\text{g}$ ) byla plně rozložena za použití nukleázy P1 (NuP1) a alkalické fosfatázy (CIP) na nukleosidy. První reakce probíhala ve 40  $\mu\text{L}$  pufru octanu amonného, pH 4,5; 50 mM za přítomnosti NuP1 (1 U/ $\mu\text{g}$  RNA, Sigma-Aldrich) 1 h, 37 °C. Dále byl ke směsi přidán CutSmart pufr (výsledná koncentrace 1x, NEB) a alkalická fosfatáza (1 U/ $\mu\text{g}$  RNA, NEB) a reakce pokračovala další hodinu při 37 °C. Dále byly vzorky naředěny LC-MS vodou na 200  $\mu\text{L}$  a přečištěny na kolonkách Microcon®-10kDa (Merck). Část, která prošla přes filtr, byla zakoncentrována pomocí systému SpedVac na objem 20  $\mu\text{L}$ . Takto připravené vzorky obsahující nukleosidy byly nanášeny na kolonu.

Všechny vzorky byly měřeny v technických duplikátech. Kapalinová chromatografie byla provedena na systému I-Class (Waters) s kolonou C18 (Acquity UPLC® BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$ , 15 cm, Waters). Na vyhřátou kolonu (40 °C) bylo nanášeno 8  $\mu\text{L}$  vzorku a separace probíhala na gradientu vody (A) a acetonitrilu (B), obojí obsahovalo 0,1 % (v/v) kyseliny mravenčí (Tab. 1) (Su, Chan et al. 2014).

Tab. 1: Gradient voda : acetonitril použitý při kapalinové chromatografii.

čas	voda (A)	acetonitril (B)	průtok
0-6 min	100 %	0 %	0,5 ml/min
6-7,5 min	100-99 %	0-1 %	0,5 ml/min
7,5-9 min	99-94 %	1-6 %	0,5 ml/min
9,5-15 min	94 %	6 %	0,5 ml/min
15-25 min	94-50 %	6-50 %	0,5 ml/min
25-27 min	50-20 %	50-80 %	0,5 ml/min
27-29,5 min	20 %	80 %	0,5 ml/min
29,5-30 min	20-100 %	80-0 %	0,5 ml/min
30-40 min	100 %	0 %	0,5 ml/min

Kapalinová chromatografie byla spojena s tandemovým hybridním hmotnostním spektrometrem (Synapt G2, Waters) s ESI (elektrosprej) iontovým zdrojem a využívajícím kvadrupólový průletový hmotnostní analyzátor. Ionty přicházející na analyzátor byly skenovány v pozitivním módu v rozsahu m/z 100-1200. Parametry nastavení zdroje ionizace byly: kapilární napětí 3kV, teplota zdroje 150 °C, sampling cone 40, extraction cone 5, teplota desolvatace 450 °C, desolvatační průtok 600 L/h. Hodnoty všech uvedených parametrů byly získány experimentálně na základě optimální odezvy pro standard m<sup>6</sup>A.

Všechny hmotnostní chromatogramy byly analyzovány softwarem MassLynx V4.1. Směs nukleosidů (m<sup>1</sup>A, m<sup>6</sup>A, Am, A, t<sup>6</sup>A) byla nanášena na kolonu ve třech různých množstvích (64, 320, 1600 fmol každý),

aby se ověřila síla signálu za dané ionizace pro každý testovaný standard. Směs byla testována v technických triplicátech. Pro každý testovaný nukleosid byl extrahován chromatogram (Extracted ion chromatogram, EIC) na základě majoritního fragmentu (fragmentace bylo dosaženo již ve zdroji). Chromatografické píky EIC byly integrovány a plocha píku (plocha pod křivkou, area under curve, AUC) byla použita k výpočtu efektivity ionizace testovaných nukleosidů.

### 3.4 LC-MS RNA izolované z vybraných pikornavirů

Vzorky pikornavirů (1-10 µg) byly enzymaticky rozloženy, zpracovány a analyzovány podle stejného protokolu popsaného v předešlé sekci.

Všechny hmotnostní chromatogramy byly analyzovány softwarem MassLynx V4.1. Směs komerčně dostupných standardů od každé kanonické báze a jejich mehtylací (A, m<sup>1</sup>A, m<sup>6</sup>A, Am, G, m<sup>1</sup>G, m<sup>2</sup>G, m<sup>7</sup>G, Gm; C, m<sup>3</sup>C, m<sup>5</sup>C, Cm; U, m<sup>5</sup>U, Um) byla naměřena v poměru 100 x kanonická báze ku 1 x methylované báze. Takto připravené vzorky standardů byly proměřeny v triplicátech, za stejných podmínek jako vzorky virů, pro stanovení odezvy za daných ionizačních podmínek. Následná analýza chromatogramů byla provedena stejným způsobem, jaký je popsán v předešlé části. Chromatografické píky majoritních fragmentů byly integrovány a AUC byla použita k přepočtu množství modifikace na 100 nemodifikovaných nukleosidů.

### 3.5 Mapování m<sup>1</sup>A

Knihovny byly připravovány kombinací tří protokolů (Dominissini, Nachtergaele et al. 2016, Tserovski, Marchand et al. 2016, Winz, Cahová et al. 2017).

Chemická fragmentace byla použita k získání RNA fragmentů o velikosti 50-200 nt. Vzorky RNA (1-2 µg) byly inkubovány ve fragmentačním pufru (100 mM ZnCl<sub>2</sub> in 100 mM Tris-HCl pufru, pH 7,4) při 75 °C po dobu jedné minuty. Reakce byla zastavena přidáním EDTA (výsledná koncentrace 50 mM). Vzorky byly vysráženy ethanolem a velikost fragmentů byla zkontrolována HS RNA Screen Tape<sup>®</sup>. Polovina každého vzorku byla inkubována s alkalickým pufrům (50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, pH 10,4) 1 hodinu při 60 °C, aby bylo dosaženo co nejvyšší konverze m<sup>1</sup>A na m<sup>6</sup>A pomocí Dimrothova přesmyku. Vzorky byly přečištěny na kolonkách RNA Clean and Concentration columns (Zymo) a analyzovány HS RNA Screen Tape<sup>®</sup>. Takto upravené vzorky slouží jako negativní kontrola a dále s nimi bylo nakládáno stejným způsobem.

Vzorky fragmentované RNA byly denaturovány při 90 °C po dobu 30 s. Následně byly zchlazeny na ledu a defosforylovány. Defosforylace probíhala v defosforylačním pufru (výsledná koncentrace 100 mM Tris-HCl, pH 7,4; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mg/mL BSA a 100 mM 2 - mercaptoethanol) po přidání 0,5 U FastAP alkalické fosfatázy (ThermoFisher Scientific) po 30 minut při 37 °C. Celý proces byl opakován a na závěr byla provedena deaktivace enzymu teplem při 75 °C po dobu 5 minut.

Ligace adaptoru na 3' konec RNA byla provedena při 4 °C po dobu 72 hodin v defosforylačním pufru, který navíc obsahoval 15 % DMSO, 5 µL adenylovaný 3' RNA adaptor; 0,5 U/µL T4 RNA ligázu (ThermoFisher Scientific) a 1 U/µL T4 RNA ligázu 2 truncated (NEB). Reakce byla zastavena zahřátím na 75 °C po dobu 15 minut. Nenavázaný 3' adaptor byl odstraněn 5'-deadenylázou (NEB) a lambdou exonukleázou (ThermoFisher Scientific). Celá směs byla vysrážena ethanolem.

Pro přesnější určení místa, kde se nachází m<sup>1</sup>A byly pro reverzní transkripci zvoleny dvě různé reverzní transkriptázy, SuperScript III a TGIRT<sup>™</sup>-III.

Reverzní transkripce s enzymem SuperScript III (ThermoFisher Scientific, 10 U/µL) byla provedena v 30 µL směsi obsahující First-Strand Buffer (1 x), RT-primer (5 µM), dNTP mix (0,5 mM výsledná koncentrace), DTT (5 mM) a BSA (50 µg/µL). reakční směs byla zahřáta na 50 °C po dobu 1 hodiny.

Nadbytečný RT-primer byl odstraněn kombinací enzymů (Lambda exonukleáza, exonukleáza 1 a FastAP alkalická fosfatáza (vše ThermoFisher Scientific). RNA byla degradována pomocí NaOH a reakční směs byla srážena ethanolem.

Reverzní transkripce enzymem TGIRT™-III (InGen, 1 U/μL, 500 nM) byla pre-inkubována v 19 μL reakčního pufru (450 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) s přidavkem DTT (5 mM) a RT-primer (5 μM) po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byla přidána směs dNTP (výsledná koncentrace každého 1,25 mM) a reakce dále probíhala při 60 °C 50 minut. Reakce byla zastavena přidavkem 1 μL 5 M NaOH a inkubací při 95 °C po dobu 3 minut. Vzorky byly neutralizovány přidavkem 1 μL 5 mM HCl a sráženy ethanolem.

Prodloužení vzniklé cDNA na 3'-konci bylo provedeno použitím 1 U/μL enzymu deoxynukleotidyl transferázy (TdT, ThermoFisher Scientific). Reakce probíhala v 1x TdT pufru obsahujícím navíc 1,25 mM CTP po dobu 30 minut při 37 °C. Reakce byla zastavena zahřátím na 75 °C po dobu 10 minut.

Ligace dsDNA kotvy (1,25 mM) probíhala v 50 mM Tris-HCl pufru (pH 7,4), který dále obsahoval 10 μM ATP a 20 mM MgCl<sub>2</sub> pomocí enzymu T4 RNA ligázy (1,5 U/μL) při 4 °C 72 hodin. Reakce byla zastavena zahřátím na 65 °C po dobu 10 minut, vzorky byly sráženy ethanolem a rozpuštěny ve 12 μL vody (voda pro molekulární biologii).

PCR amplifikace byla provedena se značenými PCR primery (barcoded primers) v 38 cyklech. Reakce probíhala v 1 x ThermoPol reakčním pufru (NEB) s přidavkem 5 μM obou značených primerů, 0,5 mM dNTP (každý) a 0,25 U TaqDNA polymerázy (NEB) a celková reakční směs měla 20 μL. Počáteční denaturace byla provedena při 95 °C po dobu 60 s, annealing 60 s 54 °C, elongation 60 s 68 °C, a denaturace 30 s 95 °C. Závěrečné 68 °C 5 min.

Vzorky po PCR byly naneseny na 1,3 % agarózový gel (140 V, 2 hodiny). Fragmenty mezi 100-400 nt byly vyřezány z gelu a DNA byla extrahována z gelu pomocí kytu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

### 3.6 Bisulfitové sekvenování

Pro zjištění pozice m<sup>5</sup>C v gRNA včelích virů byla vytvořena metoda na základě bisulfitového sekvenování. Po chemické fragmentaci (popsáno výše) byly vzorky rozděleny na dvě části. Jedna část každého vzorku byla použita pro bisulfitovou konverzi, provedenou Ing. Veronikou Romanskou. Tato konverze probíhala za použití kytu EZ RNA Methylation™ Kit (Zamo Res. Com.) podle protokolu dodaného výrobcem. Kvalita vzorku byla testována HS RNA Screen Tape® a množství bylo zjištěno RNA High Sensitivity Assay. Vzorky byly sráženy ethanolem.

Všechny vzorky byla dále použity pro přípravu sekvenační knihovny, od kroku s navázáním pre-adenylovaného adaptoru, jak je popsáno v předchozí sekci.

### 3.7 Northern blot analýza

RNA izolovaná z virových partikulí HIV-1 a RNA izolovaná z neinfikovaných MT4 buněk byla rozdělena na dvě části. Jedna část byla fragmentována, jak je popsáno v sekci mapování m<sup>1</sup>A. Denaturační 20 % polyakrylamidový gel (8 x 10 cm, 1 mm silný) byl připraven ze směsi 19:1 akrylamid : bis-akrylamid v 0,5 x MOPS pufru (zásobní roztok viz materiál) a 7 M močovina. Pro ustálení podmínek byl polymerizovaný gel zapojen do systému v 0,5 x MOPS pufru po dobu 30 minut při 100 V. 15 μL vzorku RNA (400-600 ng RNA na vzorek obsahující 7,3 % formaldehydu, 50 % formamidu, 0,5 x MOPS pufr a 0,01 % bromfenolové modři) bylo denaturováno 15 min při 55 °C a naneseno do jamek na gelu. Pro zahuštění vzorku v jamkách gelu byly výchozí podmínky nastaveny na 50 V po dobu 15 minut, následně bylo napětí upraveno na 150 V po dobu, než bromfenolová modř dosáhla 90 % délky gelu. Rozdělené úseky RNA byly z gelu přeneseny na nabitou nylonovou membránu (Amersham Hybond – N+; GE Healthcare) kapilárním transferem provedeném ve 20 x SSC pufru přes noc. Membrána byla dvakrát

crosslinkována (120 mJ, 30 s) pomocí elektronického UV crosslinkeru (Ultralum). Poté byla membrána hybridizována v 10 mL Church pufru při 45 °C 1 hodinu (ProBlot hybridizační píčka, Labnet).

Próba (5 µL ze 100 µM zásobního roztoku) byla radioaktivně značena použitím 20 U T4 polynukleotidyl kinázy (NEB), 2 µL  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP (3.3 µM, 10 µCi/µL; Hartmann analytic) v 20 µL kinázovém pufru. Reakce probíhala při 37 °C, 30 min. Reakce byla zastavena ohřátím na 65 °C po dobu 5 minut a próba byla přečištěna od nadbytečného radioaktivně značeného trifosfátu na kolonkách Micro Bio-Spin P-30 (BioRad). Značená próba byla přidána k membráně s novým Church pufrům (10 mL) a hybridizována při 45 °C přes noc. Nenavázaná próba byla dvakrát 10 min vypláchnuta LS pufrům a následně HS pufrům, vše při 45 °C. Membrána byla zatavena do folie, inkubována v desce pro zobrazení radioaktivně značeného fosforu (GE Healthcare) a přečtena pomocí přístroje Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare).

### 3.8 Bioinformatická analýza

Bioinformatická analýza v projektu HIV-1 byla provedena Mgr. Janem Pačesem, Ph.D.. V projektu pikornavirů byla bioinformatická analýza provedena Mgr. Janem Pačesem, Ph.D. a Mgr. Lenkou Gahurovou, Ph.D..

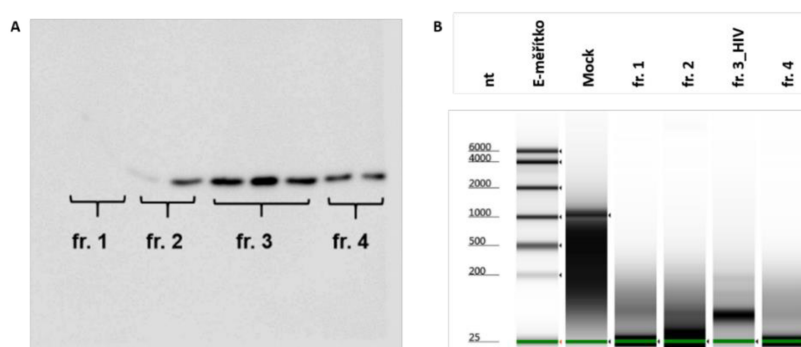
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Studium RNA modifikací ve virové RNA z HIV-1

První část práce se zabývá studiem RNA modifikací RNA získané z HIV-1 virových partikulí.

#### 4.1.1 Analýza RNA izolované z HIV-1 virových partikulí

HIV-1 virové partikule byly připraveny infekcí MT4 buněk a následně izolovány z kultivačního media. Virové partikule byly přečištěny na sacharózovém polštáři a iodolovém gradientu. Přítomnost HIV partikulí byla testována analýzou Western blot (Obr. 2A). Tato část práce byla provedena v laboratoři Virologie (ÚOCHB, Praha) RNDr. Janou Trylčovou Ph.D. a Ing. Barborou Benoni.

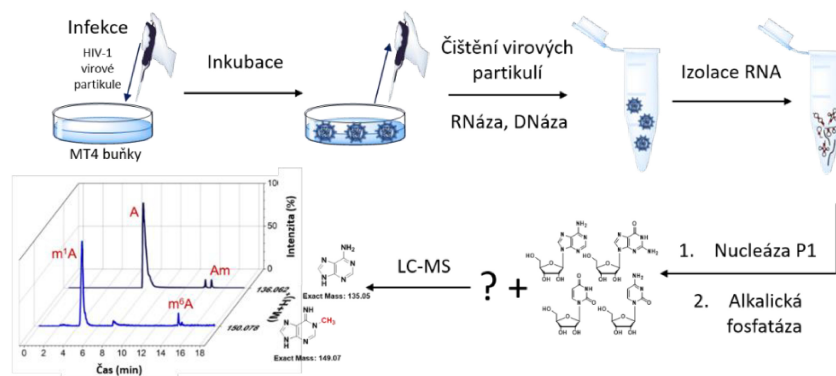


Obr. 2: (A) Analýza Western blot vzorků HIV-1 získaných po gradientovém přečištění Optiprep. (B) HS RNA SreenTape analýza vzorků HIV. Mock je kontrolní vzorek a jedná se o označení pro RNA izolovanou ze supernatantu neinfikovaných MT4 buněk.

Případné zbytky buněčné RNA a DNA, které nejsou součástí virové partikule, byly odstraněny použitím RNázy a DNázy. Stejný proces byl použit pro neinfikované MT4 buňky a jejich supernatant (Mock). Tyto vzorky byly použity jako negativní kontrola (Obr. 2B). RNA z HIV-1 virových partikulí byla získána pomocí RNazolu. Kvalita získané RNA byla testována na HS RNA SreenTape (Obr. 2B). Přítomnost gHIV RNA byla potvrzena metodou Real-time PCR.

Vzorky RNA byly dále vysráženy ethanolom a naštěpeny do formy nukleosidů pomocí nukleázy P1 a alkalické fosfatázy. Směs nukleosidů byla analyzována LC-MS systémem (Synapt G2) (Obr 3).

Pro ověření správnosti identifikace analyzovaných kanonických i modifikovaných nukleosidů byly také analyzovány synteticky připravené standardy, které poskytují stejné fragmentační spektrum a jsou eluovány ve stejném čase, jako nukleosidy testované.



Obr.3: Schematické znázornění přípravy vzorků HIV-1 pro LC-MS analýzu.

Pomocí LC-MS analýzy byly detekovány methylované adenosiny. Všeobecně nejhojněji se vyskytující methylovaný adenosin m<sup>6</sup>A byl v RNA izolované z virových partikulí HIV-1 zastoupen ve velmi malém množství, pouze kolem 1 % (Tab. 2A). Oproti tomu množství m<sup>1</sup>A bylo poměrně vysoké, okolo 4,1 % všech adenosinů přítomných v různých RNA obsažených ve virové partikuli (Tab. 2A). Z dalších známých adenosinových modifikací byly potvrzeny pouze Am, t<sup>6</sup>A a mS<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A (Tab. 2A). Některé další byly obsaženy stopově a jejich přítomnost byla určena pouze na základě m/z, bez testování standardů.

Tab. 2: (A) Poměry množství adenosinových modifikací v HIV-1 vzorcích měřených LC-MS (čtyři biologické replikáty). (B) Poměry množství adenosinových modifikací ve vzorcích supernatantu neinfikovaných MT4 buněk (Mock, jedno kontrolní měření).

\*Za předpokladu, že mS<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A má stejné ionizační podmínky jako t<sup>6</sup>A.

A		B	
Nukleosidy *	%	Nukleosidy *	%
A	89,3 ± 2,0	A	98,8
m <sup>1</sup> A	4,1 ± 1,0	m <sup>1</sup> A	0,1
m <sup>6</sup> A	1,1 ± 0,2	m <sup>6</sup> A	0
Am	0,9 ± 1,0	t <sup>6</sup> A	0,5
t <sup>6</sup> A	3,2 ± 0,8	Am, mS <sup>2</sup> t <sup>6</sup> A	0,6
mS <sup>2</sup> t <sup>6</sup> A	1,5 ± 0,9 *		

Aby bylo potvrzeno, že nalezené modifikované adenosiny opravdu pocházejí z RNA obsažené ve virové partikuli, byl připraven kontrolní vzorek. Ten byl získán stejnou úpravou supernatantu z neinfikovaných MT4 buněk (Mock). Takto získaná RNA byla podrobena stejnému postupu přípravy na hmotnostní analýzu jako vzorky virových partikulí. Následná analýza prokázala pouze stopové množství modifikovaných adenosinů (Tab. 2B). To potvrdilo hypotézu, že modifikované adenosiny nalezené ve vzorcích infikovaných HIV-1 skutečně pochází z RNA obsažených ve virové partikuli.

Na základě informací z literatury o přítomnosti a počtu jednotlivých RNA obsažených ve virové partikuli HIV-1 (dvě genové RNA, 14 kopií 7SL RNA a zhruba 70 kopií tRNA) (Obr 4A, B) (Bilbille, Vendeix et al. 2009, Kleiman, Jones et al. 2010, Telesnitsky and Wolin 2016) a údaji o množství m<sup>1</sup>A získaných přepočtem z hmotnostní spektrometrie bylo dopočítáno, že na jednu virovou partikuli spadá zhruba 340 m<sup>1</sup>A (Obr. 4C). Přítomnost m<sup>1</sup>A byla doposud prokázána pouze u různých tRNA (pozice 58 v tRNA<sup>Lys</sup>), což by vedlo k závěru, že 270 m<sup>1</sup>A modifikací připadá na další RNA ve virové partikuli obsažených.

A				B	
Typ RNA	Počet kopií RNA na základě literatury	Délka (nt)	Počet A na sekvenci (nt)		
HIV-1 gRNA	2	9181	3272		
7 SL RNA	14	299	56		
tRNA <sup>Lys TTT-3.1</sup>	8	76	15		
tRNA <sup>Lys CTT-2.1</sup> + tRNA <sup>Lys CTT-1.1</sup>	12	76	15		
Další tRNA	50	Průměr 76	15		

C

$$x = m^1A = 4,1 \% n$$

$$n = \sum A = (2 \cdot 3272) + (14 \cdot 56) + (70 \cdot 15) = 8378$$

$$x = 343 m^1A$$

Obr. 4: Zastoupení jednotlivých typů RNA ve virové partikuli (A) Tabulka zastoupení RNA a počtu adenosinů v jednotlivých typech RNA obsažených v HIV-1 virové partikuli. (B) Schematické znázornění zastoupení jednotlivých typů RNA v HIV-1 virových partikulích. (C) Počet m<sup>1</sup>A molekul na jednu virovou partikuli. Výpočet na základě hmotnostní analýzy, vztažený na publikovaná data.

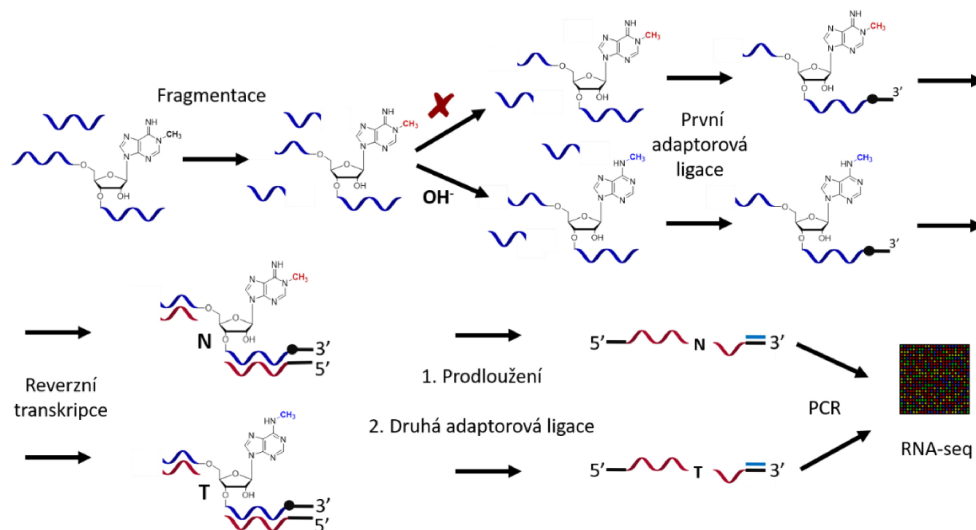


## 4.1.2 Mapování m<sup>1</sup>A

Pro ověření, z jaké RNA m<sup>1</sup>A pochází a ověření pozice v sekvenci bylo nutné vytvořit mapovací techniku. K tomuto účelu byla využita kombinace několika protokolů používající metodu založenou na reverzní transkripci (Dominissini, Nachtergaele et al. 2016, Tserovski, Marchand et al. 2016, Winz, Cahová et al. 2017). RNA pro přípravu knihoven pocházela ze třech biologických vzorků. Každý vzorek byl rozdělen na dvě části. Jedna část byla vystavena vlivu zásaditého prostředí k získání konverze m<sup>1</sup>A na m<sup>6</sup>A (Dimrothův přesmyk).

N<sup>6</sup>-methyladenosin je reverzní transkriptázou čten jako A, proto upravený vzorek sloužil jako negativní kontrola. Pro přípravu třech sekvenačních knihoven byla použita reverzní transkriptáza SuperScript™ III. Ta by při styku s m<sup>1</sup>A měla ukončit transkripci, popř. m<sup>1</sup>A chybně přečíst a vložit do přepisovaného řetězce jiný nukleotid (tzv. misreading). Pro jednu knihovnu byla použita reverzní transkriptáza TGIRT™, která by přítomnost m<sup>1</sup>A v řetězci měla potvrdit vložení jiného nukleotidu.

Pro přípravu sekvenační knihovny byly použity následující kroky (Obr. 5): Různě dlouhá RNA získaná z virových částic byla podrobena chemické fragmentaci pro získání zhruba 100 nt dlouhých fragmentů. Defosforylací byla zajištěna jednota 3' konců RNA fragmentů a byla provedena ligace prvního adaptoru na 3' konec. Následovala reverzní transkripce, prodloužení řetězce CTP (cytidintrifosfátem) a ligace druhého adaptoru. Dále byla provedena PCR se značenými primery a reakční směs byla rozdělena na agarózovém gelu. Z gelu byly vyřezány fragmenty odpovídající velikosti 100-350 nt (včetně adaptorů). Vzorky izolované z gelu byly odeslány na sekvenování technologií IonTorrent.



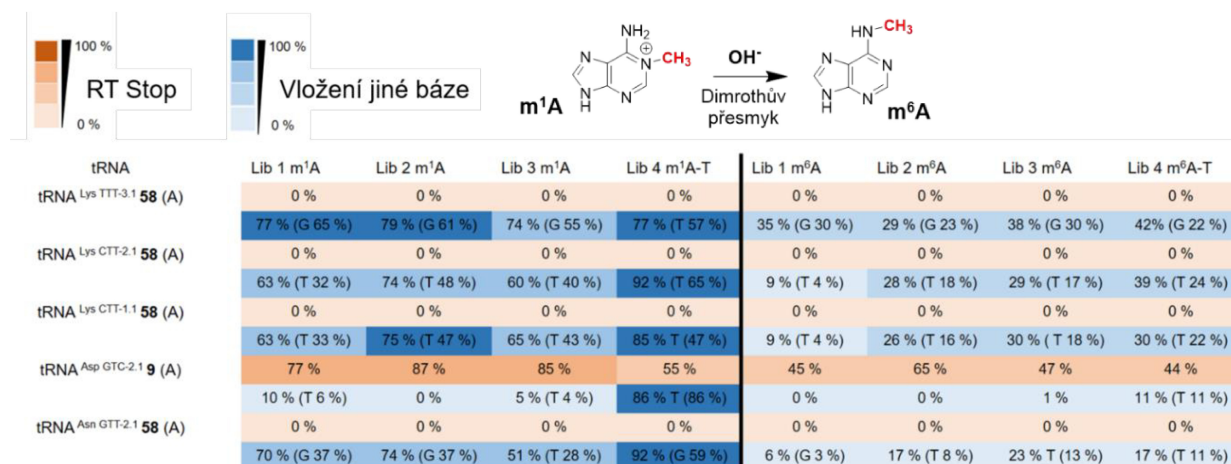
Obr. 5: Schématické znázornění postupu přípravy sekvenačních knihoven.

Bioinformatickou analýzou dat (provedenou Mgr. Janem Pačesem Ph.D.) získaných ze sekvenačních knihoven, bylo potvrzeno, že virová částice HIV-1 obsahuje převážně tRNA, 7SL RNA a genomovou HIV-1 RNA. Všechny ostatní buněčné RNA se vyskytovaly v zanedbatelném množství (0,1 %).

Analýzou získaných dat se dále podařilo identifikovat m<sup>1</sup>A v pozici 58 u tRNA<sup>Lys</sup> TTT-3.1., tRNA<sup>Lys</sup> CTT-2.1, tRNA<sup>Lys</sup> CTT-1.1 a tRNA<sup>Asn</sup> GTT-2.1 a v pozici 9 u tRNA<sup>Asp</sup> GTC-2.1. Literatura uvádí, že v případě, že reverzní transkriptáza narazí na m<sup>1</sup>A, zastaví svou činnost (Hauenschild, Tserovski et al. 2015). Dále byly popsány situace, kdy docházelo k chybnému přečtení m<sup>1</sup>A a přepis pokračoval (Hauenschild, Tserovski et al. 2015, Kietrys, Velema et al. 2017). Naše data prokazovala obě varianty v závislosti na pozici m<sup>1</sup>A. Inkorporace chybného nukleosidu v transkriptu byla v našich datech pozorována u m<sup>1</sup>A v pozici 58 u některých tRNA. Asi 70 % těchto pozic bylo v případě obou testovaných transkriptáz chybně přečteno (Obr. 6, znázorněnou

modrou barvou) jako G nebo T [SuperScript™ III. - knihovna 1-3 (Lib 1-3), TGIRT™ – knihovna 4 (Lib 4)]. V kontrolních vzorcích, které byly vystaveny alkalickému prostředí, byl v pozici 58 pozorován stejný jev pouze z 30 % (Obr. 6), což odpovídá předpokládané konverzi m<sup>1</sup>A na m<sup>6</sup>A ve vzorcích RNA. Zároveň se také jedná o potvrzení skutečné přítomnosti m<sup>1</sup>A v této pozici. Přítomnost jiného modifikovaného adenosinu by sice mohla vyvolat vložení chybného nukleosidu, ale tento poměr by se po vystavení vzorku alkalickému prostředí nezměnil.

V pozici 9 u tRNA<sup>Asp</sup> GTC-2.1 byl pozorován stejný fenomén, tedy vložení chybného nukleosidu (převážně T) pouze v případech, kde byla použita TGIRT™ reverzní transkriptáza. Vzorky, ve kterých byla použita SuperScript™ III ukazovaly v této pozici zastavení transkripce, a to ze zhruba 85 % (Obr 6, oranžová barva).



Obr. 6: Tabulka zobrazující četnost zastavení transkripce (oranžová barva) a vložení jiného nukleotidu do transkriptu (modrá barva) u nejvíce zastoupených tRNA v připravených knihovnách. Pro přípravu knihovny (Lib) Lib 1-3 bylo použito SuperScript™ III RT a pro Lib 4-T byla použita TGIRT™ reverzní transkriptáza.

Pro potvrzení, že takto vytvořený protokol na mapování m<sup>1</sup>A funguje i na dlouhé RNA, byla vytvořena kontrolní knihovna s použitím 28S rRNA z buněk HEK293T. V případě této RNA bylo pozorováno zastavení transkripce v pozici m<sup>1</sup>A 1317 u obou reverzních transkriptáz (ze zhruba 80 % v případě SuperScript™ III a okolo 50 % v případě TGIRT™). V experimentech, kde byla použita TGIRT™ RT bylo dále pozorováno inkorporování chybného nukleotidu, G.

Tyto výsledky nás přivedly k závěru, že chování RT závisí nejen na typu RNA, ale také na sekvenci a prostorovém uspořádání RNA. Ve všech experimentech s oběma RT však ukončení transkripce nebo vložení náhodného nukleotidu potvrzuje přítomnost m<sup>1</sup>A v RNA.

Kromě zastavení transkripce a vložení chybného nukleotidu bylo dále publikováno, že methylace adenosinu v pozici 1 je závislá i na sekvenci, konkrétně GUUCNANNC (zvýrazněné A obsahuje methylici) (Safra, Sas-Chen et al. 2017). Tato sekvence byla potvrzena v tRNA v místě výskytu m<sup>1</sup>A, proto byla v datech pro 7SL RNA a genomovou RNA hledána kombinaci všech tří fenoménů; vložení chybného nukleotidu, ukončení přepisu a přítomnost výše uvedené sekvence.

V gRNA bylo nalezeno několik míst s danou sekvencí, přesto ani jedno z těchto míst, kde by mělo být m<sup>1</sup>A neukazovalo výrazné zastavení transkripce ani vložení jiného nukleotidu. Stejně tomu tak bylo i mimo definovanou sekvenci. 7SL RNA obsahovala jeden sekvenční motiv, ale ani zde nebyly pozorovány výrazné změny v transkriptech, které by potvrdily přítomnost m<sup>1</sup>A. Vzhledem k faktu, že se ve virové partikuli nevyskytují ve větším množství žádné další RNA kromě tRNA (Telesnitsky and Wolin 2016), bylo dospěno k závěru, že m<sup>1</sup>A detekován pomocí LC-MS pochází z přibalených hostitelských tRNA.

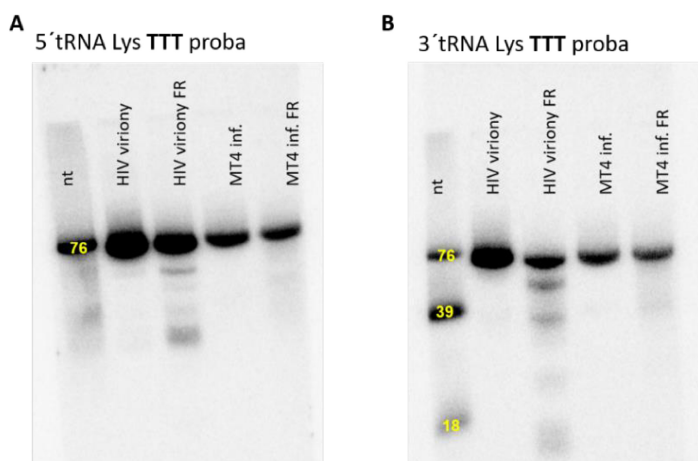
Aby bylo ověřeno, že přečištění HIV-1 virových partikulí na sacharózovém polštáři bylo dostatečné a získaná data neobsahují RNA z možných extracelulárních vezikul (Narayanan, Iordanskiy et al. 2013), byla použita i další metoda dočištění s využitím hustotního gradientu OptiPrep. RNA získaná z virových partikulí dočištěných na hustotním gradientu obsahovala 96 % RNA získané z virových partikulí přečištěných pouze na sacharózovém polštáři. RNA z odpadních frakcí z OptiPrep hustotního gradientu obsahovala 1000x méně genomové HIV-1 RNA. Dále ve frakcích nebyly detekovány žádné tRNA.

Pomocí dat získaných ze sekvenačních knihoven bylo odhaleno, že virová partikule obsahuje zhruba 96 % hostitelských RNA, převážně tRNA. Z této skupiny RNA jsou nejvíce zastoupeny tRNA<sup>Lys TTT-3.1</sup>, zhruba 30 %, dále tRNA<sup>Lys CTT-2.1</sup>, 23 %, tRNA<sup>Lys CTT-1.1</sup>, 16 %, tRNA<sup>Asp GTC-2.1</sup>, 6 % a tRNA<sup>Asn GTT-2.1</sup> 3 %.

#### 4.1.3 Northern blot analýza tRNA z HIV-1 virových partikulí

V sekvenačních datech byla pozorována pouze 3' polovina tRNA<sup>Lys TTT-3.1</sup>. To mohlo být způsobeno přítomností prostorově výrazné modifikace v mS<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A nad antikodonovou smyčkou, která zabránila čtení reverzní transkriptázy nebo to mohlo být způsobeno tím, že virová partikule obsahuje pouze 3' fragment tRNA.

K ověření, která hypotéza je správná, byla využita northern blot analýza tRNA. Radioaktivně značené próby byly navrženy pro 3' konec tRNA<sup>Lys TTT-3.1</sup> a tRNA<sup>Lys CTT-2.1, (1.1)</sup>. Vzhledem k podobnosti sekvencí 5' konce všech tří tRNA, hybridizovala takto navržená próba se všemi zmíněnými. S použitím sekvence tRNA<sup>Lys TTT-3.1</sup> byly in vitro transkripčními připraveny fragmenty definované velikosti (18 nt, 39 nt a 76 nt), které byly použity jako měřítko a pomohly lépe definovat velikost fragmentů na gelu. K potvrzení, zda virová partikule obsahuje pouze fragment tRNA nebo k fragmentaci dochází až v průběhu přípravy knihovny, bylo pro analýzu použita RNA izolovaná z virových partikulí před a po fragmentaci a stejným způsobem byla jako kontrolu použita RNA z infikovaných MT4 buněk. Přítomnost 3' fragmentů byla pozorována pouze u vzorků RNA z virových partikulí po fragmentaci (Obr. 7). Tyto analýzy vedly k závěru, že m<sup>1</sup>A obsažený v RNA pochází z celkové tRNA a k tvorbě fragmentů dochází až v průběhu přípravy knihovny.



Obr. 7: Northern blot analýza RNA izolované HIV-1 virových partikulí před a po fragmentaci (FR) a z HIV-1 infikovaných MT4 buněk (inf.) před a po fragmentaci. (A) Radioaktivně značené próby použity pro 5' konec tRNA<sup>Lys TTT-3.1</sup>. (B) Radioaktivně značené próby použity pro 3' konec tRNA<sup>Lys TTT-3.1</sup>. Žlutá čísla uvádějí velikost fragmentů (v nt) tRNA<sup>Lys TTT-3.1</sup> připravených synteticky podle sekvence tRNA<sup>Lys TTT-3.1</sup>.

Podle literatury (Schopman, van Montfort et al. 2012, Eckwahl, Sim et al. 2015, Eckwahl, Arnion et al. 2016) je tRNA přítomna ve virových partikulích zhruba v 70 kopiích. To však neodpovídá získaným datům v této práci. Zohledníme-li, že pomocí dat ze sekvenačních knihoven se potvrdila přítomnost m<sup>1</sup>A pouze

v tRNA a sloučíme-li tuto informaci s vypočítaným množstvím m<sup>1</sup>A z LC-MS analýzy, dostaneme se na zhruba 10- krát vyšší počet tRNA na virovou partikuli. Na 2 kopie genové RNA, 14 kopií 7SL RNA pak připadá zhruba 770 kopií tRNA. (Obr. 8 A, B)

<p><b>A</b></p> $x = m^1A$ $n = \sum A$ <p>4.1% n= 0.041 n = x  G = 2 gRNA HIV= 6544 A  S = 14 7SL RNA = 784 A  1 tRNA = T= 15 A</p> <p>1/15 T= x  0.067 T= 0.041 n  n = 1.634 T  n = T+784+6544  1.634 T=T+784+6544  0.634 T=7328  T=11558 / 15</p> <p><b>tRNA= 770</b></p>	<p><b>B</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>RNA obsažené ve virové partikuli</th> <th>Počet kopií RNA na základě literatury*</th> <th>Počet kopií RNA na základě LC-MS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>gRNA HIV-1</td> <td>2</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>7 SL RNA</td> <td>14</td> <td>14</td> </tr> <tr> <td>tRNA<sup>Lys</sup> TTT-3.1</td> <td>8</td> <td></td> </tr> <tr> <td>tRNA<sup>Lys</sup> CTT-2.1</td> <td>12</td> <td></td> </tr> <tr> <td>tRNA<sup>Lys</sup> CTT-1.1</td> <td></td> <td>770</td> </tr> <tr> <td>tRNA<sup>Asp</sup> GTC-2.1</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>tRNA<sup>Asn</sup> GTT-2.1</td> <td>50</td> <td></td> </tr> <tr> <td>další tRNA</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	RNA obsažené ve virové partikuli	Počet kopií RNA na základě literatury*	Počet kopií RNA na základě LC-MS	gRNA HIV-1	2	2	7 SL RNA	14	14	tRNA <sup>Lys</sup> TTT-3.1	8		tRNA <sup>Lys</sup> CTT-2.1	12		tRNA <sup>Lys</sup> CTT-1.1		770	tRNA <sup>Asp</sup> GTC-2.1			tRNA <sup>Asn</sup> GTT-2.1	50		další tRNA		
RNA obsažené ve virové partikuli	Počet kopií RNA na základě literatury*	Počet kopií RNA na základě LC-MS																										
gRNA HIV-1	2	2																										
7 SL RNA	14	14																										
tRNA <sup>Lys</sup> TTT-3.1	8																											
tRNA <sup>Lys</sup> CTT-2.1	12																											
tRNA <sup>Lys</sup> CTT-1.1		770																										
tRNA <sup>Asp</sup> GTC-2.1																												
tRNA <sup>Asn</sup> GTT-2.1	50																											
další tRNA																												

Obr. 8: (A) Výpočet tRNA obsažených ve virové partikuli HIV-1 v závislosti na datech získaných LC-MS a RNA-seq, (B) Tabulka srovnávající data získaná z literatury a data prezentovaná v této práci, \*(Telesnitsky and Wolin 2016).

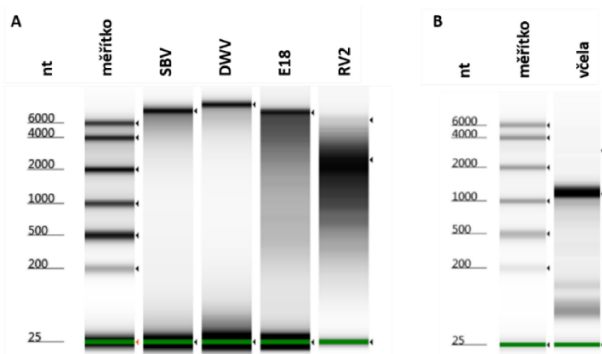
Studiem RNA získané z virové partikule HIV-1 jsme zjistili, že gRNA ani 7SL RNA neobsahují m<sup>1</sup>A. Veškerý detekovaný m<sup>1</sup>A pochází z přibalených hostitelských tRNA. Dále práce přinesla novou metodu výpočtu množství tRNA přítomných ve virové partikuli HIV-1 a tím i nové informace o kompozici RNA ve virové partikuli HIV-1.

## 4.2 Studium RNA methylací ve vybraných pikornavirech

Při studiu RNA získané z HIV-1 nebyla v gRNA HIV-1 potvrzena žádná modifikace. Detekované modifikace pocházely z přibalených tRNA. Pro získání informací o RNA modifikacích ve virové gRNA byl proto zvolen jednodušší model virů, pikornaviry. U pikornavirů byla popsána pouze přítomnost gRNA ve virové partikuli, která slouží zároveň jako mRNA. V práci byli použiti dva zástupci včelích virů a dva zástupci lidských pikornavirů.

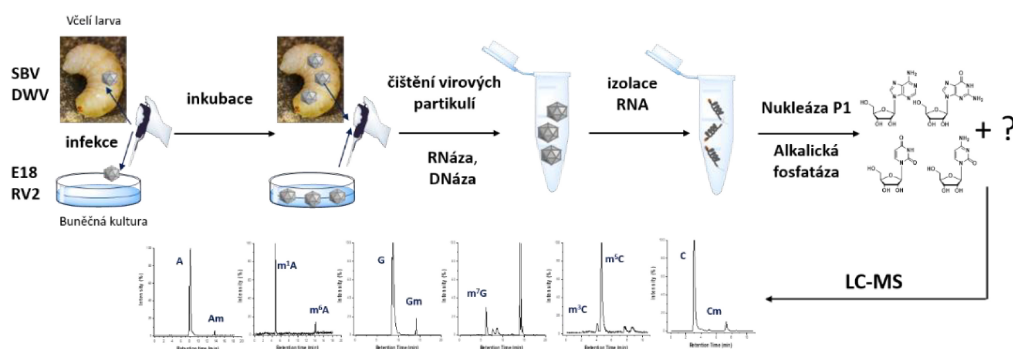
### 4.2.1 Analýza RNA izolované z různých pikornavirů

Virové partikule ze dvou testovaných lidských (E18 a RV2) a dvou včelích (SBV a DWV) byly přečištěny pomocí CsCl gradientu. Jejich čistota byla kontrolována kryoelektronovou mikografií. Aby se zabránilo externí kontaminaci náhodně přibalenými fragmenty RNA a/nebo DNA, byly přečištěné virové partikule podrobeny enzymovému štěpení RNázou a DNázou. Tato část práce probíhala v laboratoři Strukturní virologie (CEITEC, Brno). Virové partikule pikornavirů byly připraveny Mgr. Karlem Škubníkem, Ph.D., Mgr. Michaelou Procházkovou, Ph.D. a Mgr. Lenkou Šmerdovou, Ph.D.. Z takto přečištěných virových partikulí byla izolována RNA pomocí RNazolu. Kvalita získané RNA byla testována HS RNA ScreenTape (Obr. 9A, B).



Obr 9: HS RNA SreenTape analýza vzorků RNA izolované z (A) virových partikulí pikornavirů a (B) včely.

Izolovaná RNA byla štěpena do formy nukleosidů nukleázou P1 a alkalickou fosfatázou. Připravené vzorky byly analyzovány pomocí LC-MS. Naměřené výsledky získané LC-MS analýzou RNA z virů byly porovnány s nukleosidovými standardy ( $m^1A$ ,  $m^6A$ , Am,  $m^1G$ ,  $m^2G$ , Gm,  $m^3C$ ,  $m^5C$ , Cm,  $m^5U$  a Um) (Obr. 10).



Obr. 10.: Schematické znázornění přípravy vzorků pikornavirů pro LC-MS analýzu.

LC-MS analýzou byly detekovány několik modifikací. 2'-O-methylace jsou u mRNA popsány a byly detekovány téměř u všech vzorků. Stejně tak se dala očekávat přítomnost  $m^6A$ . U testovaných lidských pikornavirů se dále nepotvrdila přítomnost žádné další methylace. U testovaných včelích virů byla prokázána přítomnost různých methylací ( $m^1A$ ,  $m^1G$ ,  $m^2G$ ,  $m^5C$ ...), vyskytujících se převážně v tRNA (Tab. 3).

Tab. 3: Přehled detekovaných methylovaných nukleosidů pro SBV, DWV, RV2, E18. Vždy vztaženo na 100 nemodifikovaných nukleosidů. Odstíny modré ilustrují množství zastoupené methylace.

	Genome length (nt)	$m^1A/100A$	$m^6A/100A$	Am/100A	$m^1G/100G$	$m^2G/100G$	$m^3G/100G$	Gm/100G	$m^3C/100C$	$m^5C/100C$	Cm/100C	$m^5U/100U$	Um/100U
<b>SBV</b>	8832	0,06 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,18 ± 0,12	0,08 ± 0,03	0,22 ± 0,08	0,19 ± 0,04	0,66 ± 0,31	0,03 ± 0,04	0,28 ± 0,13	1,00 ± 0,60	0,03 ± 0,04	0,36 ± 0,32
<b>DWV</b>	10071	0,37 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,95 ± 0,06	0,53 ± 0,02	1,32 ± 0,07	0,99 ± 0,01	2,43 ± 0,19	0,16 ± 0,02	1,44 ± 0,02	3,67 ± 1,09	0,60 ± 0,01	1,75 ± 0,16
<b>RV2</b>	7120	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,06	0,20 ± 0,07	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,04	0,90 ± 1,14	0,00	0,00	0,14 ± 0,17	0,00	0,00
<b>E18</b>	7410	0,00	0,00	0,12 ± 0,07	0,00	0,02 ± 0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

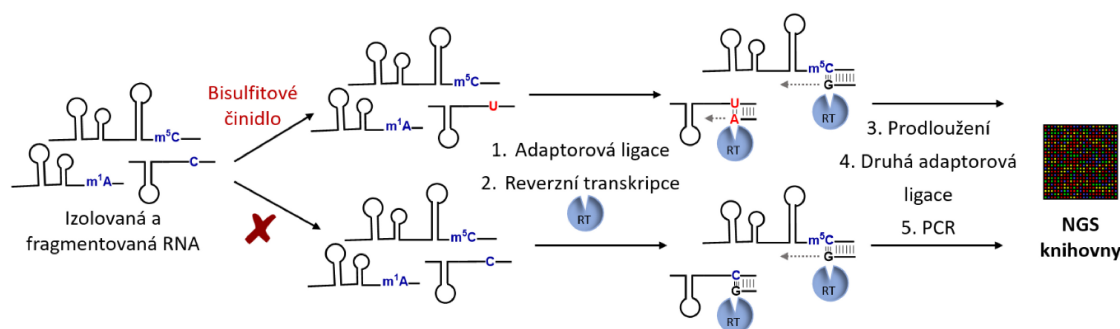
0-0,05    0,05-0,2    0,2-1    1-4    Počet modifikovaných nukleosidů na 100 nemodifikovaných

#### 4.2.2 Mapování $m^1A$ a bisulfitové sekvenování pikornavirů

Pro zjištění pozic  $m^1A$  a  $m^5C$  byly připraveny sekvenční knihovny pro mapování  $m^1A$  (SBV) a  $m^5C$  (SBV a DWV). Pro mapování  $m^1A$  byla použita stejná technika, jako v případě HIV-1. Pro mapování  $m^5C$  bylo



požito bisulfitového sekvenování (Obr. 11). Data z obou připravených knihoven byla namapována na virovou gRNA.



Obr. 11: Schéma bisulfitového sekvenování.

Bioinformatická analýza (provedená Mgr. Janem Pačesem, Ph.D. a Mgr. Lenkou Gahurovou, Ph.D.), nepotvrdila přítomnost  $m^1A$  a  $m^5C$  v gRNA ani u jednoho z testovaných virů. Vzhledem k tomu, že tRNA obsahuje obě zmíněné modifikace a na základě našich zkušeností v předešlé studii s HIV-1, byla data namapována na tRNA hostitelského organismu, včely. Výsledkem bylo potvrzení přítomnosti několika druhů hostitelských tRNA v RNA izolované z virových partikulí SBV i DWV. Bližší analýza nepotvrdila, že by se jednalo pouze o tRNA, které jsou hostitelským organismem nejvíce užívané (Tab. 4). Nejvíce zastoupené byly 3 typy tRNA:  $tRNA^{GlyGCC-1}$ ,  $tRNA^{AspGTC}$  a  $tRNA^{LysTTT}$  v obou včelích virech a dále  $tRNA^{LysCTT}$  v SBV a  $tRNA^{GluCTC}$  v DWV (Tab. 4).

Mapovací technika pro  $m^1A$  prokazatelně nepotvrdila přítomnost  $m^1A$  v genomové RNA SBV. Podařilo se ale potvrdit přítomnost methylace např. pro pozici 59  $tRNA^{LysCTT}$  a pozici 56  $tRNA^{GlyGCC-1}$ . Snížení množství inkorporace chybného nukleotidu pro RNA, která byla ponechána působení zásaditému prostředí, bylo pozorováno pro obě nebo alespoň jednu z použitých reverzních transkriptáz. Chybné vnesení nukleotidu v pozici, kde se nachází A bylo pozorováno i u jiných tRNA a to v pozici, kde se typicky  $m^1A$  vyskytuje (pozice 8 a 10 v  $tRNA^{AspGTC}$  a v pozici 59  $tRNA^{LysTTT}$ ). V obou případech však nebylo pozorováno snížení misinkorporace pro vzorky, které byly vystaveny alkalickému prostředí. To vede k závěru, že na těchto pozicích je jiná modifikace než  $m^1A$ .

Tab. 4: Porovnání zastoupení tRNA detekovaných ve virových partikulích SBV, DWV a včele (užití kodonu včely). Modrá pole vyznačují typy tRNA, které jsou ve shodě s nejvíce užívanými tRNA u hostujícího organismu (včely).

	tRNA v SBV	tRNA v DWV	Užití kodonu včely
1.	Lys CTT	Gly GCC-1	Glu GAA
2.	Gly GCC-1	Asp GTC	Lys AAA
3.	<b>Lys TTT</b>	<b>Lys TTT</b>	Asn AAT
4.	Asp GTC	<b>Glu CTC</b>	Asp GAT
5.	Ala TGC	His GTG	Gln CAA
6.	<b>Glu CTC</b>	<b>Glu TTC</b>	Leu TTA
7.	<b>Glu TTC</b>	Met-1 CAT	<b>Glu GAG</b>
8.	Val AAC	Ala TGC	Ile ATT

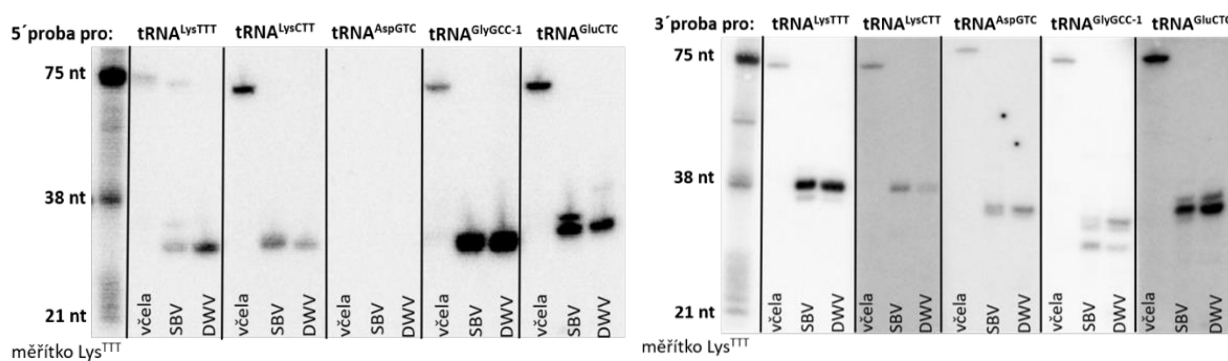
I výsledky bisulfitového sekvenování potvrzují přítomnost některých tRNA v RNA izolované z virových partikulí SBV a DWV. 5-methylcytidin byl potvrzen v nejhodněji zastoupených tRNA obsažených ve virové partikuli včelích virů. V případě SBV byl  $m^5C$  potvrzen např. na pozici 49 v  $tRNA^{GluTTC}$  a dalších.

V případě DWV byl m<sup>5</sup>C potvrzen na pozici 47 v tRNA<sup>GlyGCC</sup>, na pozici 37 v tRNA<sup>AspGTC</sup>, na pozici 49 v tRNA<sup>GluCTC</sup> a v dalších, méně zastoupených tRNA. V případě uvedených tRNA je přítomnost m<sup>5</sup>C ve specifických pozicích pozorována v 98-100 % readů. V genomové RNA byla po bisulfitové reakci v některých pozicích pozorována pouze částečná konverze z C na U (6-7 % pro dané pozice). V těchto případech se ale dá předpokládat, že se jedná pouze o nekompletní bisulfitovou reakci než o přítomnost m<sup>5</sup>C v sekvenci.

Obě sekvenační techniky potvrzují přítomnost m<sup>1</sup>A a m<sup>5</sup>C pouze v přibalených tRNA. Pro další podpoření získaných výsledků byly z hmotnostních chromatogramů získána data o přítomnosti a/nebo absenci dalších modifikací, specifických pro eukaryotní tRNA (t<sup>6</sup>A, mS<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A, i<sup>6</sup>A) pro všechny testované viry. Přítomnost těchto modifikovaných nukleosidů byla potvrzena na základě detekované hmoty a retenčního času pro t<sup>6</sup>A (porovnáním se standardem t<sup>6</sup>A) a na základě spočítané hmoty pro další dvě modifikace (mS<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A, i<sup>6</sup>A). Uvedené modifikace byly pozorovány u obou včelích virů, SBV i DWV. Nebyly však nalezeny v chromatogramech lidských virů E18 a RV2. Toto pozorování tedy potvrzuje teorii, že veškeré detekované RNA modifikace skutečně pocházejí z tRNA. Tyto modifikace dále způsobují zastavení reverzní transkripce při přípravě sekvenačních knihoven (viz výše). I tento fenomén byl v sekvenačních datech nalezených tRNA pozorován.

#### 4.2.3 Northern blot analýza pikornavirů

Pro další potvrzení přítomnosti tRNA ve virové partikuli SBV a DWV byla provedena analýza northern blot. Kromě RNA izolované z virů byla analyzována i RNA izolovaná ze včelí larvy (hostitelského organismu). Analýza proběhla s radioaktivně (<sup>32</sup>P) značenými próbami pro 3' a 5' konec tRNA<sup>GlyGCC-1</sup>, tRNA<sup>AspGTC</sup> a tRNA<sup>LysTTT</sup>, tRNA<sup>LysCTT</sup> a tRNA<sup>GluCTC</sup>. Jako měřítko byly připraveny různě dlouhé sekvence tRNA<sup>LysTTT</sup> (21, 38, 75 nt). V případě včelích larev obsahovaly vzorky testované tRNA v celé délce. V případě tRNA testovaných ze vzorků obou virů byly pozorovány pouze fragmenty tRNA. Velikost 3' fragmentů byla okolo 38 nt. Velikost 5' fragmentů (v případě tRNA<sup>GlyGCC-1</sup>, tRNA<sup>LysTTT</sup>, tRNA<sup>LysCTT</sup> a tRNA<sup>GluCTC</sup>) byla srovnatelná nebo menší než v případě 3' fragmentů (Obr. 12). Vzhledem k tomu, že v případě hostitelského organismu nebyly fragmenty detekovány, je pravděpodobné, že přítomnost viru je za tvorbu fragmentů zodpovědná a že si tyto fragmenty přibaluje do své virové partikule.



Obr. 12: Northern blot analýza včelích pikornavirů dokazující přítomnost fragmentů hostitelských tRNA přítomných ve virových partikulích SBV a DWV.

Studiem vybraných pikornavirů bylo zjištěno, že gRNA ani jednoho z testovaných virů (SBV, DWV, RV2 ani E18) neobsahuje m<sup>1</sup>A ani m<sup>5</sup>C. Obě modifikace však byly potvrzeny ve fragmentech tRNA, které byly izolovány z virových partikulí SBV a DWV. Tato práce přináší jako první informaci o tom, že virová partikule pikornavirů SBV a DWV obsahuje kromě gRNA i fragmenty hostitelské tRNA.

## 5. DISKUZE

### 5.1 Studium RNA modifikací ve virové RNA z HIV-1

Doposud bylo uváděno, že HIV-1 virová partikule obsahuje 2 kopie gRNA, 14 kopií 7SL RNA a okolo 70 kopií tRNA. Tato data se ale opírají o nepřímé techniky detekce. V této práci bylo poprvé použito přímé metody, kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní detekcí, pro studování složení HIV-1 virové partikule. Uvedenou technikou bylo odhaleno poměrně velké množství m<sup>1</sup>A a proto se práce dále zaměřovala pouze na tuto modifikaci. Pro mapování m<sup>1</sup>A byla vybrána metoda založená na použití reverzní transkriptázy a jejího specifického chování v případě, že je v sekvenci modifikace přítomna. Mapování m<sup>1</sup>A potvrdilo přítomnost methylace pouze v tRNA. Ve všech ostatních RNA přítomných ve virové partikuli HIV-1 nebyla přítomnost modifikace prokázána. Poté, co byla potvrzena přítomnost pouze celých molekul tRNA byl proveden přepočítání obsahu RNA celého virové partikule. Na základě LC-MS bylo dopočítáno, že virová partikule obsahuje 2 kopie gRNA a 14 kopií 7SL RNA a 770 kopií různých tRNA.

V minulosti byl RNA-seq pro analýzu virové partikule HIV-1 použit pouze jednou (Eckwahl, Arnion et al. 2016). Podle Eckwahl et al. obsahuje virová partikule HIV-1 dokonce méně než 8 kopií tRNA<sup>LysTTT-3.1</sup>, jak bylo uváděno dříve. Zároveň ale autoři připouští, že tento nízký počet tRNA readů může být způsoben fragmentačním krokem. V případě, že je fragment menší než 50 nt, nemusí se vyskytovat v cDNA. V případě této dizertační práce je ale počítáno i s tRNA fragmenty okolo 40 nt. Oproti prezentovaným datům tedy nebyla ztracena informace z těchto krátkých sekvencí. A konkrétně v případě tRNA<sup>LysTTT-3.1</sup>, dochází téměř vždy k přerušení transkripce RT v pozici 37, kde se nachází objemná molekula mS<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A a čtená sekvence v cDNA je tedy 39 nt dlouhá.

Ze sekvenčních dat vyplývá, že okolo 69 % RNA v HIV-1 virové partikuli je tvořeno třemi verzemi tRNA<sup>Lys</sup>. Toto množství koresponduje s daty prezentovanými v práci Kleiman et al., kde je poměr popsán jako 60 % (Jiang, Mak et al. 1993). S využitím microarray a 2D PAGE metody byl stejnou skupinou později tento poměr snížen na 45 % tRNA<sup>Lys</sup> (Pavon-Eternod, Wei et al. 2010). Popsané snížení ale mohlo být způsobeno nedokonalým značením, vzhledem k faktu, že obě metody používají ligační reakce.

Na základě hmoty (cca 1/3 virové partikule) a průměrné délky RNA (cca 100 nt) bylo stanoveno, že počet nekódujících RNA přibalených z hostitelské buňky převyšuje gRNA v retrovirech zhruba 50-krát (Telesnitsky and Wolin 2016). Ve většině prací je kvantifikace přibalených tRNA ve virové partikuli zanedbávána. Tato dizertační práce při kvantifikaci tRNA vyšla z faktu, že každá molekula tRNA obsahuje v sekvenci pouze jeden m<sup>1</sup>A. Na základě hmotnostní analýzy pak bylo dopočteno, že HIV-1 virová partikule obsahuje 770 přibalených tRNA. To je v rozporu s některými jinými studiemi. V těchto jsou ale pro produkci virových partikul používány jiné buněčné linie jako COS-7 (Jiang, Mak et al. 1993) a CEM-SS (Onafuwa-Nuga, Telesnitsky et al. 2006) nebo jsou virové partikule získány pomocí transfekce buněk (Kleiman, Jones et al. 2010), nikoliv infekce. Všechny uvedené pak mohou mít vliv na složení virové partikule HIV-1.

Během vzniku dizertační práce byla publikována data popisující výskyt modifikací ve virových gRNA (McIntyre, Netzband et al. 2018). Tato studie využívá pro získání čistých virových gRNA specifické próby. V případě gRNA HIV-1 popisuje výskyt m<sup>1</sup>A a dalších 37 modifikací. Autoři této studie staví své výsledky pouze na hmotnostní analýze, což znamená, že není vyloučena kontaminace hojně modifikovanými tRNA. U všech testovaných virů, včetně HIV-1, byly nalezeny některé modifikace, které byly doposud popsány pouze u bakterií (Lorenz, Lünse et al. 2017, Boccaletto, Stefaniak et al. 2022). Zde je ale na místě diskuze, zda eukaryotická buňka vůbec má metabolický aparát pro tvorbu bakteriálních modifikací nebo zda se spíše jedná o kontaminaci vzorků. Dále bylo v publikované studii k přípravě vzorku využita transfekce buněk plazmidem pNL4-3. Plazmid obsahující HIV-1 genomovou sekvenci může být celý přepisován do



RNA. Během kompletace dat v této dizertační práci byl proveden screening sekvence HIV-1. Bylo zjištěno, že plazmid pNL4-3 obsahuje motiv GUUCNANNC, který by podle jiné publikované studie (Safra, Sas-Chen et al. 2017) mohl být methylován. Sekvenační technika použitá v této práci by nebyla schopná zachytit pozice modifikované z méně než 5 %. Proto získané výsledky nemohou úplně vyloučit, že některé pozice v gRNA HIV-1 mohou být z méně než 5 % methylované. Kromě toho, že se takto nízké množství m<sup>1</sup>A v gRNA HIV-1 nezdá být biologicky relevantní, nemělo by ani zásadně ovlivnit výsledky získané z hmotnostní analýzy v této práci.

Vzhledem k velkému množství m<sup>1</sup>A zjištěného hmotnostní analýzou a profilem získaným ze sekvenačních dat byl v práci zohledněn a testován výskyt 3' tRNA fragmentů. Jinými skupinami publikovaná pyrosekvenace a RNA-seq malých nekódujících molekul v HIV-1 infikovaných buňkách odhalila přítomnost 18-nukleotidů dlouhých 3' tRNA fragmentů tRNA<sup>LysTTT-3.1</sup>. Tyto fragmenty jsou komplementární místu, kde dochází k navázání primeru u HIV-1 (Yeung, Bennasser et al. 2009, Schopman, Willemsen et al. 2012). Tyto fragmenty však nefungují jako primer reverzní transkripce, ale naopak. Pokud je přítomnost 3' fragmentů vyšší, dochází ke snížení replikace viru. Technikami, které byly v dizertační práci použity, nebyla přítomnost 18 - nt 3' fragmentů potvrzena a to ani v RNA izolované z infikovaných buněk ani v RNA izolované z HIV-1 virové partikule. Analýza northern blot odhalila přítomnost různých fragmentů pouze u vzorku, kde ke fragmentaci cíleně dochází (Obr. 11, A, B). Zároveň tím bylo vyloučeno, že by m<sup>1</sup>A pocházel z 3' fragmentů tRNA.

## 5.2 Studium RNA methylací ve vybraných pikornavirech

Objev modifikací na mRNA dal základ nové oblasti výzkumu, epitranskriptomice (Meyer and Jaffrey 2014). Hledání nových modifikací na mRNA se však ukazuje jako náročný úkol. mRNA je v buňce zastoupena minoritně a při izolaci mRNA bývají často izolovány i molekuly tRNA nebo rRNA. Nekódující RNA jako je tRNA a rRNA jsou hojně modifikovány a modifikace v takto kontaminovaném vzorku může být chybně interpretována jako modifikace z mRNA. Pro popsání nových mRNA modifikací bylo v této práci použito virů z řádu Picornavirales, jako modelových systémů. Doposud bylo uváděno, že virová partikule těchto virů obsahují pouze gRNA, která ale zároveň slouží jako mRNA. Proto by RNA izolovaná z virové partikule pikornavirů neměla obsahovat žádné kontaminace jinými (buněčnými) RNA. Vliv některých RNA modifikací při pomoci viru obejít imunitní systém hostitele již byl popsán (Potužník and Cahová 2020). Přesto by objevení nových modifikací v gRNA pikornavirů mohlo přinést nové informace např. o životním cyklu viru.

Pro tuto dizertační práci byly zvoleny čtyři zástupci z rodu pikornavirů: dva hmyzí iflaviry (SBV a DWV) a dva zástupci lidských pikornavirů (E18 a RV2). U každého viru byla izolována RNA a následně štípána do formy nukleosidů. Takto připravené vzorky pak byly podrobeny analýze LC-MS a výsledky byly srovnány s externími standardy. Tato analýza odhalila poměrně velké množství methylovaných nukleosidů (m<sup>1</sup>A, Am, m<sup>1</sup>G, m<sup>2</sup>G, m<sup>7</sup>G, Gm, m<sup>5</sup>C, Cm a Um) v případě hmyzích virů. Lidské pikornaviry obsahovaly pouze stopové množství 2'-O-methylovaných nukleosidů a m<sup>6</sup>A, který byl nedávno potvrzen i u enteroviru 71 (Hao, Hao et al. 2019).

Pro určení přesné pozice m<sup>1</sup>A a m<sup>5</sup>C v sekvenci virové gRNA obou hmyzích virů, byly připraveny sekvenační knihovny. Bioinformatická analýza dat získaných z knihoven nepotvrdila přítomnost m<sup>1</sup>A ani m<sup>5</sup>C v genomové RNA ani u SBV ani u DWV. Podařilo se ale identifikovat určité typy tRNA v obou testovaných virech a dále přinesla analýza dat informace o přesné pozici hledaných modifikací v těchto tRNA sekvencích. To vede k závěru, že uvedené modifikace pochází pouze z přibalených tRNA. Získané informace dále podporují teorii, že m<sup>1</sup>A není hojně zastoupen v mRNA (Safra, Sas-Chen et al. 2017). V dříve publikované studii (McIntyre, Netzband et al. 2018) byly pomocí LC-MS potvrzeny různé modifikace v různých testovaných virech včetně zástupce pikornavirů, polioviru. U polioviru bylo popsáno

47 modifikací. I v tomto případě ale byly některé modifikace popsány pouze u bakterií (2-methyladenosin, 5-methylaminomethyluridin a další) (Lorenz, Lünse et al. 2017, Boccaletto, Stefaniak et al. 2022). Na základě dostupných informací se proto tato dizertační práce přiklání k názoru, že mRNA ani gRNA virů neobsahuje tak široké spektrum modifikací, jak bylo dříve publikováno (Dominissini, Nachtergaele et al. 2016, McIntyre, Netzband et al. 2018).

Podobně jako v případě HIV-1 i u readů včelích pikornavirů bylo pozorováno zastavení transkripce, které bývá většinou způsobeno objemnějšími modifikacemi v blízkosti antikodonové smyčky. Proto byla v hmotnostních datech hledána přítomnost tří A modifikací, specifických pro tRNA ( $t^6A$ ,  $mS^2t^6A$  a  $i^6A$ ). Výskyt všech tří byl potvrzen u obou včelích virů (SBV i DWV). Toto zjištění dále potvrzuje domněnku, že popsané modifikace skutečně pochází z přibalených tRNA.

Aby bylo vyloučeno, že si virus náhodně přibaluje nejvíce zastoupené tRNA v hostitelském organismu, byl typ detekovaných tRNA porovnán s včelím využitím kodonu. To ukázalo, že kromě jedné výjimky ( $tRNA^{LysTTT}$ ), zastoupení tRNA z virové partikule neodpovídá nejvíce využívaným tRNA v hostitelském organismu (Tab. 4). V RNA izolované z virových partikulí SBV byly identifikovány  $tRNA^{GlyGCC-1}$ ,  $tRNA^{AspGTC}$  a  $tRNA^{LysTTT}$ ,  $tRNA^{LysCTT}$  a ve virových partikulích DWV  $tRNA^{GlyGCC-1}$ ,  $tRNA^{AspGTC}$  a  $tRNA^{LysTTT}$ ,  $tRNA^{GluCTC}$ . V obou případech tvořily uvedené čtyři typy tRNA okolo 60 % všech tRNA ve virových partikulích detekovaných. Což vede k závěru, že zbytek tRNA byl přibalen náhodně. Tři z více zastoupených tRNA přibalených iflaviry ( $tRNA^{LysCTT}$ ,  $tRNA^{LysTTT}$ ,  $tRNA^{AspGTC}$ ) jsou také typické pro tRNA přibalené lidským retrovirem HIV-1, který ale používá  $tRNA^{LysCTT}$  jako primer pro reverzní transkripci. Role dalších přibalených tRNA v HIV-1 partikuli není zcela objasněna. Některé publikace uvádějí, že nekomplementární tRNA hrají roli při replikaci HIV-1. tRNA navázané na matrix doménu (MA) brání interakci s intracelulárními membránami před tím, než Gag protein dojde k plazmatické membráně (Cullen 2014, Kutluay, Zang et al. 2014). Další hypotéza přináší informace o tom, že tyto tRNA se podílejí na transportu HIV-1 do jádra (Zaitseva, Myers et al. 2006) nebo že HIV-1 infekce mění zastoupení hostitelských tRNA v závislosti na fázi infekce (van Weringh, Ragonnet-Cronin et al. 2011). Vzhledem k faktu, že viry z řádu pikornavirů nekódují Gag protein a jejich genom není transportován do jádra ani z jádra, nevysvětlují tyto teorie přítomnost přibalených tRNA v jejich virových partikulích.

Hlavní rozdíl mezi tRNA přibalenými retroviry a iflaviry je v jejich velikosti. U HIV-1 byly popsány tRNA o celkové délce (viz výše). SBV a DWV obsahují 3' a 5' tRNA fragmenty (Obr. 12). Vznik takových fragmentů byl popsán u nádorových buněk a při virové infekci (Yu, Xie et al. 2021). Během infekce lidským respiračním syncytiálním virem (RSV, -ssRNA) byl popsán vznik 3' a 5' tRNA fragmentů (Zhou, Liu et al. 2017). 5' tRNA fragmenty z  $tRNA^{GlyCCC}$  a  $tRNA^{LysCTT}$  podporují replikaci RSV. 5' fragment z tRNA rozpoznává 3'-UTR anti-RSV proteinu (apolipoprotein E receptor 2) a snižuje jeho expresi (Deng, Ptashkin et al. 2015). 3' konec  $tRNA^{Pro}$  byl popsán ve virové partikuli lidského viru leukemie T-buněk typu 1, kde slouží jako primer reverzní transkripce (Ruggero, Guffanti et al. 2014).

V testovaných lidských pikornavirech (E18 a RV2) se nepodařilo detekovat  $m^1A$  ani  $m^5C$ . To vede k závěru, že virové partikule E18 a RV2 neobsahují ani tRNA fragmenty ani celé tRNA. Příprava obou lidských virů však probíhala transfekcí a viry byly izolovány z buněčných kultur. Oproti tomu, v případě včelích pikornavirů šlo o izolaci přímo z infikovaných organismů (larev včel). Nemůže být proto vyloučeno, že tento rozdíl v původu virů mohl vést k rozdílnému pozorování a závěru.

Výskyt tRNA fragmentů nebyl doposud publikován u žádných +ssRNA virů. Publikovaná data pro jiné typy virů však potvrzují důležitost tRNA fragmentů, vzhledem k tomu, že jejich přítomnost může podporovat replikaci viru nebo inhibovat antivirovou odpověď hostujícího organismu. Pro objasnění funkce přítomnosti tRNA fragmentů u testovaných iflavirů by bylo třeba dalších studií.

## 6. ZÁVĚR

- I. Ve spolupráci s oddělením virologie (Mgr. Jan Weber, Ph.D., ÚOCHB, Praha) se podařilo připravit dostatečné množství HIV-1 virových partikulí. Z virových partikulí byla vhodnou metodou izolována RNA, která byla následně použita pro další analýzy.
- II. Byla vytvořena vhodná metoda LC-MS pro detekci m<sup>1</sup>A. Metoda potvrdila přítomnost m<sup>1</sup>A v RNA izolované z HIV-1. Technika byla použita i pro popis dalších adenosinových modifikací. Dále byla provedena kvantifikace nejvíce zastoupených adenosinových modifikací (Tab. 2).
- III. Kombinací několika sekvenačních technik byla vytvořena nová metoda pro mapování m<sup>1</sup>A. Analýzou sekvenačních dat bylo zjištěno, že m<sup>1</sup>A obsahují pouze přibalené molekuly tRNA.
- IV. Přítomnost m<sup>1</sup>A byla potvrzena pouze u celých tRNA. Na základě LC-MS byla přepočítána kompozice RNA ve virové partikuli HIV-1, která obsahuje 2 kopie gRNA, 14 kopií 7SL RNA a 770 kopií různých tRNA (Šimonová, Svojanovská et al. 2019).
- V. Ve spolupráci se skupinou Strukturní virologie (doc. Mgr. Pavel Plevka, Ph.D., CEITEC, Brno) se podařilo připravit dostatečné množství dvou lidských a dvou včelích pikornavirů. Ze všech pikornavirů byla izolována RNA a ta byla následně použita pro další analýzy.
- VI. LC-MS technikou byla analyzována přítomnost methylací kanonických bází v RNA získané ze všech testovaných pikornavirů. U lidských virů nebylo popsáno výrazné množství žádné methylace, kromě Am. Množství detekovaných methylací u včelích pikornavirů bylo poměrně vysoké (Tab. 3).
- VII. Pro stanovení pozice m<sup>1</sup>A a m<sup>5</sup>C v sekvenci včelích virů bylo využito sekvenačních technik mapování m<sup>1</sup>A a bisulfitové sekvenování. Analýza dat z obou technik prokázala výskyt testovaných modifikací pouze u tRNA fragmentů.
- VIII. Doposud nebylo popsáno, že by si včelí iflaviry přibalovaly hostitelkou RNA. V této práci byly zkombinovány dvě techniky, přinášející informaci o tom, že SBV a DWV si přibalují některé typy tRNA fragmentů z hostitelské buňky (Šimonová, Romanská et al. 2022).

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Agol, V. I. and A. P. Gmyl (2018). "Emergency services of viral RNAs: repair and remodeling." Microbiology and Molecular Biology Reviews **82**(2).
- Batista, P. J. (2017). "The RNA modification N6-methyladenosine and its implications in human disease." Genomics, proteomics & bioinformatics **15**(3): 154-163.
- Batista, P. J., B. Molinie, J. Wang, K. Qu, J. Zhang, L. Li, D. M. Bouley, E. Lujan, B. Haddad and K. Daneshvar (2014). "m6A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells." Cell stem cell **15**(6): 707-719.
- Bilbille, Y., F. A. Vendeix, R. Guenther, A. Malkiewicz, X. Ariza, J. Vilarrasa and P. F. Agris (2009). "The structure of the human tRNALys3 anticodon bound to the HIV genome is stabilized by modified nucleosides and adjacent mismatch base pairs." Nucleic acids research **37**(10): 3342-3353.
- Boccaletto, P., M. A. Machnicka, E. Purta, P. Piątkowski, B. Bagiński, T. K. Wirecki, V. de Crécy-Lagard, R. Ross, P. A. Limbach and A. Kotter (2018). "MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update." Nucleic acids research **46**(D1): D303-D307.
- Boccaletto, P., F. Stefaniak, A. Ray, A. Cappannini, S. Mukherjee, E. Purta, M. Kurkowska, N. Shirvanizadeh, E. Destefanis and P. Groza (2022). "MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2021 update." Nucleic acids research **50**(D1): D231-D235.
- Brückl, T., D. Globisch, M. Wagner, M. Müller and T. Carell (2009). "Parallel isotope-based quantification of modified tRNA nucleosides." Angewandte Chemie International Edition **48**(42): 7932-7934.
- Brutscher, L. M., A. J. McMenamin and M. L. Flenniken (2016). "The buzz about honey bee viruses." PLoS Pathogens **12**(8): e1005757.
- Bubba, L., E. K. Broberg, A. Jasir, P. Simmonds, H. Harvala, M. Redlberger-Fritz, L. Nikolaeva-Glomb, M. Havlíčková, P. Rainetova and T. K. Fischer (2020). "Circulation of non-polio enteroviruses in 24 EU and EEA countries between 2015 and 2017: a retrospective surveillance study." The Lancet Infectious Diseases **20**(3): 350-361.
- Chen, B.-S., H.-C. Lee, K.-M. Lee, Y.-N. Gong and S.-R. Shih (2020). "Enterovirus and encephalitis." Frontiers in microbiology **11**: 261.
- Courtney, D. G., A. Chalem, H. P. Bogerd, B. A. Law, E. M. Kennedy, C. L. Holley and B. R. Cullen (2019). "Extensive epitranscriptomic methylation of A and C residues on murine leukemia virus transcripts enhances viral gene expression." MBio **10**(3).
- Courtney, D. G., K. Tsai, H. P. Bogerd, E. M. Kennedy, B. A. Law, A. Emery, R. Swanstrom, C. L. Holley and B. R. Cullen (2019). "Epitranscriptomic addition of m5C to HIV-1 transcripts regulates viral gene expression." Cell host & microbe **26**(2): 217-227. e216.
- Cullen, B. R. (2014). "HIV-1 Packing to Leave." Cell **159**(5): 975-976.
- David, R., A. Burgess, B. Parker, J. Li, K. Pulsford, T. Sibbritt, T. Preiss and I. R. Searle (2017). "Transcriptome-wide mapping of RNA 5-methylcytosine in Arabidopsis mRNAs and noncoding RNAs." The Plant Cell **29**(3): 445-460.
- Davis, F. F. and F. W. Allen (1957). "Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide." Journal of Biological Chemistry **227**(2): 907-915.
- Deng, J., R. N. Ptashkin, Y. Chen, Z. Cheng, G. Liu, T. Phan, X. Deng, J. Zhou, I. Lee and Y. S. Lee (2015). "Respiratory syncytial virus utilizes a tRNA fragment to suppress antiviral responses through a novel targeting mechanism." Molecular Therapy **23**(10): 1622-1629.
- Dominissini, D., S. Nachtergaele, S. Moshitch-Moshkovitz, E. Peer, N. Kol, M. S. Ben-Haim, Q. Dai, A. Di Segni, M. Salmon-Divon and W. C. Clark (2016). "The dynamic N 1-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA." Nature **530**(7591): 441-446.
- Dubin, D. T. and V. Stollar (1975). "Methylation of Sindbis virus "26S" messenger RNA." Biochemical and biophysical research communications **66**(4): 1373-1379.
- Dunn, D. (1961). "The occurrence of 1-methyladenine in ribonucleic acid." Biochimica et biophysica acta **46**(1): 198-200.
- Duvaud, S., C. Gabella, F. Lisacek, H. Stockinger, V. Ioannidis and C. Durinx (2021). "Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users." Nucleic Acids Research.

Eckwahl, M. J., H. Arnion, S. Kharytonchyk, T. Zang, P. D. Bieniasz, A. Telesnitsky and S. L. Wolin (2016). "Analysis of the human immunodeficiency virus-1 RNA packageome." *Rna* **22**(8): 1228-1238.

Eckwahl, M. J., S. Sim, D. Smith, A. Telesnitsky and S. L. Wolin (2015). "A retrovirus packages nascent host noncoding RNAs from a novel surveillance pathway." *Genes & development* **29**(6): 646-657.

Edelheit, S., S. Schwartz, M. R. Mumbach, O. Wurtzel and R. Sorek (2013). "Transcriptome-wide mapping of 5-methylcytidine RNA modifications in bacteria, archaea, and yeast reveals m<sup>5</sup>C within archaeal mRNAs." *PLoS Genet* **9**(6): e1003602.

Foley, B. T., T. K. Leitner, C. Apetrei, B. Hahn, I. Mizrachi, J. Mullins, A. Rambaut, S. Wolinsky and B. T. M. Korber (2015). HIV Sequence Compendium 2015, Los Alamos National Lab.(LANL), Los Alamos, NM (United States).

Gaston, K. W. and P. A. Limbach (2014). "The identification and characterization of non-coding and coding RNAs and their modified nucleosides by mass spectrometry." *RNA biology* **11**(12): 1568-1585.

Gisder, S. and E. Genersch (2017). "Viruses of commercialized insect pollinators." *Journal of Invertebrate Pathology* **147**: 51-59.

Globisch, D., D. Pearson, A. Hienzsch, T. Brückl, M. Wagner, I. Thoma, P. Thumbs, V. Reiter, A. C. Kneuttinger and M. Müller (2011). "Systems-based analysis of modified tRNA bases." *Angewandte Chemie International Edition* **50**(41): 9739-9742.

Hao, H., S. Hao, H. Chen, Z. Chen, Y. Zhang, J. Wang, H. Wang, B. Zhang, J. Qiu and F. Deng (2019). "N<sup>6</sup>-methyladenosine modification and METTL3 modulate enterovirus 71 replication." *Nucleic acids research* **47**(1): 362-374.

Harvala, H., E. Broberg, K. Benschop, N. Berginc, S. Ladhani, P. Susi, C. Christiansen, J. McKenna, D. Allen and P. Makiello (2018). "Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe." *Journal of clinical virology* **101**: 11-17.

Hauenschild, R., L. Tserovski, K. Schmid, K. Thüring, M.-L. Winz, S. Sharma, K.-D. Entian, L. Wacheul, D. L. Lafontaine and J. Anderson (2015). "The reverse transcription signature of N<sup>1</sup>-methyladenosine in RNA-Seq is sequence dependent." *Nucleic acids research* **43**(20): 9950-9964.

Helm, M. (2006). "Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA." *Nucleic acids research* **34**(2): 721-733.

Helm, M., F. Lyko and Y. Motorin (2019). "Limited antibody specificity compromises epitranscriptomic analyses." *Nature communications* **10**(1): 1-3.

Hotchkiss, R. D. (1948). "The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography." *Journal of Biological Chemistry* **175**(1): 315-332.

Huang, T., W. Chen, J. Liu, N. Gu and R. Zhang (2019). "Genome-wide identification of mRNA 5-methylcytosine in mammals." *Nature structural & molecular biology* **26**(5): 380-388.

Jiang, M., J. Mak, A. Ladha, E. Cohen, M. Klein, B. Rovinski and L. Kleiman (1993). "Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1." *Journal of virology* **67**(6): 3246-3253.

Jurga, S. and J. Barciszewski (2021). *Epitranscriptomics*, Springer.

Khoddami, V. and B. R. Cairns (2013). "Identification of direct targets and modified bases of RNA cytosine methyltransferases." *Nature biotechnology* **31**(5): 458.

Kietrys, A. M., W. A. Velema and E. T. Kool (2017). "Fingerprints of modified RNA bases from deep sequencing profiles." *Journal of the American Chemical Society* **139**(47): 17074-17081.

Kim, D., J.-Y. Lee, J.-S. Yang, J. W. Kim, V. N. Kim and H. Chang (2020). "The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome." *Cell* **181**(4): 914-921. e910.

Kleiman, L., C. P. Jones and K. Musier-Forsyth (2010). "Formation of the tRNALys packaging complex in HIV-1." *FEBS letters* **584**(2): 359-365.

Kutluay, S. B., T. Zang, D. Blanco-Melo, C. Powell, D. Jannain, M. Errando and P. D. Bieniasz (2014). "Global changes in the RNA binding specificity of HIV-1 gag regulate virion genesis." *Cell* **159**(5): 1096-1109.

Li, S. and C. E. Mason (2014). "The pivotal regulatory landscape of RNA modifications." *Annual review of genomics and human genetics* **15**: 127-150.

Li, X., X. Xiong, K. Wang, L. Wang, X. Shu, S. Ma and C. Yi (2016). "Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N<sup>1</sup>-methyladenosine methylome." *Nature chemical biology* **12**(5): 311-316.

Li, X., X. Xiong, M. Zhang, K. Wang, Y. Chen, J. Zhou, Y. Mao, J. Lv, D. Yi and X.-W. Chen (2017). "Base-resolution mapping reveals distinct m1A methylome in nuclear-and mitochondrial-encoded transcripts." *Molecular cell* **68**(5): 993-1005. e1009.

Linder, B., A. V. Grozhik, A. O. Olarerin-George, C. Meydan, C. E. Mason and S. R. Jaffrey (2015). "Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome." *Nature methods* **12**(8): 767-772.

Liu, F., W. Clark, G. Luo, X. Wang, Y. Fu, J. Wei, X. Wang, Z. Hao, Q. Dai and G. Zheng (2016). "ALKBH1-mediated tRNA demethylation regulates translation." *Cell* **167**(3): 816-828. e816.

Lorenz, C., C. E. Lünse and M. Mörl (2017). "tRNA modifications: impact on structure and thermal adaptation." *Biomolecules* **7**(2): 35.

Macon, J. B. and R. Wolfenden (1968). "1-Methyladenosine. Dimroth rearrangement and reversible reduction." *Biochemistry* **7**(10): 3453-3458.

Martínez-Salas, E., R. Francisco-Velilla, J. Fernandez-Chamorro, G. Lozano and R. Diaz-Toledano (2015). "Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions." *Virus research* **206**: 62-73.

McIntyre, W., R. Netzband, G. Bonenfant, J. M. Biegel, C. Miller, G. Fuchs, E. Henderson, M. Arra, M. Canki and D. Fabris (2018). "Positive-sense RNA viruses reveal the complexity and dynamics of the cellular and viral epitranscriptomes during infection." *Nucleic acids research* **46**(11): 5776-5791.

Meyer, K. D. and S. R. Jaffrey (2014). "The dynamic epitranscriptome: N 6-methyladenosine and gene expression control." *Nature reviews Molecular cell biology* **15**(5): 313-326.

Mortazavi, A., B. A. Williams, K. McCue, L. Schaeffer and B. Wold (2008). "Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq." *Nature methods* **5**(7): 621-628.

Narayanan, A., S. Iordanskiy, R. Das, R. Van Duynes, S. Santos, E. Jaworski, I. Guendel, G. Sampey, E. Dalby and M. Iglesias-Ussel (2013). "Exosomes derived from HIV-1-infected cells contain trans-activation response element RNA." *Journal of Biological Chemistry* **288**(27): 20014-20033.

Nombela, P., B. Miguel-López and S. Blanco (2021). "The role of m6A, m5C and Ψ RNA modifications in cancer: Novel therapeutic opportunities." *Molecular cancer* **20**(1): 1-30.

Onafuwa-Nuga, A. A., A. Telesnitsky and S. R. King (2006). "7SL RNA, but not the 54-kd signal recognition particle protein, is an abundant component of both infectious HIV-1 and minimal virus-like particles." *Rna* **12**(4): 542-546.

Oxford, J. S., L. H. Collier and P. Kellam (2016). *Human virology*, Oxford University Press.

Pavon-Eternod, M., M. Wei, T. Pan and L. Kleiman (2010). "Profiling non-lysyl tRNAs in HIV-1." *Rna* **16**(2): 267-273.

Potapov, V., X. Fu, N. Dai, I. R. Corrêa Jr, N. A. Tanner and J. L. Ong (2018). "Base modifications affecting RNA polymerase and reverse transcriptase fidelity." *Nucleic acids research* **46**(11): 5753-5763.

Potužník, J. F. and H. Cahová (2020). "It's the Little Things (in Viral RNA)." *Mbio* **11**(5).

Ruggero, K., A. Guffanti, A. Corradin, V. K. Sharma, G. De Bellis, G. Corti, A. Grassi, P. Zanovello, V. Bronte and V. Ciminale (2014). "Small noncoding RNAs in cells transformed by human T-cell leukemia virus type 1: a role for a tRNA fragment as a primer for reverse transcriptase." *Journal of virology* **88**(7): 3612-3622.

Safra, M., A. Sas-Chen, R. Nir, R. Winkler, A. Nachshon, D. Bar-Yaacov, M. Erlacher, W. Rossmanith, N. Stern-Ginossar and S. Schwartz (2017). "The m 1 A landscape on cytosolic and mitochondrial mRNA at single-base resolution." *Nature* **551**(7679): 251-255.

Schaefer, M., T. Pollex, K. Hanna and F. Lyko (2009). "RNA cytosine methylation analysis by bisulfite sequencing." *Nucleic acids research* **37**(2): e12-e12.

Schopman, N. C., T. van Montfort, M. Willemsen, S. A. Knoepfel, G. Pollakis, A. van Kampen, R. W. Sanders, J. Haasnoot and B. Berkhout (2012). "Selective packaging of cellular miRNAs in HIV-1 particles." *Virus research* **169**(2): 438-447.

Schopman, N. C., M. Willemsen, Y. P. Liu, T. Bradley, A. van Kampen, F. Baas, B. Berkhout and J. Haasnoot (2012). "Deep sequencing of virus-infected cells reveals HIV-encoded small RNAs." *Nucleic acids research* **40**(1): 414-427.

Schumann, U., H.-N. Zhang, T. Sibbritt, A. Pan, A. Horvath, S. Gross, S. J. Clark, L. Yang and T. Preiss (2020). "Multiple links between 5-methylcytosine content of mRNA and translation." *BMC biology* **18**: 1-23.

Sharma, S., J. D. Hartmann, P. Watzinger, A. Klepper, C. Peifer, P. Kötter, D. L. Lafontaine and K.-D. Entian (2018). "A single N1-methyladenosine on the large ribosomal subunit rRNA impacts locally its structure and the translation of key metabolic enzymes." *Scientific reports* **8**(1): 11904.

Šimonová, A., V. Romanská, B. Benoni, K. Škubník, L. Šmerdová, M. Procházková, K. Spustová, O. Moravčík, L. Gahurova and J. Pačes (2022). "Honeybee iflaviruses pack specific tRNA fragments from host cells in their virions." *ChemBioChem* **23**(17): e202200281.

Šimonová, A., B. Svojanovská, J. Trylčová, M. Hubálek, O. Moravčík, M. Zavřel, M. Pávová, J. Hodek, J. Weber and J. Cvačka (2019). "LC/MS analysis and deep sequencing reveal the accurate RNA composition in the HIV-1 virion." *Scientific Reports* **9**(1): 8697.

Sloan, K. E., A. S. Warda, S. Sharma, K.-D. Entian, D. L. Lafontaine and M. T. Bohnsack (2017). "Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function." *RNA biology* **14**(9): 1138-1152.

Su, D., C. T. Chan, C. Gu, K. S. Lim, Y. H. Chionh, M. E. McBee, B. S. Russell, I. R. Babu, T. J. Begley and P. C. Dedon (2014). "Quantitative analysis of ribonucleoside modifications in tRNA by HPLC-coupled mass spectrometry." *Nature protocols* **9**(4): 828-841.

Suzuki, T. (2021). "The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **22**(6): 375-392.

Taxonomy, V. (2019). Release. International Committee on Taxonomy of Viruses.

Telesnitsky, A. and S. L. Wolin (2016). "The host RNAs in retroviral particles." *Viruses* **8**(8): 235.

Traynor, K. S., F. Mondet, J. R. de Miranda, M. Techer, V. Kowallik, M. A. Oddie, P. Chantawannakul and A. McAfee (2020). "Varroa destructor: A complex parasite, crippling honey bees worldwide." *Trends in Parasitology*.

Tserovski, L., V. Marchand, R. Hauenschild, F. Blanloeil-Oillo, M. Helm and Y. Motorin (2016). "High-throughput sequencing for 1-methyladenosine (m1A) mapping in RNA." *Methods* **107**: 110-121.

van Weringh, A., M. Ragonnet-Cronin, E. Pranckeviciene, M. Pavon-Eternod, L. Kleiman and X. Xia (2011). "HIV-1 modulates the tRNA pool to improve translation efficiency." *Molecular biology and evolution* **28**(6): 1827-1834.

Visseaux, B., F. Damond, S. Matheron, D. Descamps and C. Charpentier (2016). "Hiv-2 molecular epidemiology." *Infection, Genetics and Evolution* **46**: 233-240.

Winz, M.-L., H. Cahová, G. Nübel, J. Frindert, K. Höfer and A. Jäschke (2017). "Capture and sequencing of NAD-capped RNA sequences with NAD captureSeq." *Nature protocols* **12**(1): 122.

Xiong, X., X. Li and C. Yi (2018). "N1-methyladenosine methylome in messenger RNA and non-coding RNA." *Current opinion in chemical biology* **45**: 179-186.

Xue, C., Y. Zhao and L. Li (2020). "Advances in RNA cytosine-5 methylation: detection, regulatory mechanisms, biological functions and links to cancer." *Biomarker Research* **8**(1): 1-13.

Yang, X., Y. Yang, B.-F. Sun, Y.-S. Chen, J.-W. Xu, W.-Y. Lai, A. Li, X. Wang, D. P. Bhattarai and W. Xiao (2017). "5-methylcytosine promotes mRNA export—NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m5C reader." *Cell research* **27**(5): 606-625.

Yang, Y., L. Wang, X. Han, W.-L. Yang, M. Zhang, H.-L. Ma, B.-F. Sun, A. Li, J. Xia and J. Chen (2019). "RNA 5-methylcytosine facilitates the maternal-to-zygotic transition by preventing maternal mRNA decay." *Molecular cell* **75**(6): 1188-1202. e1111.

Yeung, M. L., Y. Bennasser, K. Watashi, S.-Y. Le, L. Houzet and K.-T. Jeang (2009). "Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid." *Nucleic acids research* **37**(19): 6575-6586.

Yu, X., Y. Xie, S. Zhang, X. Song, B. Xiao and Z. Yan (2021). "tRNA-derived fragments: Mechanisms underlying their regulation of gene expression and potential applications as therapeutic targets in cancers and virus infections." *Theranostics* **11**(1): 461.

Zaitseva, L., R. Myers and A. Fassati (2006). "tRNAs promote nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes." *PLoS biology* **4**(10): e332.

Zhou, J., S. Liu, Y. Chen, Y. Fu, A. J. Silver, M. S. Hill, I. Lee, Y. S. Lee and X. Bao (2017). "Identification of two novel functional tRNA-derived fragments induced in response to respiratory syncytial virus infection." *The Journal of general virology* **98**(7): 1600.

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace, které byly podkladem dizertační práce:

- **Šimonová A.**, Romanská V., Benoni B., Škubník K., Šmerdová L., Procházková M., Spustová K., Moravčík O., Gahurová L., Pačes J., Plevka P., Cahová H.: Honeybee Iflaviruses Pck Specific tRNA Fragments from Host Cells in Their Virions, *ChemBioChem*, **23**, e202200281, **2022**, **IF (2022) = 3,2**
- **Šimonová A.**, Svojanovská B., Trylčová J., Hubálek M., Moravčík O., Zavřel M., Pávová M., Hodek J., Weber J., Cvačka J., Pačes J., Cahová H.: LC/MS analysis and deep sequencing reveal the accurate RNA composition in the HIV-1 virion, *Scientific Reports* **9**: 8697, **2019**, **IF (2019) = 3,99**

Další publikace:

- Slavičková M., Janoušková M., **Šimonová A.**, Cahová H., Kambová M., Šanderová H., Krásný L., Hocek M.: Turning Off Transcription with Bacterial RNA Polymerase through CuAAC Click Reactions of DNA Containing 5-Ethynyluracil, *Chem. Eur. J.* **24**: 8311-8314, **2018**. **IF (2018) = 5,16**
- Lange B., **Šimonová A.**, Fischöder T., Pelantová H., Křen V., Elling L.: Towards keratan sulfate – Chemo-enzymatic cascade synthesis of sulfated N-acetyllactosamine (LacNAc) glycan oligomers, *Advanced Synthesis & Catalysis*, online from January 22, **2016**. **IF (2016) = 5,65**
- **Šimonová A.**, Kupper, C. E. Böcker S. Müller, A. Hofbauerová, K. Pelantová, H. Elling, L. Křen, V. Bojarová, P.: Chemo-enzymatic synthesis of LacdiNAc dimers of varying length as novel galectin ligands, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **101**: 47-55, **2014**. **IF (2014) = 2,13**
- **Drozdová A.**, Bojarová P., Křenek K., Weignerová L., Henßen B., Elling L., Christensen H., Jensen H.H., Pelantová H., Kuzma M., Bezouška K., Kroupová M., Adámek D., Slámová K., Křen V.: **Corrigendum to** “Enzymatic synthesis of dimeric glycomimetic ligands of NK cell activation receptors” [Carbohydr. Res. 346 (2011) 1599–1609] *Carbohydrate Research* **373**: 108, **2013**.
- Kupper C.E., Rosencrantz R.R., Henßen B., Thönes S., **Drozdová A.**, Křen V., Elling L.: Chemo-enzymatic modification of poly-N-acetyllactosamine (LacNAc) oligomers and N,N-diacetyllactosamine (LacDiNAc) based on galactose oxidase treatment, *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **9**: 712-725, **2012**. **IF (2012) = 2,67**
- **Drozdová A.**, Bojarová P., Křenek K., Weignerová L., Henßen B., Elling L., Christensen H., Jensen H.H., Pelantová H., Kuzma M., Bezouška K., Kroupová M., Adámek D., Slámová K., Křen V.: Enzymatic synthesis of dimeric glycomimetic ligands of NK cell activation receptors, *Carbohydrate Research* **346**: 1599-1609, **2011**. **IF (2011) = 2,04**