

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biomedicína
Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

Mgr. Anna Šimonová

Methylace virových RNA

Methylation of viral RNA

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/školitelka: Ing. Hana Macíčková Cahová, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 2. 10. 2023

Anna Šimonová

Identifikační záznam:

ŠIMONOVÁ, Anna. Methylace virových RNA. [*Methylation of viral RNA*]. Praha, 2023. 122 stran a 3 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i..

Vedoucí práce Ing. Hana Macíčková Cahová, Ph.D.

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí Ing. Haně Macíčkové Cahové, Ph.D., za odborné vedení mé práce, cenné rady a obrovskou trpělivost a podporu během tvorby celé práce. Mé díky patří i všem bývalým i stávajícím kolegům z laboratoře Chemické biologie nukleových kyselin (ÚOCHB) především za vytvoření inspirujícího prostředí a podporu při překonávání komplikovaných vědeckých i životních momentů. Jmenovitě bych pak chtěla poděkovat RNDr. Janě Trylčové, Ph.D., Ing. Barboře Benoni a Ing. Kristíně Spustové zejména za pomoc s dokončením experimentů během mé indispozice. Dále bych ráda poděkovala laboratoři Virologie (Mgr. Jan Weber, Ph.D., ÚOCHB) a Janě Trylčové a Barboře Benoni za přípravu HIV-1 virových partikulí; oddělení Hmotnostní spektrometrie (doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D., ÚOCHB) za možnost získat zkušenosti s hmotnostní spektrometrií a Mgr. Martinovi Hubálkovi, Ph.D. za ochotu pomoci při práci a pokaždé, když se něco pokazilo; kolegům Dr. rer. nat. Mgr. Martinu Zavřelovi a Mgr. Jaroslavu Kozákovi, Ph.D. (ÚOCHB) za pomoc při analýze Northern blot. Za možnost pracovat s včelími a lidskými pikornaviry patří mé díky doc. Mgr. Pavlovi Plevkovi Ph.D. a jeho kolegům z laboratoře Strukturní virologie (CEITEC, Brno). Celá práce by nemohla vzniknout bez bioinformatické analýzy provedené Mgr. Janem Pačesem, Ph.D. (IMG, Praha) a Mgr. Lenkou Gahurovou, Ph.D. (JCU, České Budějovice).

Práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, programu ERC CZ (LL1603). Bioinformatická analýza a uložení bioinformatických dat bylo finančně podpořeno projektem ELIXIR CZ (MEYS grant č.: LM2015047 a LM2018131).

Na závěr bych ráda poděkovala celé své rodině, zejména manželu Petrovi a dcerám Denise a Emě, kteří po celou dobu věřili v mé schopnosti a díky jejich podpoře a neskonalé trpělivosti jsem byla schopna práci dokončit. Děkuji.

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 použit zástupce retrovirů, virus lidské imunitní nedostatečnosti typ 1 (HIV-1). V další studii byli testováni 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^1A) in RNA isolated from HIV-1. Nevertheless, the m^1A mapping sequencing technique confirm m^1A 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^1A and 5-methylcytidine (m^5C) in two insect viruses (Sacbrood virus, SBV and Deformed wing virus, DWV). RNA seq techniques (m^1A mapping and bisulfite sequencing) confirmed the presence of m^1A and m^5C 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

Seznam zkratk	10
1. Úvod	14
1.1 Nukleové kyseliny (NK).....	14
1.1.1 Deoxyribonukleová kyselina (DNA).....	14
1.1.2 Ribonukleová kyselina (RNA).....	15
1.1.2.1 Typy RNA.....	16
1.1.2.2 Posttranskripční úpravy.....	18
1.2 Modifikace DNA.....	19
1.3 Modifikace RNA.....	19
1.3.1 Inosin (I).....	20
1.3.2 Pseudouridin (Ψ).....	21
1.3.3 Methylace RNA.....	21
1.3.3.1 5-methylcytidin (m^5C).....	21
1.3.3.2 2'-O-methylace (Nm).....	22
1.3.3.3 1-methyladenosin (m^1A).....	22
1.3.3.4 N^6 -methyladenosin (m^6A).....	23
1.3.4 Další modifikace.....	23
1.4 Epitranskriptomika a role m^6A v buňce.....	23
1.4.1 Proteiny vytvářející m^6A v RNA („writers“).....	24
1.4.2 Proteiny demethylující m^6A („erasers“).....	24
1.4.3 Proteiny schopné rozpoznat m^6A v molekule RNA („readers“).....	24
1.5 Metody detekce.....	25
1.5.1 Kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (LC-MS).....	26
1.5.2 RNA sekvenační techniky (RNA-seq).....	26
1.5.2.1 Přímá sekvenace RNA pomocí Oxford Nanopore technologie.....	27
1.5.2.2 Techniky detekce jednotlivých RNA modifikací.....	28
1.6 Viry.....	31
1.6.1 Životní cyklus viru.....	33
1.6.2 Vybrané viry.....	34
1.6.2.1 Retroviry.....	34
1.6.2.2 Pikornaviry.....	42
1.6.3 Modifikace ve virech.....	45
1.6.3.1 Inosin (I).....	45

1.6.3.2	5-methylcytidin (m ⁵ C)	46
1.6.3.3	2'- <i>O</i> -methyl modifikace (Nm)	46
1.6.3.4	N ⁶ -methyladenosin (m ⁶ A)	46
1.6.3.5	Další modifikace	47
2.	Hypotéza a cíle práce	48
3.	Materiál	49
3.1	Laboratorní přístroje a pomůcky.....	49
3.2	Spotřební materiál	49
3.3	Chemikálie, roztoky a kity	50
3.4	Pufry	51
3.5	Buněčné linie.....	52
3.6	Viry a plazmidy	52
3.7	Protilátky	52
3.8	Enzymy	52
3.9	Oligonukleotidy	53
4.	Metodika	56
4.1	Všeobecné techniky	56
4.2	Příprava virových partikulí HIV-1.....	57
4.2.1	Tkáňové kultury.....	57
4.2.2	Izolace malých a velkých RNA frakcí z buněčných kultur	57
4.2.3	Infekce	57
4.2.4	Izolace na sacharózovém polštáři	58
4.2.5	Čištění na gradientu OptiPrep.....	58
4.2.6	Analýza Western blot	58
4.3	Příprava pikornavirů.....	59
4.3.1	Infekce SBV.....	59
4.3.2	Infekce DWV.....	59
4.3.3	Příprava lidských pikornavirů	60
4.4	LC-MS RNA z HIV-1	61
4.5	LC-MS RNA izolované z vybraných pikornavirů.....	62
4.6	Příprava sekvenačních knihoven	62
4.6.1	Mapování m ¹ A.....	62
4.6.2	Bisulfitové sekvenování.....	64
4.7	Northern blot	64

4.8	Bioinformatická analýza	65
4.8.1	Bioinformatická analýza knihoven HIV-1	65
4.8.2	Bioinformatická analýza knihoven pikornavirů	66
5.	Výsledky.....	67
5.1	Studium RNA modifikací ve virové RNA z HIV-1.....	67
5.1.1	Analýza RNA izolované z HIV-1 virových partikulí.....	67
5.1.2	Mapování m ¹ A.....	70
5.1.3	Northern Blot analýza tRNA z HIV-1 virových partikulí.....	74
5.2	Studium RNA methylocí ve vybraných pikornavirech	77
5.2.1	Analýza RNA izolované z různých pikornavirů	77
5.2.2	Mapování m ¹ A a bisulfitové sekvenování pikornavirů.....	79
5.2.3	Northern blot analýza pikornavirů	81
6.	Diskuze	83
6.1	Studium RNA modifikací ve virové RNA z HIV-1.....	83
6.2	Studium RNA methylocí ve vybraných pikornavirech	85
7.	Závěr.....	88
	Doplňující Informace.....	89
	Použitá literatura	109
	Přílohy	122

SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
ADAR	RNA specifická adenosin deamináza
ADAT	tRNA specifická adenosin deamináza
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
ALKBH5	RNA demethyláza (alkB homolog 5)
Am	2'-O-methyladenosin
APOBEC1	apolipoprotein B, mRNA upravující katalytická podjednotka 1
APOBEC3	apolipoprotein B, mRNA upravující katalytický polypeptid 3
AUC	plocha pod křivkou
Aza-IP	5-azacytidin zprostředkovaná RNA imunoprecipitace
bnAb	široce neutralizující protilátky
BP	berlínský pacient
C	cytosin
CA	kapsida
ca ⁵ dC	5-karboxy-deoxycytidin
CAPRIN1	protein 1 asociovaný s buněčným cyklem
cART	kombinovaná antiretrovirová terapie
CCR5	chemokininový receptor 5 s C-C motivem
cDNA	komplementární DNA
CeU-seq	N3-CMC-nabohacené pseudouridinové sekvenování
CIP	alkalická fosfatáza
Cm	2'-O-methylcytidin
CMC	karbodiimid
CoA	koenzym A
CRL5	ubiquitin ligázový komplex
cryo-EM	kryo-elektronový mikroskopie
CuAAC	mědí-katalyzována azid-alkyn cykloadice
CXCR4	chemokininový receptor 4 s C-X-C motivem
DART-seq	m ⁶ A sekvenování (Deamination Adjacent to RNA modification Targets)
DENV	virus horečky dengue
DI	doplňující informace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Dnmt	DNA methyltransferáza
dsDNA	dvouvláknová DNA
dsRNA	dvouvláknová RNA
DWV	virus deformovaných křídel
E18	Echovirus 18
EI	inhibitory vstupu viru do buňky
EIC	extrahovaný chromatogram
eIF3D	eukaryotický translační iniciační faktor 3, podjednotka D
f5dC	5-formyl-deoxycytidin
FAD	flavinadenindinukleotid
FBS	fetální hovězí sérum
FMR1	ribonukleoprotein 1 (Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1)

FTO	FTO alfa-ketoglutarát dependentní dioxygenáza
G	guanin
G3BP1-3	G3BP faktor 1-3 tvorby stresových granul
ges ² U	2-geranyl-thiouridin
Gm	2'-O-methylguanosin
gp	glykoprotein
gRNA	genomová RNA
HCV	virus hepatitidy C
HDV	virus hepatitidy D
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
hm ⁵ dC	5-hydroxymethyl-deoxycytidin
hnRNA	heterogenní jaderné RNA
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
I	inosin
ICE seq	inosin seq. (Inosine Chemical Erasing seq)
IGF2BP	IGF-II mRNA vázající protein
IN	integráza
INSTI	inhibitor integrázy
IP	imunoprecipitace
IRES	vnitřní místo pro vstup ribozomu (Internal Ribosome Entry Site)
iSEQ	inosin specifické sekvenování (Inosine Specific sequencing)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
lncRNA	dlouhé nekódující RNA
LP	londýnský pacient
LSU	velká podjednotka ribozomu
m/z	hmotnost lomeno náboj
m ¹ A	1-methyladenosin
m ¹ G	1-methylguanosin
m ² G	2-methylguanosin
m ³ C	3-methylcytidin
m ⁵ C	5-methylcytidin
m ⁵ C-RIP	5-methylcytosin-RNA imunoprecipitace
m ⁵ dC	5-methyldeoxycytidin
m ⁵ U	5-methyluridin
m ⁶ A	6-methyladenosin
m ⁶ Am	N ⁶ ,2'-O-dimethyladenosin
m ⁶ dA	6-methyldeoxyadenosin
m ⁷ G	7-methylguanosinu
MA	matrix
METTL14	methyltransferáza 14
METTL16	methyltransferáza 16
METTL3	methyltransferáza 3
miCLIP	NSun2- zprostředkované RNA sekvenování
MiCP	drobný kapsidový protein (Minor Capsid Protein)

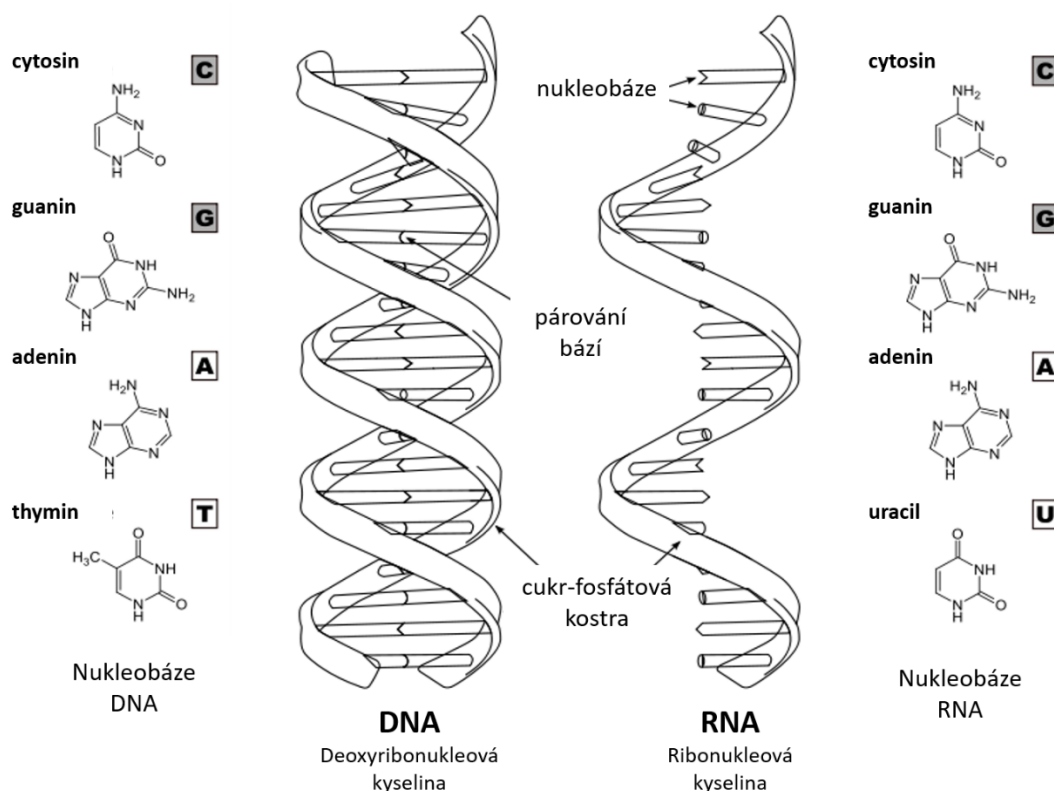
miRNA	mikro RNA
MLV	murine leukemia virus
mRNA	mediátorová RNA
MS	hmotnostní spektrometrie
mS ² t ⁶ A	2-methylthio- <i>N</i> ⁶ -threonylkarbamoyladenosin
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NC	nukleokapsida
NGS	sekvenování další generace (Next Generation Sequencing)
NK	nukleové kyseliny
Nm	2'- <i>O</i> -methyl nukleosid
NNRTI	nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy
NpnNs	dinukleosid polyfosfáty
NRTI	nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy
NSun2	NOP2/Sun RNA methyltransferáza 2
nt	nukleotid
NtRTI	nukleotidový inhibitor reverzní transkriptázy
NuP1	nukleáza P1
PA-m ⁶ A-seq	m ⁶ S seq. využívající crosslinking (Photo-crosslinking-Assisted m ⁶ A seq)
PBS	místo navázání primeru
PCIF1	forsforylovaný CTD reagující faktor
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI	inhibitor proteázy
PPT	sekvence bohaté na puriny
PR	proteáza
RBM15/15B	protein vázající RNA motiv
RDDP	RNA-dependentní DNA polymeráza
RDRP	RNA-dependentní RNA polymeráza
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální RNA
RSV	respirační syncytiální virus
RT	reverzní transkriptáza
RV2	rhinovirus 2
SARS-CoV-2	respirační onemocnění (Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus)
SBPV	virus pomalé včelí paralýzy
SBV	virus pytlíčkovitého plodu
SCARLET	m ⁶ A seq. (Single-Cell Algorithm for Reconstructing Loss-supported Evolution of Tumors)
snoRNA	malé nukleolární RNA
snRNA	malé jaderné RNA
ssRNA	jednovláknová RNA
SSU	malá podjednotka ribozomu
T	thymin
t ⁶ A	<i>N</i> ⁶ -threonylkarbamoyladenosin
TdT	deoxynukleotidyl transferáza
Tet	enzym Ten-eleven translocation
TLC	tenkovrstevná chromatografie

tRNA	transferová RNA
U	uracil
UDP-Glc	uridin 5'-difosfo- <i>N</i> -acetylglukóza
UDP-GlcNAc	uridin 5'-difosfo- <i>N</i> -acetylglukosamin
Um	2'- <i>O</i> -methyluridin
UPLC-MS/MS	ultra výkonná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
UTR	nepřekládané úseky
VIRMA	mRNA vázající protein (VIR like m ⁶ A Methyltransferase Associated)
WTAP	WT1 přidružený protein
YTHDC1	YTH <i>N</i> ⁶ -methyladenosin RNA vázající protein C1
YTHDC2	YTH <i>N</i> ⁶ -methyladenosin RNA vázající protein C2
YTHDF1	YTH <i>N</i> ⁶ -methyladenosin RNA vázající protein F1
YTHDF2	YTH <i>N</i> ⁶ -methyladenosin RNA vázající protein F2
YTHDF3	YTH <i>N</i> ⁶ -methyladenosin RNA vázající protein F3
ZC3H13	RNA vázající protein (zinc finger CCCH-type containing 13)
ZCCHC4	protein s rRNA methyltransferázovou aktivitou (zinc finger CCHC-type containing 4)
ZIKV	ZIKA virus
Ψ	pseudouridin

1. ÚVOD

1.1 Nukleové kyseliny (NK)

Nukleové kyseliny (NK) jsou nositelkami genetické informace a jsou zodpovědné za tvorbu proteinů. Řadíme sem deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) a ribonukleovou kyselinu (RNA). NK vznikají spojováním nukleotidů, které obsahují dusíkatou bázi, aldopentózu a zbytek kyseliny fosforečné. Báze jsou buď pyrimidinové: thymin (T), cytosin (C) a uracil (U), nebo purinové: adenin (A) a guanin (G) (Obr. 1). Cukerná část je tvořena D-ribózou v případě RNA a D-2-deoxyribózou v případě DNA. Vzniklým řetězcům se říká polynukleotidy. Dusíkatá báze je vázána na cukernou složku *N*-glykosidickou vazbou v pozici 1'. Jednotlivé nukleotidy jsou spojené fosfodiesterovými vazbami a tvoří cukr-fosfátovou kostru. Řetězec čteme od 5' ke 3' konci (Blanco and Blanco 2017).

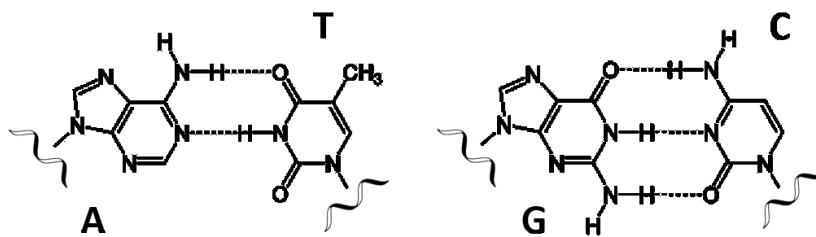


Obr. 1: Struktury nukleobází a schématické znázornění řetězců DNA a RNA.

1.1.1 Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

DNA je chemickým podkladem dědičnosti a je organizována do genů, které jsou základními jednotkami genetické informace. U eukaryotických buněk nacházíme DNA v jádře. U prokaryotických organismů se DNA nachází v cytoplazmě a je formovaná do nukleoidu. V DNA se vyskytují čtyři základní báze, A, G, C, T, které tvoří řetězec. DNA

je zpravidla tvořena dvěma vlákny, která jsou na základě komplementarity spojena v pravotočivou dvoušroubovici. Watson – Crickovo párování neboli komplementarita je párování bází, které je umožněno specifickou interakcí založenou na tvorbě vodíkových můstků mezi nukleobázemi (Obr. 2). Pomocí dvou vodíkových můstků se párují A a T, pomocí třech vodíkových můstků G a C. O vláknech DNA říkáme, že jsou antiparalelní, což znamená, že jedno vlákno probíhá směrem od 5' ke 3' konci a druhé opačně, tedy od 3' k 5' konci. V prvním, tzv. templátovém řetězci, je uchována genetická informace. Druhý řetězec je více podobný transkriptu RNA a je považován za kódující řetězec.



Obr. 2: Schématické znázornění Watson – Crick párování bází pomocí vodíkových můstků.

Genetická informace v sekvenci DNA slouží ke dvěma hlavním účelům. V první řadě je DNA matricí pro replikaci, což je přepis DNA do DNA a zajišťuje dědičnost. Replikace je poměrně pomalý proces a je zajišťován skupinou enzymů, které se nazývají DNA polymerázy. V druhém případě poskytuje DNA informace pro tvorbu všech proteinů organismu. V tomto případě slouží DNA jako templát pro transkripci (přepis) informace do RNA. U většiny případů se jedná o přepis jednoho genu, který slouží k tvorbě jednoho specifického proteinu. Takto vzniklé vlákno RNA se tvoří na principu komplementarity pomocí RNA polymerázy (Voet and Voet 1995).

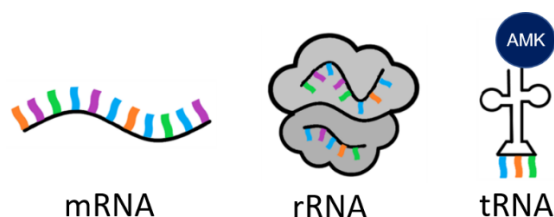
1.1.2 Ribonukleová kyselina (RNA)

Ribonukleová kyselina je zpravidla jednovláknový polynukleotid tvořený A, C, G a U. Tvorba RNA je prvním mezikrokem při přepisu informace z DNA do funkčního proteinu. Proces přepisu z DNA do RNA se nazývá transkripce a je zajištěn enzymem RNA polymerázou.

Téměř všechny molekuly RNA u eukaryotických buněk se podílejí na syntéze proteinů. Některé molekuly RNA mají vlastní katalytickou aktivitu (tzv. ribozymy) (Elliott and Lodomery 2017). U některých virů slouží RNA jako nositelka genetické informace. Tyto viry (např. retroviry) pak používají RNA-dependentní DNA-polymerázu (neboli reverzní transkriptázu) pro přepis svojí genetické informace do dvouvláknové DNA. Ta pak bývá zabudována do hostitelského genomu (Rybicki 2023).

1.1.2.1 Typy RNA

Ve všech eukaryotních a prokaryotních organizmech existují tři hlavní skupiny RNA, messengerová (mRNA), ribozomální (rRNA) a transferová RNA (tRNA) (Obr. 3).



Obr. 3: Schématické znázornění typů RNA.

Mediátorová RNA (mRNA)

mRNA jsou kódující RNA a tvoří přechodový krok mezi přepisem proteinu kódovaným v DNA a jeho produkcí na ribozomu v cytoplazmě buňky. Co se týče velikosti a stability, jedná se o velmi různorodou skupinu RNA. Eukaryotické mRNA se většinou skládají z menších komponent, které jsou vystřiženy a znovu spojeny (sestřih, splicing) z původně přepsané pre-mRNA, která je přesnou kopií genu. Mimo sestřih prodělává molekula mRNA ještě další úpravy, jako např. čepičkování nebo polyadenylaci (viz níže). Po všech úpravách se molekula mRNA stává funkční, je schopna se navázat na ribozom a sloužit jako templát pro vznik proteinu.

Mimo nepostradatelné funkce v buňce, se molekuly mRNA staly zajímavé i pro tvorbu nových typů vakcín. Oproti běžně používaným vakcínám (oslabený nebo mrtvý virus, DNA vakcíny) mají mRNA vakcíny několik výhod. Jedná se především o vyšší bezpečnost. V případě mRNA vakcín nehrozí infekce oslabeným virem. Dále je to jejich vysoká efektivita a potenciál k levné výrobě. V klinických studiích jsou převážně mRNA vakcíny proti virovým infekcím (HIV-1, chřipka, Zika, Ebola...). Kromě nich se do klinických studií dostávají i mRNA vakcíny proti různým typům rakoviny (rakovina plic, prostaty...) (Pardi, Hogan et al. 2018). První dvě mRNA vakcíny byly ve zrychleném řízení schváleny a aplikovány proti viru SARS-CoV-2 (Verbeke, Lentacker et al. 2021).

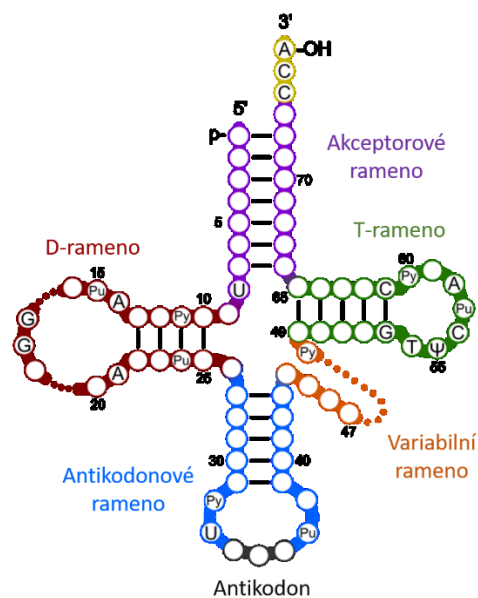
Ribozomální RNA (rRNA)

rRNA je nekódující, ale funkční molekula RNA. rRNA je součástí ribozomu, což je nukleoprotein (komplex proteinu a nukleové kyseliny), který je zodpovědný za syntézu proteinů. V eukaryotech rozeznáváme 4 ribozomální RNA (5S, 18S, 5.8S a 28S). 18S, 5.8S a 28S rRNA vznikají sestřihem molekuly pre-rRNA, která je přepisována polymerázou I z DNA. 5S rRNA vzniká přepisem DNA polymerázou III. Všechny 4 molekuly rRNA jsou součástí ribozomálních podjednotek tvořících ribozom. 18S rRNA spolu s 33 ribozomálními proteiny tvoří tzv. malou podjednotku ribozomu (SSU). 5S, 5.8S a 28S rRNA spolu s 47 ribozomálními proteiny tvoří velkou ribozomální podjednotku

(LSU). rRNA v ribozomu váže tRNA (LSU) i mRNA (SSU) a iniciuje syntézu proteinu (Aubert, O'Donohue et al. 2018). Poskládání eukaryotického ribozomu je velmi komplexní a specificky řízený proces. Chyby v tomto procesu nebo výsledném nukleoproteinu jsou spojovány s rakovinou a s ribozomopatiemi (Klinge and Woolford Jr 2019).

Transferová RNA (tRNA)

tRNA je zodpovědná za přenos aminokyseliny k ribozomu při tvorbě polypeptidového řetězce. tRNA jsou zpravidla molekuly o velikosti 70-93 nukleotidů a také vznikají sestřihem z prekurzorových molekul. Každá buňka obsahuje alespoň 20 druhů tRNA, kdy vždy alespoň jedna odpovídá jedné z aminokyselin potřebných k proteosyntéze. Sekvence nukleotidů u všech tRNA umožňuje díky komplementaritě některých úseků vytvoření specifické sekundární struktury označované jako jetelový list. Tato struktura disponuje několika částmi. Akceptorové rameno obsahuje koncovou sekvenci CCA, kde je ke 3' hydroxylovému konci připojen karboxyl příslušné aminokyseliny. Antikodonové rameno rozpozná kodon (triplet nukleotidů) na mRNA. Dále obsahuje D-rameno, T-rameno a nejvariabilnější úsek molekuly tzv. extra rameno (Obr. 4).



Obr. 4: Schematické znázornění molekuly tRNA.

Regulující RNA

Kromě výše zmíněných třech hlavních skupin RNA disponuje buňka ještě dalšími RNA. Často se jim souhrnně říká regulující RNA, protože mají vliv na genovou expresi nebo na uspořádání genomu (Morris and Mattick 2014). Patří sem např. malé jaderné RNA (snRNA, small nuclear RNA) ovlivňující sestřih pre-mRNA, mikro RNA (microRNA, miRNA) mají schopnost se vázat na komplementární úseky v mRNA a tím označit danou mRNA k degradaci; snoRNA (small nucleolar RNA) hrají významnou roli při editaci

především rRNA (methylace, přeměna U na pseudouridin Ψ). Dále jsou to např. heterogenní jaderné RNA (heterogenous nuclear RNA, hnRNA), dlouhé nekódující RNA (long non-coding RNA, lncRNA) a další (Elliott and Ladomery 2017).

1.1.2.2 Posttranskripční úpravy

Po přepisu genetické informace do RNA dochází k sérii reakcí, při kterých je primární transkript (pre-RNA) upravován a vzniká tak funkční molekula RNA. Všechny popsané úpravy RNA mají velmi důležitou biologickou roli. Zahrnují cílené výměny jedné chemické skupiny za jinou [editace A-I (adenosin – inosin), nebo C-U] nebo chemické úpravy RNA řetězce (např. methylace). Tyto procesy probíhají pomocí jednoho nebo více enzymů. Nejznámější úpravy RNA jsou detailněji popsány níže.

Úpravy na 5' konci.

Na 5' konci molekuly pre-mRNA probíhá čepičkování. Dochází zde k navázání tzv. kanonické čepičky, 7-methylguanosinu (m^7G). Takto očepičkovaná molekula RNA je chráněna před exonukleázami a dále je rozpoznávána proteinovými faktory pro polyadenylaci, sestřih a transport zralé molekuly mRNA z jádra (Ramanathan, Robb et al. 2016).

Kromě m^7G čepičky byly během posledních let identifikovány i tzv. nekanonické čepičky. Mezi takové patří např. kovalentně vázaný nikotinamidadenindinukleotid (NAD) (Chen, Kowtoniuk et al. 2009, Cahová, Winz et al. 2015), koenzym A (CoA) (Kowtoniuk, Shen et al. 2009, Bird, Zhang et al. 2016), FAD, UDP-Glc, UDP-GlcNAc (Julius and Yuzenkova 2017, Wang, Alvin Chew et al. 2019) nebo dinukleosid polyfosfáty (Np_nNs) (Hudeček, Benoni et al. 2020).

Úpravy na 3' konci.

Při dozrávání molekuly mRNA dochází také k polyadenylaci, což je přidání řetězce cca 250 A na 3' konec molekuly pre-mRNA. U eukaryotických organizmů je tato úprava, podobně jako v předchozím případě, nezbytná pro správné dozrání molekuly mRNA a má tedy vliv na její funkčnost, stabilitu a schopnost přepisu do proteinu (Proudfoot, Furger et al. 2002). U bakterií slouží polyadenylovaný 3' konec jako promotor pro odbourávání mRNA (Steege 2000).

I u tRNA probíhá úprava 3' konce. Původní uridinové zbytky jsou nahrazeny CCA sekvencí, kterou pak nacházíme u všech zralých tRNA (Xiong and Steitz 2004).

Splicing (sestřih)

Sestřih neboli splicing je nejlépe popsán u mRNA. Jedná se o úpravu pre-mRNA, kdy dochází k vystřížení nekódujících úseků (intronů) a spojení kódujících úseků (exonů), a tím k tvorbě funkční molekuly mRNA. Děj je katalyzován spliceozomem, což je RNA-

proteinový komplex, který obsahuje pět malých jaderných RNA (small nuclear RNA, snRNA) a přibližně 100 proteinů. Každá snRNA se váže na set těchto proteinů a tvoří tak ribonukleoproteiny (small nuclear ribonukleoprotein, snRNP) (Wilkinson, Charenton et al. 2020). Podobnou úpravou prochází i molekula pre-rRNA a pre-tRNA (Schwarz, Berkemer et al. 2020).

Kromě splicezomu byly popsány i tzv. self-splicing introny nebo ribozymy, které dokáží katalyzovat svoje vlastní vystřížení z molekuly pre-RNA (Gray and Gopalan 2020).

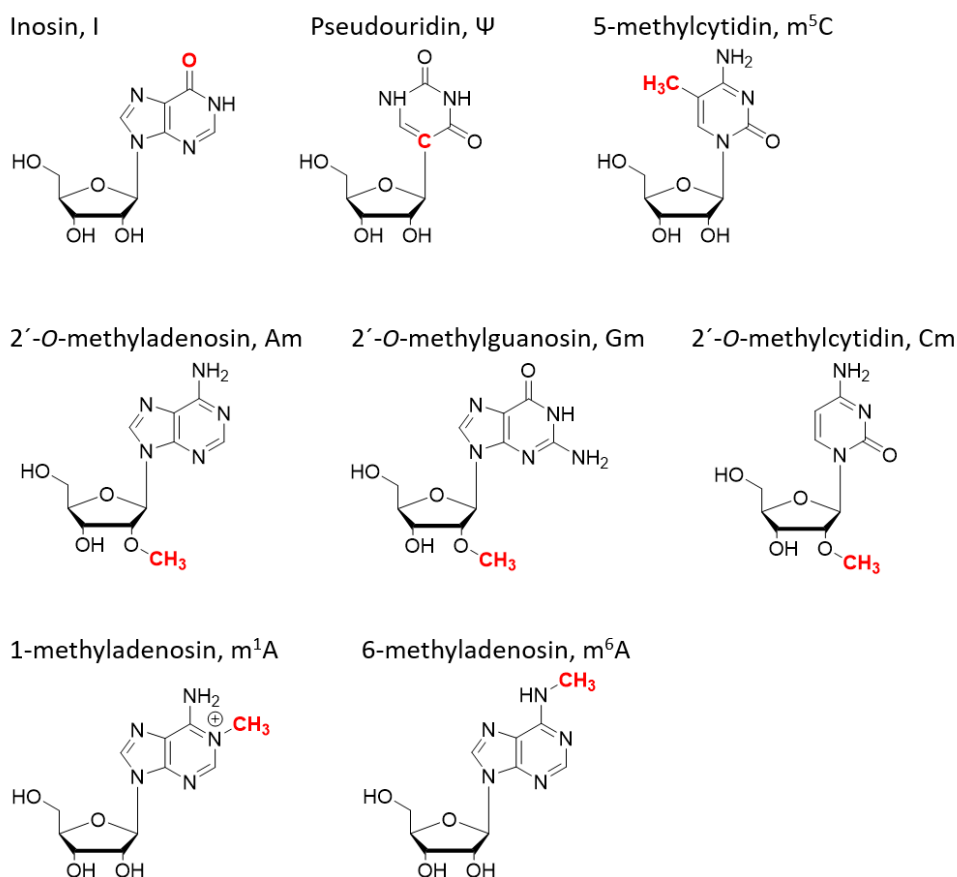
1.2 Modifikace DNA

Modifikace DNA hrají významnou roli v regulaci genové exprese buňky. Methylovaný deoxycytidin (m^5dC) byl popsán v roce 1948 a je nejlépe prostudovanou DNA modifikací tvořící přibližně 4 % všech deoxycytidinů v lidském genomu. Methylace deoxycytidinu může dlouhodobě utlumit genovou expresi a jedná se také o mechanismus transkripční regulace na úrovni DNA. Za methylace deoxycytidinu je zodpovědný enzym Dnmts. Enzym Tet (ten-eleven translocation) je schopný aktivovat demethylační kaskádu DNA, kdy dochází k oxidaci m^5dC na 5-hydroxymethyldeoxycytidin (hm^5dC), 5-formyldeoxycytidin (f^5dC) a 5-karboxydeoxycytidin (ca^5dC) (Kumar, Chinnusamy et al. 2018). Mimo m^5dC a jeho oxidační produkty byl popsán 6-methyladenosine (m^6dA) v DNA bakterií a eukaryot (Bilyard, Becker et al. 2020, Broche, Köhler et al. 2023). Díky zdokonalujícím se technikám používaných k detekci modifikací DNA dochází k objevování dalších (Sood, Viner et al. 2019).

1.3 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 (Obr. 5) (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 buňky 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, zastoupených 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, které byly v poslední době nalezeny v mRNA.



Obr. 5: struktury vybraných RNA modifikací.

1.3.1 Inosin (I)

Inosin je modifikace, která vzniká editací RNA. Jedná se o enzymovou deaminaci adenosinu (Zinshteyn and Nishikura 2009). Tento děj je umožněn skupinou deamináz specifických pro různé RNA a organizmy. U eukaryot je enzym ADAR zodpovědný za tvorbu inosinu v mRNA a nekódujících RNA. Deamináza ADAT je specifická pro tRNA

(Nishikura 2010). U *E. coli* je tato funkce připisována enzymu tadA (Wolf, Gerber et al. 2002).

Pozice A₃₄ je v tRNA téměř vždy modifikována na I₃₄ (Rafels-Ybern, Torres et al. 2019). Vzhledem k tomu, že je inosin schopen se párovat s A-, C- i U- dochází k zesílení efektu kolísavého párování bází (wobbling) modifikovaného antikodonu.

Editací A na I v kódujících částech mRNA dochází ke změně sekvence, která je kódovaná v genomu. Inosin se preferenčně váže na cytosin a je čten jako guanosin, což vede k substituci aminokyseliny v proteinovém řetězci (Licht, Hartl et al. 2019). Inosin přítomný v nekódujících částech mRNA má vliv na sekundární strukturu molekuly. Podle báze se kterou se páruje, dochází k ovlivnění stability dvouvláknová RNA (dsRNA) (Levanon, Eisenberg et al. 2004). Inosin v těchto částech dále ovlivňuje splicing a transport mRNA (Hundley and Bass 2010, Srinivasan, Torres et al. 2021).

1.3.2 Pseudouridin (Ψ)

Pseudouridin je jedna z prvních objevených a nejvíce zastoupených modifikací v buněčné RNA. Proto je někdy označován jako „pátá báze“ (Davis and Allen 1957). Vzniká enzymovou izomerací uridinu. Pseudouridin byl nalezen v kódujících i nekódujících RNA (Charette and Gray 2000). V tRNA jeho přítomnost nemá vliv na strukturu, ale ukazuje se, že hraje důležitou roli ve správném navázání tRNA na ribozom. V rRNA je jeho pozice důležitá pro lokální stabilizaci sekundární a terciární struktury ribozomu. Proto je jeho přítomnost klíčová pro tvorbu proteinu (Adachi, De Zoysa et al. 2019). V případě mRNA není role pseudouridinu zatím objasněna. Existují studie prokazující stabilizační efekt Ψ na mRNA u kvasinek (Schwartz, Bernstein et al. 2014), ale zároveň byl publikován opačný efekt u parazita *Toxoplasma gondii* (Nakamoto, Lovejoy et al. 2017). Přítomnost pseudouridinu v mRNA může také měnit způsob a rychlost translace (Karijovich and Yu 2011, Eyler, Franco et al. 2019).

1.3.3 Methylace RNA

Methylace jsou velmi rozšířenou skupinou modifikací. Stejně jako např. pseudouridin, byly methylace nalezeny napříč celým RNA spektrem. Methylovaná může být jak báze nukleosidu (někdy i na více pozicích), tak i ribóza na pozici 2'-O. Není výjimkou ani kombinace obou.

1.3.3.1 5-methylcytidin (m⁵C)

5-methylcytidin byl popsán nejdříve v DNA před více než 70 lety (Hotchkiss 1948). V RNA byl m⁵C poprvé potvrzen v roce 1975 ve virové mRNA (Dubin and Stollar 1975). Zároveň byl m⁵C detekován ve všech majoritně zastoupených RNA. V tRNA je jeho přítomnost důležitá pro dosažení správné struktury (Helm 2006). Pozice m⁵C v rRNA

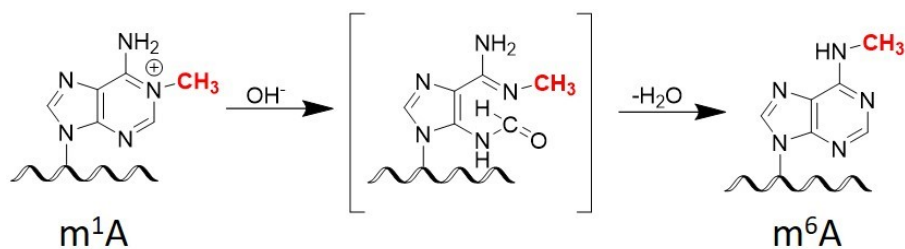
ovlivňuje poskládání ribozomální jednotky, její stabilitu a proces translace (Sloan, Warda et al. 2017). V mRNA byl studován jeho vliv na translaci, transport a stabilitu molekuly. Podle současných studií závisí efektivita translace mRNA na tom, v kterém úseku mRNA se m⁵C vyskytuje. V případě, že se m⁵C vyskytuje v kódující sekvenci mRNA, dá se jeho vliv na translaci považovat za negativní (Huang, Chen et al. 2019). Pokud je ale zvýšené množství m⁵C detekováno v 3'-UTR (nepřekládaná oblast, untranslated region), vliv na translaci mRNA se jeví jako pozitivní (Schumann, Zhang et al. 2020). m⁵C je také nezbytný pro navázání exportního proteinu (ALYREF), a tím se podílí na regulaci transportu molekuly z jádra (Yang, Yang et al. 2017). Ani v případě vlivu na stabilitu mRNA nejsou názory na přítomnost m⁵C jednotné. Studie provedená na modelovém organismu (Dánio 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 m⁵C je diskutovaná i v oblasti výzkumu rakoviny, např. jako biomarker u pacientů s hepatocelulárním karcinomem (Xue, Zhao et al. 2020).

1.3.3.2 2'-O-methylace (Nm)

2'-O-methylace, tedy methylace, které modifikují 2'-hydroxy skupinu na ribóze, byly popsány v 60. letech 20. století (Jones and Robins 1963, Hall 1964). Pokud je tato methylace přítomna v eukaryotické mRNA na prvním a druhém nukleotidu za 5' čepičkou, tvoří tzv. Cap1 a Cap2 (čepičku 1 a 2). Ty jsou následně zodpovědné např. za translaci, stabilitu molekuly nebo její odbourávání (Smietanski, Werner et al. 2014, Picard-Jean, Brand et al. 2018).

1.3.3.3 1-methyladenosin (m¹A)

Modifikace m¹A 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 m¹A kladný náboj, což může ovlivňovat strukturu RNA a/nebo RNA-protein interakci. Methylová skupina v pozici N¹ blokuje klasické Watson-Crickovo párování bází, tedy A:U nebo A:T. m¹A je však schopný vytvořit vodíkový můstek i s jinými bázemi (Hoosteen párování bází). Tato vazba je však méně stabilní v porovnání s klasickou vazbou A:U nebo A:T (Xiong, Li et al. 2018). Methylovou skupinu lze chemicky *in vitro* přemístit z pozice N¹ na pozici N⁶ adeninu (Dimrothův přesmyk). Reakce probíhá za alkalických podmínek, kdy dochází k otevření kruhu a přesmyku methylu (Obr. 6) (Macon and Wolfenden 1968). Této reakce bylo využito pro přípravu kontrolních vzorků v několika sekvenačních technikách (Dominissini, Nachtergaele et al. 2016, Li, Xiong et al. 2017).



Obr. 6: Schéma Dimrothova přesmyku.

V tRNA je přítomnost m¹A 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 podjednotce (Sharma, Hartmann et al. 2018). Studie zabývající se počtem m¹A v mRNA jsou prozatím nejednoznačné. V lidské mRNA identifikoval Li et al. stovky m¹A (Li, Xiong et al. 2017), oproti tomu Safra et al. popsal pouze desítku modifikovaných míst (Safra, Sas-Chen et al. 2017). Obě studie se ale shodují v tom, že pokud je m¹A obsažen v kódující oblasti mitochondriální mRNA, brání translaci, díky narušení Watson-Crick interakce.

1.3.3.4 N⁶-methyladenosin (m⁶A)

Přítomnost m⁶A byla v savčích mRNA potvrzena v 70. letech (Desrosiers, Friderici et al. 1974). Jedná se o nejvíce zastoupenou modifikaci v eukaryotické mRNA (Zhao, Roundtree et al. 2017). V posledních letech se tato modifikace stala centrem zájmu mnoha studií. Její výskyt a/nebo naopak celková absence v různých transkriptech mRNA, a dále schopnost dynamicky měnit svou přítomnost v molekule mRNA, dala vzniknout novému odvětví ve výzkumu RNA, epitranskriptomice (Saletore, Meyer et al. 2012, Yue, Liu et al. 2015).

1.3.4 Další modifikace

Další chemické modifikace vznikají náročnější úpravou RNA. Většinou se jedná o multienzymové reakce jako je např. přidání aminokyseliny (N⁶-threonylcarbamoyladenosin, t⁶A) (Perrochia, Guetta et al. 2013), cukru (galaktosyl queuosin, galQ) (Thumbs, Ensfelder et al. 2020) nebo mastné kyseliny (2-geranylthiouridin, ges²U) (Haruehanroengra, Vangaveti et al. 2020). Tyto složitější modifikace byly zatím popsány pouze v tRNA. To ale může být způsobeno poměrně vysokým zastoupením těchto RNA v buňce a neznamená to, že se nevyskytují i v jiných RNA.

1.4 Epitranskriptomika a role m⁶A v buňce

Během studia m⁶A a jeho vlivu na RNA došlo k velkému posunu v chápání jeho vlivu, když se podařilo identifikovat buněčné proteiny, které jsou schopné přidat metylaci

do pozice N^6 adeninu („writers“), odebrat tuto metylaci („erasers“) nebo s ní interagovat („readers“). Studium celého aparátu m^6A odhalilo, že m^6A ovlivňuje mnoho buněčných dějů spojených s biologickými procesy RNA (např. sestřih, lokalizace nebo translace RNA). Přítomnost m^6A má také vliv na strukturu a stabilitu molekuly RNA. Z biologického hlediska můžeme říci, že m^6A ovlivňuje vývoj organismu, diferenciaci kmenových buněk, imunitu buňky, krvetvorbu, onkogenesi, funkci neuronů a další.

1.4.1 Proteiny vytvářející m^6A v RNA („writers“)

Hlavní enzym schopný přidat methyl do pozice N^6 některých A v mRNA je methyltransferáza METTL3. Vlastnosti tohoto enzymu jsou ale závislé na interakcích s dalšími proteiny, METTL14, WTAP, ZC3H13, VIRMA (KIA1429) a RBM15/15B (Liu, Yue et al. 2014, Ping, Sun et al. 2014, Wen, Lv et al. 2018, Yue, Liu et al. 2018). Kromě METTL3 (a jeho komplexů) byly v nedávné době objeveny ještě další tři enzymy, vykazující m^6A methyltransferázovou aktivitu u eukaryot. Patří mezi ně ZCCHC4, který je schopen vytvořit m^6A v 28S rRNA. Enzym METTL16 přidává methylovou skupinu k U6 snRNA, ale také k některým dalším mRNA. Enzym PCIF1 je „čepičkový“ enzym, který katalyzuje vznik m^6Am v rámci RNA čepičky a závisí na přítomnosti 2'-O-methyl skupiny.

1.4.2 Proteiny demethylující m^6A („erasers“)

Enzymy, které jsou schopné demethylovat m^6A na A jsou FTO a ALKBH5. ALKBH5 je schopen odebrat methyl nejen z m^6A , ale také z m^6Am (Jia, Fu et al. 2011, Mauer, Luo et al. 2017). Objevení těchto m^6A demethyláz a zjištění, že methylované skupiny z pozice N^6 methylace na A je možné přidat či odebrat z mRNA v závislosti na určitých podmínkách dala vzniknout novému oboru, epitranskriptomice.

1.4.3 Proteiny schopné rozpoznat m^6A v molekule RNA („readers“)

m^6A přítomný v RNA je rozpoznáván proteiny, které jsou schopné se na toto místo navázat, a tak regulovat stabilitu, polyadenylaci, export z jádra, sestřih a efektivitu translace u cílových RNA. Nejlépe popsané m^6A vázající proteiny jsou tzv. YTHD proteiny (YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1 a YTHDC2). Na m^6A se váží přes svoji C-terminální YTH doménu. Pokud mRNA obsahuje m^6A , je YTHDF1 schopný podporovat translaci, YTHDF2 naopak svým navázáním podporuje odbourávání mRNA. YTHDF3 a YTHDC2 mají schopnost regulovat oba procesy. YTHDC1, se vyskytuje v buněčném jádru a reguluje sestřih a alternativní polyadenylaci (Wang, Lu et al. 2014, Wang, Zhao et al. 2015, Shi, Wang et al. 2017).

Kromě výše uvedených proteinů obsahujících YTH doménu, jsou popsány i další proteiny vázající se na RNA obsahující m⁶A (eIF3D, FMR1, IGF2BP1-3...). Dále byly popsány proteiny, které jsou RNA obsahující m⁶A odpuzovány (G3BP1-2, CAPRIN1). Obě skupiny byly objeveny v nedávné době a jejich přesná funkce zatím nebyla dostatečně prozkoumána (Williams, Gokhale et al. 2019).

I u některých dalších modifikací byly detekovány proteiny zodpovědné za přidání, odebrání či čtení dané modifikace. Z pohledu epitranskriptomiky však m⁶A zůstává nejlépe charakterizovanou modifikací (Lauman and Garcia 2020).

1.5 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.

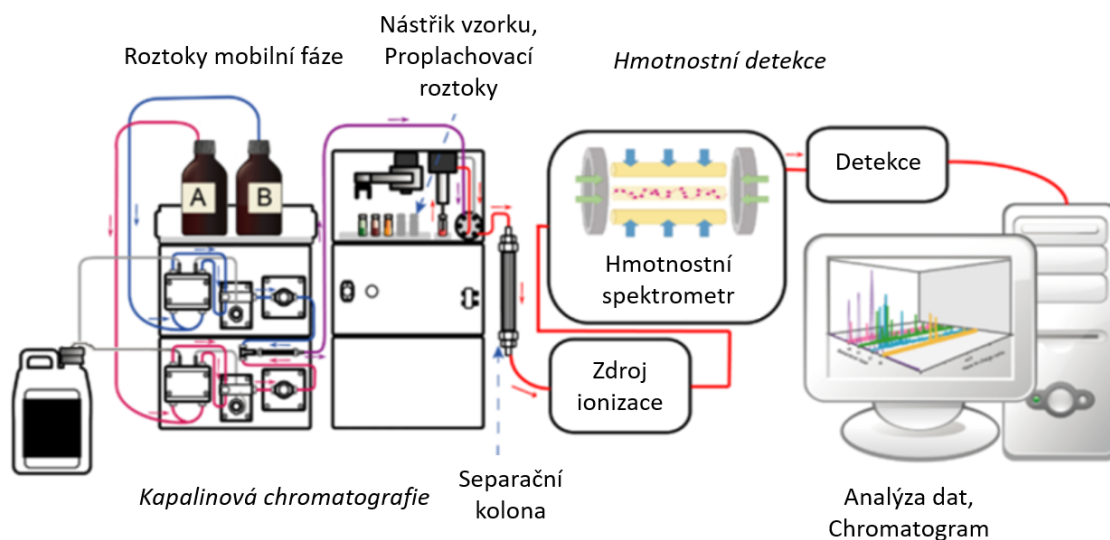
Historicky byly první modifikace identifikovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (Thin Layer Chromatography, TLC) (Cohn 1959). Na přelomu 60.-70. let pomohl k identifikaci modifikací objev hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS). Neznámé modifikace byly lépe popsány a bylo možné připravit syntetické standardy. Ty dále přispěly k potvrzení daných modifikací a hojně se využívali při TLC (Grosjean, Keith et al. 2004) a později vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Další posun nastal spojením HPLC separace s MS detekcí (Banoub and Limbach 2009). Tyto techniky sice byly a jsou schopny detekovat různé typy modifikací v RNA, v průběhu zpracování vzorku se ale ztrácí informace o pozici dané modifikace v sekvenci. Proto byly dále vyvíjeny metody, které se snažily co nejvíce upřesnit pozici dané modifikace v sekvenci RNA.

První technikou snažící se o přesnější mapování dané modifikace v sekvenci RNA byla kombinace ribonukleázového štěpení RNA (RNáza) a elektroforetické separace (Sanger, Brownlee et al. 1965). Tato metoda je založená na RNázovém štěpení, které přináší různé dlouhé fragmenty analyzované RNA, které v případě, že obsahují modifikaci, rozdílně migrují. Následně pak ale vyžaduje sekvenaci daných fragmentů pro lokalizaci modifikace. Toto náročná a nepřesná metoda byla nahrazena po objevení reverzní transkriptázy (RT). RT patří do skupiny enzymů s polymerázovou aktivitou a katalyzuje transkripci jednovláknové RNA (ssRNA) do jednovláknové DNA (ssDNA). Využití tohoto enzymu v kombinaci s polymerázovou řetězovou reakcí (Polymerase Chain Reaction, PCR) vznikla technika RT-PCR. RT-PCR je variantou klasické PCR, kde se ale k amplifikaci používá RNA jako templát (místo DNA u klasické PCR), která je pomocí RT převedena do cDNA a další pokračování je stejné, jako u klasické PCR. Oproti

původním, je metoda citlivější a schopna lépe mapovat modifikace v různých RNA (Motorin, Muller et al. 2007).

1.5.1 Kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (LC-MS)

I v dnešní době zůstává kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) (Obr. 7) 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 touto technikou možné stanovit 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.



Obr. 7: Schéma kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

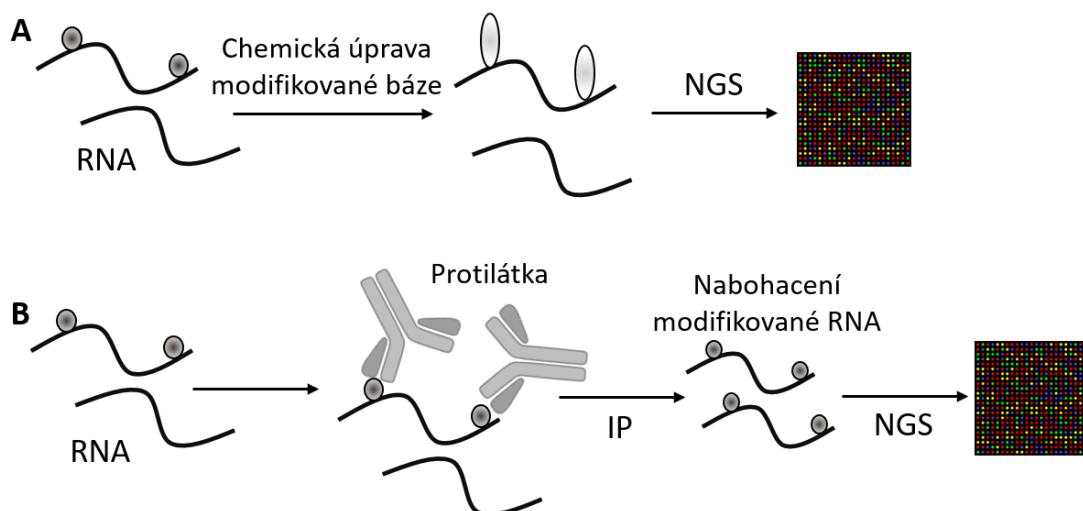
1.5.2 RNA sekvenační techniky (RNA-seq)

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 transkriptázy (RT), které přepisují RNA do cDNA. cDNA je pak znásobena během polymerázovou řetězové reakcí (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 vložením jiného/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 reakci RT při přepisu (Obr.8A).

Další technikou kombinovanou s RNA-seq je imunoprecipitace (IP) (Obr. 8B). 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.

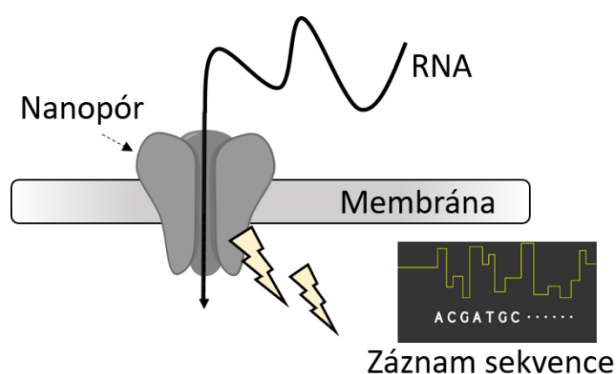


Obr. 8: Schéma RNA-seq technik. (A) Chemické značení modifikované báze. (B) Značení modifikované báze protilátkami a imunoprecipitace (IP).

1.5.2.1 Přímá sekvenace RNA pomocí Oxford Nanopore technologie

Nejnovější a pravděpodobně budoucí sekvenační technologií je tzv. nanopore sekvenování neboli přímé sekvenování (Obr. 9). Tato technika nevyužívá reverzní transkriptázu ani amplifikaci přepsaných úseků. RNA i její modifikace jsou sekvenovány přímo. Řetězec RNA prochází otvorem v membráně, nanopórem, který je obklopen elektrickým polem.

Při průchodu dochází k narušení tohoto pole. Takto zaznamenaný signál je pak pro každou bázi (včetně modifikovaných) unikátní a báze se podle něho dá identifikovat. Největším úskalím této technologie je nalezení vhodného algoritmu, který dokáže rozpoznat i velmi drobné změny ve výkyvech proudu a efektivně potvrdit o jakou bázi a hlavně o jakou modifikaci se jedná (Garalde, Snell et al. 2018, Leger, Amaral et al. 2019). Nanopore sekvenování není oproti jiným technikám ještě rutinně používáno. Jeho zdokonalení a vývoj ale během posledních let prošel velkým pokrokem. Kromě kanonických bazí bylo tohoto sekvenování úspěšně využito i k detekci několika modifikovaných bazí (Wang, Zhang et al. 2022).



Obr. 9: Schéma přímého sekvenování technologií Oxford Nanopore.

1.5.2.2 Techniky detekce jednotlivých RNA modifikací

Inosin (I)

Jak bylo zmíněno výše, v RNA dochází k editaci A na I (A to I RNA Editing) pomocí deamináz (ADAR, ADAT...). Jedna z možností, jak detekovat tuto modifikaci je využití přepisu RNA do cDNA pomocí RT, kdy I je RT do sekvence cDNA přepisováno jako G. K potvrzení modifikace je takto získaná cDNA porovnávána s odpovídajícími úseky v genomové sekvenci. Metoda je však velmi nepřesná a přináší velké množství falešně pozitivních výsledků (Okada, Sakurai et al. 2015). Proto byla dále upravována.

Nedávno byla vynalezena sekvenační technika s názvem ICE seq (Inosine chemical erasing seq), kdy inosin selektivně reaguje s akrylonitrilem (kyanoethylenem) a nově vzniklý derivát způsobí pád RT, což vede ke zkrácení RT PCR produktů. Při analýze dat se pak porovnávají vzorky původní RNA a RNA po reakci s akrylonitrilem (Sakurai, Yano et al. 2010, Suzuki, Ueda et al. 2015).

Jiná metoda, iSEQ (inosine specific sequencing) je sekvenování využívající specifitu enzymu RNázy T1, která štěpí RNA v pozici nemoifikovaného G nebo I. V přítomnosti borátu tvoří G stabilní adukt s glyoxalem a ten RNázou T1 rozpoznáván není. Dochází tedy ke štěpení RNA pouze v místech kde je I (Cattenoz, Taft et al. 2013).

Pseudouridin (Ψ)

K mapování pseudouridinu bylo vytvořeno několik technik. Ψ -seq (Schwartz, Bernstein et al. 2014), Pseudo-seq (Carlile, Rojas-Duran et al. 2014), PSI-seq (Lovejoy, Riordan et al. 2014) se opírají o specifickou a stabilní vazbu mezi Ψ a karbodiimidem (CMC). Navázání CMC v místě modifikace zapříčiní následný pád RT a určí tedy polohu pseudouridinu. Zdokonalením předešlých technik je CeU-seq (Li, Zhu et al. 2015), který používá stejný princip, tedy vazbu Ψ s CMC. Na CMC je pomocí klik-reakce navázán biotin. Následně použitím vyvazovací (pull-down) techniky dochází k nabohacení vzorku (fragmentů RNA) obsahujícího Ψ ještě před použitím RT. Takto upravený protokol zvyšuje citlivost metody.

RBS-seq (Khoddami, Yerra et al. 2019) je modifikované bisulfidové sekvenování (níže). Technika zahrnuje Ψ -monobisulfidovou adukci, následné otevření ribózového kruhu pomocí vysoké teploty a reorientaci molekuly za přítomnosti Mg^{2+} . Takto upravený fragment RNA je přepisován do cDNA pomocí RT. V místě výskytu Ψ dochází při přepisu pomocí RT k přeskočení báze (deleci).

5-methylcytidin (m^5C)

I v případě m^5C byly pro detekci pozice methylované báze použity protilátky, technika se nazývá m^5C -RIP (Edelheit, Schwartz et al. 2013). Další metodou 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).

Odlíšnou technikou je bisulfidové 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.

2'-O-methyl modifikace (Nm)

2'-O-methyl modifikace jsou poměrně nereaktivní a doposud se nepodařilo proti těmto modifikacím vyvinout protilátky. Methylace na ribóze můžeme najít jako součást „čepičky“, kdy se dá detekovat pomocí UPLC-MS/MS (Wang, Alvin Chew et al. 2019). Pro 2'-O-modifikace vyskytující se uvnitř řetězce, bylo vytvořeno několik metod. Tyto techniky jsou většinou postaveny na vyšší chemické odolnosti methylované pozice. Odolnost vůči zásaditému prostředí využívá RiboMetSeq (Birkedal, Christensen-Dalsgaard et al. 2015). RibOxi-seq a Nm-seq jsou techniky využívající stabilitu

modifikace během působení oxidačního činidla NaIO₄ a β-eliminace (Dai, Moshitch-Moshkovitz et al. 2017, Zhu, Pirnie et al. 2017, Dai, Moshitch-Moshkovitz et al. 2018).

N¹-methyladenosin (m¹A)

m¹A-seq je klasická sekvenační technika využívající různé typy reverzních transkriptáz (RT). Podle typu RT dochází při přepisu v místě m¹A buď k zastavení transkripce (Hauenschild, Tserovski et al. 2015) nebo k vnesení jiného nukleotidu (Safra, Sas-Chen et al. 2017).

Protilátky proti m¹A, následná imunoprecipitace fragmentů, které obsahují modifikovanou bázi a přepis do cDNA pomocí RT bylo použito u technik m¹A-meRIP (Dominissini, Nachtergaele et al. 2016), m¹A-ID-seq (Li, Xiong et al. 2016), m¹A-MAP (Li, Xiong et al. 2017). Hlavními rozdíly mezi metodami je příprava kontrolních vzorků a použití různých typů reverzních transkriptáz. V případě m¹A-meRIP byl pro přípravu kontrolních vzorků použit Dimrotův přesmyk. Li a jeho skupina využívali pro přípravu kontrolních vzorků demethylázu ALKB. V případě m¹A-ID-seq byla použita AMV RT, která by měla zastavit přepis při setkání s m¹A a v případě m¹A-MAP byla pak použita TGIRT RT, která by měla při setkání s m¹A vnést jinou bázi. Vzhledem k tomu, že velká část této práce je věnována právě mapování m¹A, budou technické detaily a způsob tvoření knihoven uvedeny a diskutovány níže.

N⁶-methyladenosin (m⁶A)

Nejnámější metody využívající specifické protilátky proti m⁶A jsou MeRIP-seq (Meyer, Saletore et al. 2012), m⁶A-seq (Dominissini, Moshitch-Moshkovitz et al. 2013) a miCLIP (Linder, Grozhik et al. 2015).

PA-m⁶Aseq je metoda, která také využívá protilátky proti m⁶A. Je však kombinována s metabolickým značením pomocí 4-thiouridinu (4SU) a UV-crosslinkingem (Chen, Lu et al. 2015).

SCARLET je mapovací technika, která nevyužívá protilátky. Její výhodou je robustnost (lze použít na celkovou RNA izolovanou z buňky). Využívá kombinaci specifického štěpení RNázou H, ligaci, ribonukleazové štěpení a TLC. Jedná se ale o metodu velmi komplikovanou, finančně náročnou a oproti klasickým sekvenačním technikám dokáže stanovit stupeň methylace pouze pro jeden testovaný adenosin (Liu, Parisien et al. 2013). DART-seq je jedna z novějších neprotilátkových technik mapujících pozici m⁶A, která využívá APOBEC1 cytidinovou deaminázu spojenou s m⁶A vázající doménu YTH (APOBEC1- YTH). Cytidiny vedle m⁶A jsou deaminované na U a ty jsou rozpoznané pomocí RNA-seq (Meyer 2019).

Protilátky nejsou využívány ani v technice MAZTER-seq. Ta využívá k detekci m⁶A bakteriální MazF RNázu, která štěpí RNA v ACA motivu, kde se nevyskytuje methylace. Podobně jako u m⁶A-seq je metoda schopna detekovat více pozic m⁶A. K nevýhodám

metody patří fakt, že MazF RNáza štěpí v minimální míře i v jiném než ACA motivu, což může ovlivnit výsledek (Garcia-Campos, Edelheit et al. 2019).

Vzhledem k tomu, že m⁶A je jedna z nejvíce zastoupených a nejlépe popsáných modifikací, existuje mnoho dalších metod k detekci m⁶A. Výše jsou uvedeny nejznámější z nich.

Další modifikace

Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD)

Další nedávno objevenou modifikací je NAD. NAD je modifikace detekována na 5' konci RNA a je definována jako jedna z tzv. kofaktorových čepiček. Pro detekci NAD byla vyvinuta metoda na základě hmotnostní spektrometrie (Chen, Kowtoniuk et al. 2009), která byla následně zdokonalena, CapQuant (Wang, Alvin Chew et al. 2019). Při NAD-capQ se pomocí oxidační reakce, vytvoří barevný produkt měřitelný při 450 nm, který je přímo úměrný množství NAD v testované RNA (Grudzien-Nogalska, Bird et al. 2018). Všechny tři metody jsou schopné kvantitativně stanovit NAD, ale nepřinášejí informace, z jaké RNA pochází. K tomuto účelu byly vyvinuty chemoenzymatické postupy značící NAD-RNA v kombinaci se sekvenováním. NAD captureSeq využívá enzymu ADP-ribozylcyklázy (ADPRC), který specificky vymění nikotinamid za 4-pentyn-1-ol. Následně je využita mědi-katalyzována azid-alkyn cykloadice (CuAAC), tzv. „klik“ reakce. Při té dochází k navázání azid-biotinu na místo alkynu v NAD-RNA. Použitím streptavidinu dochází k nabožení biotynilovaných NAD-RNA a následuje standardní sekvenační protokol využívající reverzní transkriptázu (Cahová, Winz et al. 2015, Winz, Cahová et al. 2017). CuAAC „klik“ reakce se také uplatňuje v NAD tagSeq, následně je místo biotinu použito značení RNA-sekvencí. I takto značená NAD-RNA je nabožena díky vychytávání pomocí komplementární sekvence. Nabožené frakce jsou analyzovány přímou sekvenací (Oxford Nanopore technology) (Zhang, Zhong et al. 2019). Analogy k těmto technikám jsou SPAAD-NAD-Seq (Hu, Flynn et al. 2021) a NAD tag-Seq II (Zhang, Zhong et al. 2021). Obě techniky používají ADPRC k navázání azidu a následně „klik“ reakci s biotynilovaným/RNA sekvencí značeným dibenzocyklooktynaminem.

1.6 Viry

Viry jsou drobní vnitrobuněční cizopasnici. 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. Virové částice neboli viriony mohou mít různý tvar. Uvnitř virové partikule je nukleová kyselina kódující vir. NK je obalena proteinovou schránkou, kapsidou. Dohromady pak tvoří nukleokapsidu. Nejjednodušší virové partikule mají pouze

nukleokapsidu (pikornaviry, adenoviry, papilomaviry...). Tzv. obalené viry mají kromě kapsidy i další obal (retroviry, herpesviry, paramyxoviry...). Tento obal je tvořen proteiny a lipidy, často převzatými z hostitelské buňky. Přítomné glykoproteiny pak slouží v interakci s buněčnými receptory.

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) (Obr. 10) (Baltimore 1971, King, Adams et al. 2012):

I: dsDNA viry – virová DNA je přepsána do mRNA a translačním mechanismem buňky přeložena do proteinu. (Herpesviry, Papillomaviry, Polyomaviry, Poxviry).

II: ssDNA viry – k vlákně virové DNA je syntetizováno komplementární vlákně. Vzniklá dsDNA je přepsána do mRNA a následně přeložena do proteinu. (Parvoviry, Microviry).

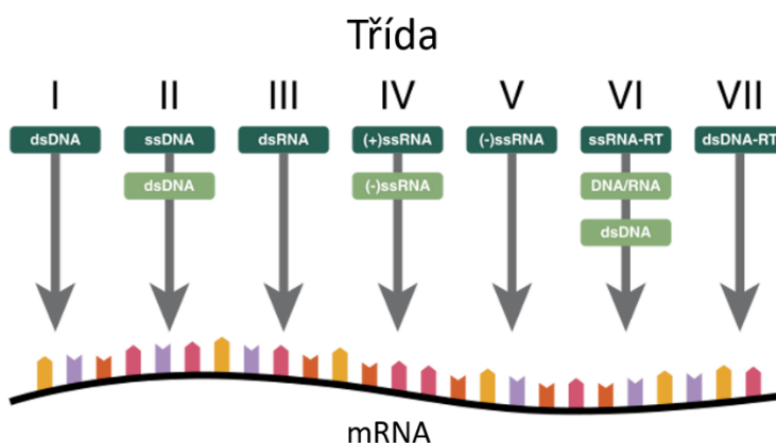
III: dsRNA viry - +RNA vlákně slouží jako mRNA, tedy je přepisováno do proteinu. -RNA vlákně je přepsáno do +RNA, která následně slouží k syntéze nových virových RNA. (Reoviry).

IV: (+)ssRNA viry – virová RNA je přímo využita jako mRNA a je na ribozomech překládána do proteinu. (Picornaviry, Coronaviry, Flaviviry).

V: (-)ssRNA viry – virová -RNA je nejprve přepsána do +RNA a ta je pak využita k tvorbě proteinů. (Paramyxoviry, Rhabdoviry, Orthomyxoviry).

VI: ssRNA-RT viry - +RNA vlákně je RT přepsáno do -DNA a následně do +DNA. Vzniklá dsDNA je zabudována do genomu hostitele. (Retroviry).

VII: dsDNA-RT viry – mají genom kódovaný v dsDNA. Oproti dsDNA virům však během své replikace provádí mezikrok, kdy tvoří RNA. (Hepadnaviry).



Obr. 10: Schéma Baltimorovy klasifikace virů podle nukleové kyseliny kódující genom.

1.6.1 Životní cyklus viru

Životní cyklus je plně navázán na hostitelkou buňku. Podle typu viru může jeho reprodukce probíhat s drobnými odlišnostmi. Těchto šest pilířů v životním cyklu viru však zůstává stejných pro všechny viry (Obr. 11).

1) Navázání na hostitelskou (vnímavou) buňku.

V první fázi dochází k navázání viru na hostitelskou buňku. To probíhá pomocí virového receptoru, většinou proteinu, který rozpoznává buněčný receptor (nejčastěji glykoprotein). Pokud buňka nemá příslušný vazebný receptor, k interakci nedochází a buňka nemůže být virem napadena.

2) Penetrace (průnik viru do buňky).

Po propojení receptorů dochází k průchodu viru přes membránu. U neobalených virů tato interakce spouští mechanismus endocytózy a vir vstupuje do buňky. V případě obalených virů dochází k membránové fúzi a do buňky vstupuje pouze kapsida chránící genetickou informaci viru.

3) Uvolnění nukleové kyseliny viru.

Po průniku viru do buňky dochází k rozštěpení kapsidy, která kryje genetickou informaci viru. K tomu dochází působením buněčných proteolytických enzymů.

4) Replikace viru.

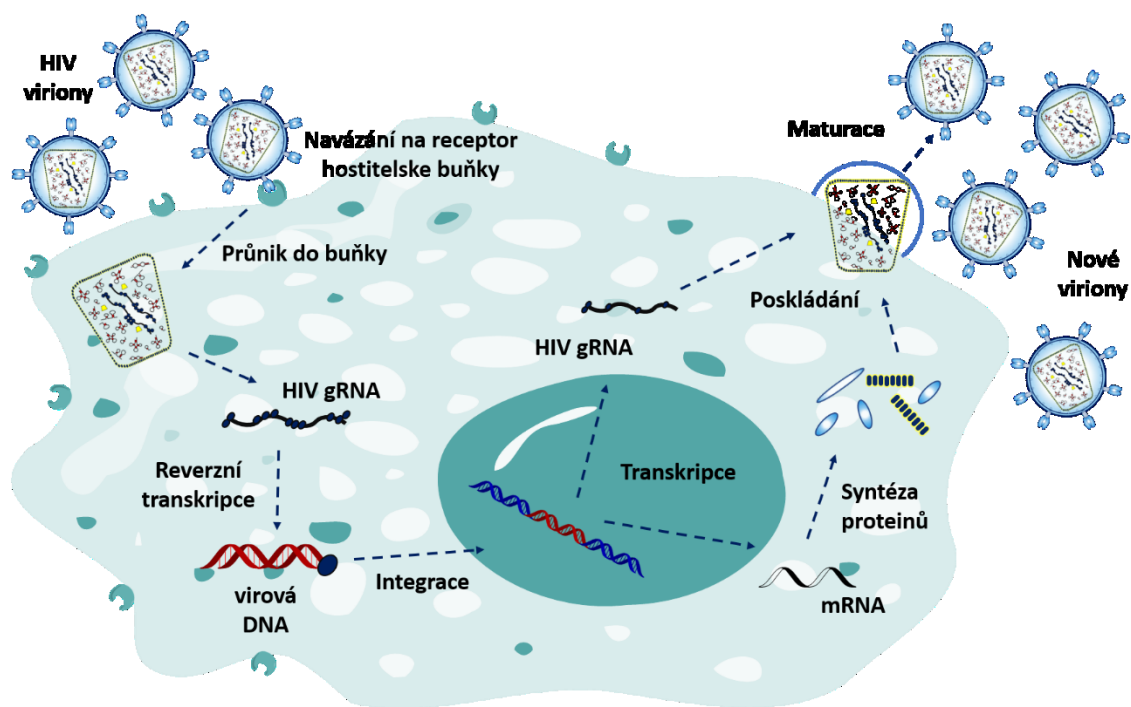
Po uvolnění nukleové kyseliny dochází primárně k namnožení genetické informace viru. Tento krok dále zahrnuje syntézu virové mRNA a tvorbu virových proteinů.

5) Poskládání viru.

Pokud jsou jednotlivé komponenty viru v buňce připraveny, dochází k poskládání nové virové částice.

6) Uvolnění viru.

K uvolnění viru z buňky může docházet zpravidla dvěma způsoby. V prvním případě dochází k napumpování buňky virem s následným prasknutím buňky a uvolněním viru, tzv. lyze buňky. V druhém případě dochází nejprve k vepsání virové genetické informace do genetické informace buňky. Ta pak při každém dělení tuto informaci nese dál. Virové částice v tomto případě opouštějí buňku tzv. pučením.



Obr. 11: Životní cyklus viru HIV-1.

1.6.2 Vybrané viry

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.

1.6.2.1 Retroviry

Retroviridae je čeleď 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 kapsidu, 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 integrázou 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).

Virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV)

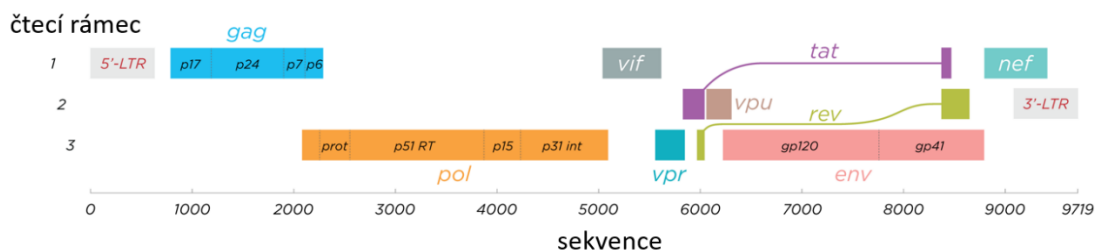
HIV patří do podčeledi *Lentivirus*, které zpravidla způsobují dlouho trvající onemocnění, kterému může předcházet i poměrně dlouhá doba latence. HIV má dva podtypy. HIV-1 je

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 se nejčastěji přenáší nechráněným pohlavním stykem s nakaženým nebo infikovanou krví (nesterilní injekční stříkačky, transplantace...). Dále je možný přenos z matky na dítě během těhotenství, porodu a při kojení. Virus napadá buňky imunitního systému, T lymfocyty (specificky CD4⁺ T buňky), makrofágy a dendritické buňky. Během infekce dochází ke kritickému poklesu CD4⁺ T buněk a v případě, že dojde k poklesu pod kritickou hranici (nižší než 200 buněk/μL krve), dochází ke ztrátě obranyschopnosti organismu. To způsobuje syndrom získaného selhání imunity, známé jako AIDS. Nemocný následně podléhá opurním infekcím (onemocnění způsobené parazity, kteří za běžných podmínek nejsou patogenní) nebo rakovině (Powell, Benková et al. 2016).

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), který obsahuje dvě kopie genové +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 (Obr. 12). 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. Dalších 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).

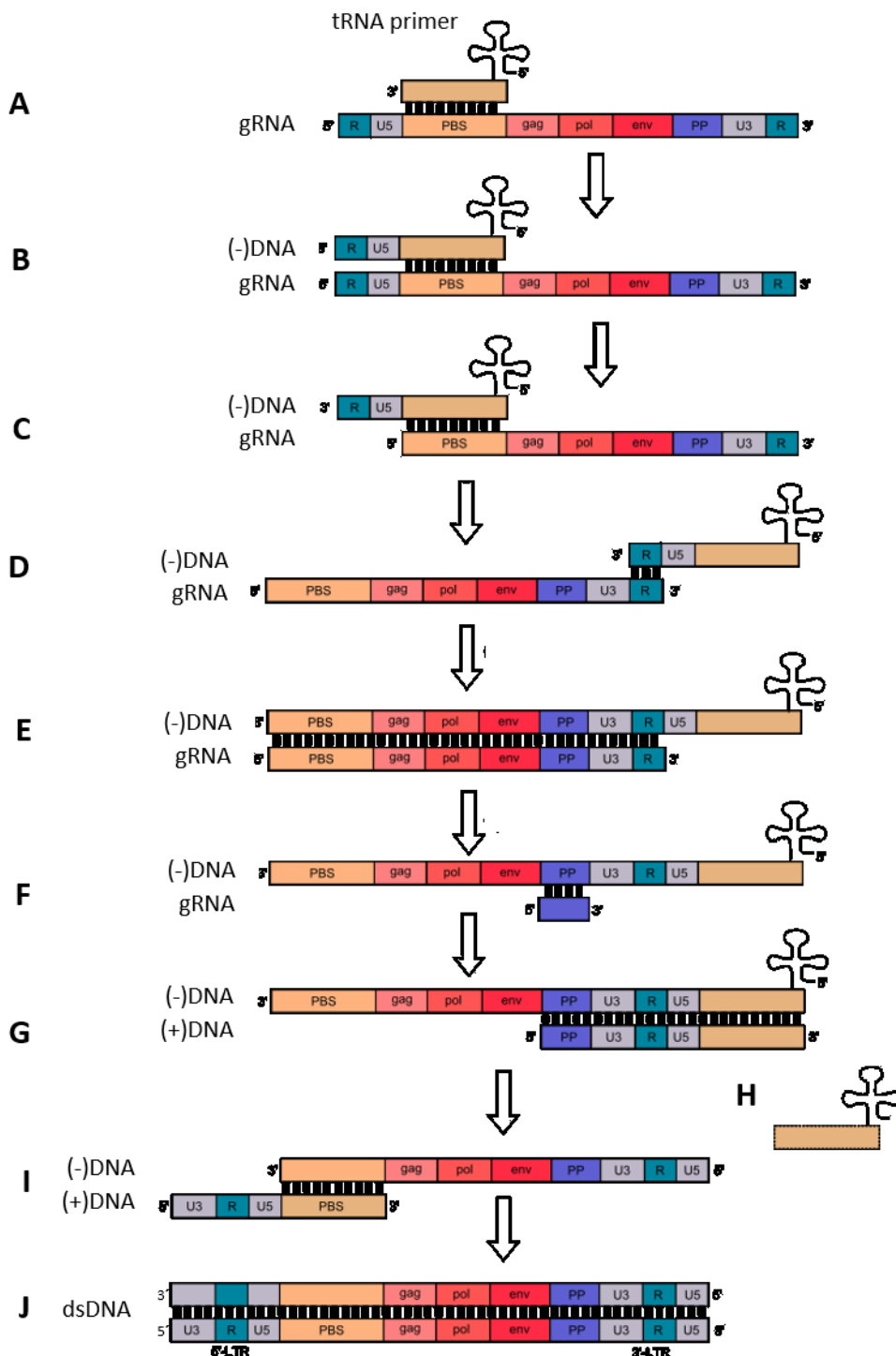


Obr. 12: Schéma genomu HIV-1.

Mechanismus vstupu HIV-1 do buňky

Počáteční interakce mezi virem a buňkou nastává navázáním gp120 na receptor buňky CD4. Následné konformační změny gp120 (CD4 nebo obou) jsou s největší pravděpodobností zapotřebí pro navázání gp120 na chemokininový koreceptor (např. CCR5, CXCR4) a vytvoření stabilnější vazby. Tyto interakce by měly nastartovat kaskádu strukturních změn proteinu gp41. *N*-terminální konec gp41 prostupuje do membrány napadené buňky. Následné přeložení extracelulární části gp41 vytváří vlásenkovou strukturu, díky které dochází k přitažení buněčné membrány k virové částici a propojení obou membrán. Následuje fúze virové kapsidy do cytoplasmy buňky (Chen 2019). Doposud bylo uváděno, že kapsida v cytoplasmě podléhá částečné nebo celkové degradaci. Nejnovější studie ale přicházejí s informací, že celá kapsida prostupuje do jádra buňky (Müller, Zila, et al. 2022). Přesný mechanismus ale popsán není. Dále startuje replikace HIV-1 pomocí reverzní transkriptázy, kterou si virus přinesl s sebou.

RT je schopna vytvořit virovou DNA v několika krocích, využitím enzymové aktivity RNA-dependentní DNA polymerázy (RDDP), RNázy H a DNA-dependentní DNA polymerázy (Obr. 13). Na 5' konci virové genové ssRNA se nachází sekvence 18 nt známých jako místo navázání primeru (primer binding site, PBS). To je komplementární s 18 nt na 3' konci lidské tRNA^{Lys3}, která slouží jako primer. Navázáním tRNA^{Lys3} na PBS HIV gRNA dochází ke vzniku duplexu (dsRNA) (Obr 13A). Tento duplex je rozpoznán RT (RDDP aktivita) a iniciuje syntézu negativního DNA vlákna komplementárního k virové ssRNA. Syntéza probíhá k 5' konci virové ssRNA za vzniku RNA/DNA hybridu (Obr. 13B). Následně dochází k selektivní degradaci RNA vlákna z hybridu RNA/DNA pomocí RNázy H (Obr. 13C). Nově vzniklé DNA vlákno je přeneseno k 3' konci gRNA, kde dochází k hybridizaci (Obr. 13D). Tento proces je nazýván přenosem prvního vlákna. Následuje dokončení syntézy (-) DNA (Obr. 13E). V dalším kroku je templátové vlákno gRNA, kromě úseku bohaté na puriny (polypurine, PP), degradováno RNázou H (Obr. 13F). RT začíná syntézu (+) DNA vlákna z místa PP, kterého využívá jako primeru. Syntéza (+) DNA vlákna postupuje až k prvnímu z 18 nukleotidů navázané tRNA^{Lys3}, kde je přítomností velkého množství modifikovaných bazí zablokována (Obr. 13G). Dále dochází k odstranění tRNA (Obr 13H) a tzv. přenosu druhého vlákna, tedy navázání PBS nově vzniklé (+) DNA k PBS (-) DNA (Obr. 13I). Celý proces je ukončen obousměrným dosyntetizováním DNA a vznikem virové dsDNA (Obr. 13J) (Singh and Das 2022).



Obr.13: Schematické znázornění mechanismu reverzní transkripce. (A) Navázání tRNA^{Lys} jako primeru. (B) Syntéza (-) DNA od 5' ke 3' konci. (C) Degradace RNA ze vzniklého RNA/DNA komplexu pomocí RNázou H. (D) Přenos prvního vlákna. (E) Dokončení syntézy (-) DNA vlákna. (F) Degradace templátového vlákna. (G) Syntéza (+) DNA vlákna. (H) Odstranění tRNA^{Lys}. (I) Přenos druhého vlákna. (J) Dokončení syntézy obou vláken.

dsDNA (provirová DNA) je přenesena do jádra buňky a integrována do genomu hostitelské buňky pomocí virového enzymu integrázy. Inkorporovaná provirová DNA se

chová jako součást buněčného chromozomu hostitelské buňky a je replikována běžným mechanismem buněčné DNA. Provirová DNA zabudovaná v chromozomu může zůstat v klidu i několik let, anebo může dojít k okamžité aktivaci. To vše v závislosti na okolních podmínkách a stavu buňky. Pro aktivaci HIV transkripce jsou nutné jak buněčné, tak virové faktory. Aktivace T-buněk skrz jejich receptory nebo virovou infekcí a přítomnost cytokininů vede ke stimulaci a přenosu buněčných transkripčních faktorů (např. NF- κ B, AP-1...) které transaktivují přepis viru. Primární virový transkript podléhá štěpení, a tím dává vzniknout různým virovým mRNA.

První virový transkript kóduje mRNA pro Tat, Rev a Nef protein. Tat protein (transaktivátor transkripce) výrazně zvyšuje množství virové RNA. Podporuje virovou transkripci díky zapojení buněčných faktorů (P-TEFb, TAR) a podporuje syntézu virové gRNA (Spector, Mele et al. 2019). Rev protein je post-transkripční regulační protein. Rev je schopen transportovat virovou RNA z jádra na cytozomální ribozom. Zde jsou pak v rané fázi syntetizovány tzv. doplňkové proteiny Vif, Vpr, Vpu a v pozdější fázi i strukturní proteiny (Gag a Pol) (Pai, Mudgal et al. 2021). Vif protein je lokalizován v cytoplazmě a protože fyzicky interaguje s virovou gRNA najdeme ho i ve virové partikuli. Vif je dále zodpovědný za zvýšení infekitivity, díky své schopnosti využít buněčný komplex CRL5 (ubiquitin ligázový komplex), který degraduje APOBEC3 (buněčný obranný mechanismus) (Salamango and Harris 2021). Vpr protein byl také nalezen ve virové partikuli (váže se na Gag protein) i v cytoplazmě hostitelské buňky. Vpr je zodpovědný za zastavení buněčného cyklu ve fázi G2, a tím podporuje replikaci viru (Fabryova and Strebel 2019). Vpu se nachází v cytozolu buňky, ale také na membráně buňky. Podporuje uvolnění virových partikul z buňky a dále je zodpovědný za degradaci CD4 receptorů (Khan and Geiger 2021). Nef protein je faktor virulence a ovlivňuje buňku několika způsoby. Nef je zodpovědný za snížení produkce CD4 a MHC-1 membránových proteinů. Díky tomu je pro imunitní systém buňka nerozpoznatelná. Dále je zodpovědný za zablokování proapoptických proteinů. Infikovaná buňka tedy neumírá, ale dále produkuje virové částice (Duette, Hiener et al. 2022).

Produkty pozdější fáze genové exprese jsou proteiny Gag, Pol a Env. Gag protein vzniká přepisem nesestřižené mRNA. Gag-Pol protein je produkován posunem čtecího rámce ribozomu na gag-pol RNA transkriptu. Posun je způsoben cis regulační oblastí, kterou tvoří sekvence sedmi nukleotidů (SS1) a krátká smyčka (SL1). Tato oblast z 2 % -10 % zapříčiní posun čtecího rámce o jeden nukleotid zpět bez přerušení syntetizovaného polyproteinu. Tímto způsobem slouží jedna virová mRNA jako templát pro syntézu dvou proteinů. Strukturní proteiny a virová gRNA migrují k vnitřní části membrány buňky. Env protein gp160 prochází Golgiho aparátem, kde je štěpen na proteiny gp120 a gp41. Oba proteiny jsou transportovány k vnitřní membráně buňky, kde gp41 ukotví gp120

k membráně infikované buňky. Gag a Gag-Pol polyproteiny se také váží k buněčné membráně a s nimi i virová gRNA. Následně dochází k pučení virové partikule a oddělení nezralé virové částice od buňky. Přibalená virová proteáza následně štěpí Gag protein a dává tím vznik MA, CA NC, a tím i dozrání virové partikule (Oxford, Collier et al. 2016).

HIV farmakoterapie

Na počátku 80. let 20. století byly publikovány studie popisující pneumocystickou pneumonii a agresivní formu dosud velmi vzácné rakoviny kůže (Kaposiho sarkom) v důsledku výrazného poklesu koncentrace CD4+ T-lymfocytů v krvi (Centers of Disease Control and Prevention, 1981). V roce 1983 bylo dvěma skupinami potvrzeno, že oslabení imunity je způsobeno virovou infekcí a byla izolována a identifikován HIV (Barré-Sinoussi, Chermann et al. 1983, Gallo, Sarin et al. 1983). Virus má zoonotický původ. S největší pravděpodobností je jeho původ ve viru opičí imunodeficiency (SIV) a jeho průnik do lidské populace je zřejmě způsoben konzumací nedokonale tepelně zpracovaného masa a orgánů nakažených primátů obyvateli rovníkové Afriky (Sharp and Hahn 2011). V roce 1987 byl na trh uveden první antiretrovirový preparát zidovudin (nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy, NRTI) a s ním došlo k zásadní změně v životě pacientů nakažených HIV. Od té doby byly k léčbě HIV infikovaných pacientů schváleny desítky látek, které rozdělujeme do několika základních skupin (níže). Tato léčiva jsou rozdělena podle fáze buněčného cyklu viru, ve které působí. Fakt, že kombinace látek z různých skupin zvyšuje účinnost terapie, dal v devadesátých letech vzniknout moderní antiretrovirové terapii známé jako cART (combination antiretroviral therapy). Zpravidla se jedná o kombinaci 3 látek, kdy dvě bývají zástupci nukleosidových / nukleotidových inhibitorů RT a třetí látka je z jiné skupiny. cART přinesla výrazné zkvalitnění a prodloužení života pacientů s HIV (Cihlar and Fordyce 2016).

Inhibitory vstupu viru do buňky (EI)

Tyto látky zabraňují navázání, fúzi a průchodu viru do buňky. Maraviroc je antagonistou pomocného chemokininového receptoru CCR5, který se nachází na povrchu hostitelské buňky. Enfuvirtide blokuje gp41 na povrchu viru.

Nukleotidové a nukleosidové inhibitory RT (NRTI, NtRTI)

NRTI a NtRTI byly první popsány a doposud patří k významným látkám používaných v terapii HIV. Po prvním schváleném léčivu (zidovudin), přibýly v devadesátých letech další (např. zalcitabine, abacavir, lamivudine...). V roce 2001 byl pro klinické použití schválen NtRTI tenofovir. Tato látka je objevem prof. Antonína Holého a stala se jednou z neúčinnějších a nepoužívanějších nejen v boji s HIV, ale též byla schválena pro léčbu chronické hepatitidy typu B, pro kterou byla původně zamýšlena. NRTI a NtRTI zastavují reverzní transkripci a tím je zabráněno přepisu RNA viru do DNA a následné inkorporaci

do genomu. NRTI a NtRTI jsou kompetitivní substrátové inhibitory a navzájem se často kombinují. V důsledku zkřížené rezistence však není doporučována kombinace více jak tří těchto látek.

Nenukleosidové inhibitory RT (NNRTI)

NNRTI se chovají jako nekompetitivní inhibitory RT. Inhibice RT probíhá navázáním na alosterické místo enzymu. V kombinaci s NRTI jsou velmi účinné v inhibici RT. Látky z této skupiny můžeme rozdělit na tzv. první generaci (např. nevirapine, efavirenz) a druhou generaci (např. etravirine a rilpivirine). Zejména druhá generace látek vykazuje velkou účinnost proti rezistentním variantám viru.

Inhibitory integráz (INSTI)

INSTI jsou léky inhibující enzym integrázu, který je zodpovědný za integraci virové DNA do DNA hostitelské buňky. Raltegravir byl jako první schválen v roce 2007. Tato látka nevykazuje zkříženou rezistenci s ostatními skupinami antivirotik a má poměrně vysokou účinnost u multirezistentních HIV-1 pacientů. Dalšími schválenými látkami z této skupiny jsou dolutegravir, elvitegravir a bictegravir (schváleny 2022).

Proteázové inhibitory (PI)

Saquinavir a ritonavir byly po inhibitorech RT první látky účinné v boji s HIV-1. PI blokuje virovou proteázu, a tím zabraňuje štěpení prekurzorových proteinů Gag a Gag-Pol. Díky tomu nedochází k dozrání virové partikule a ty jsou defektní a neinfekční. Do této skupiny léčiv patří např. lopinavir, nelfinavir, ritonavir. Darunavir a atazanavir jsou doporučovány jako tzv. léky první volby.

Další cesty léčby HIV-1

V dnešní době žije zhruba 38 milionů lidí s HIV-1 a i když díky cART došlo k obrovskému zkvalitnění a prodloužení života nakažených, užívání léků každý den, vznikající rezistence a i přes další vývoj látek působících proti HIV-1 stále poměrně velké množství vedlejších účinků léků, vedlo k vytvoření dalších strategií, jak s virem bojovat.

Protilátky se širokým spektrem

Imunoterapie HIV-1 je založená na tzv. široce neutralizujících protilátkách (broadly neutralizing antibodies, bnAb). Tento typ protilátek byl izolován u velmi malého množství pacientů s HIV-1, jejichž imunitní systém byl schopen s virem bojovat sám, bez léků. Jedná se o produkt specifických B buněk. Genetické inženýrství dalo vzniknout druhé generaci bnAb. V případě HIV-1 je v pre-klinických a klinických studiích cíleno především na různé části Env proteinu (CD4 vazebné místo, V3 klička, glykoproteiny...) (Caskey, Klein et al. 2019). Protilátky by měly být schopné zamezit množení viru,

likvidovat nakažené buňky a zároveň by měli být nápomocné při tvoření imunity proti viru. Použití bnAb se nepotýká s výskytem vedlejších účinků a nevzniká na ně rezistence (Gruell and Klein 2018). Nejnadějnější je momentálně probíhající klinická studie používající kombinaci dvou bnAb, 3BNC117 (cílicí na „spike“ protein) a 10-1074 (V3 kličku Env proteinu). Jedná se o jednu z prvních studií dokazujících potlačení viru bez ART (Sneller, Blazkova et al. 2022).

Vakcína

Již několik desítek let se vývoj účinné vakcíny proti HIV-1 potýká se zásadním problémem, a to je obrovská variabilita viru a jeho schopnost unikat imunitnímu systému (Haynes, Wiehe et al. 2022). I události posledních let a úspěšnému zavedení mRNA vakcíny proti SARS-CoV-2 posunula vývoj mRNA vakcíny proti HIV-1. V klinické studii je mRNA HIV-1 vakcína, která by měla vést k tvorbě bnAb (viz. výše). První dávka by měla stimulovat vzácné B-lymfocyty ke specifickému vývoji. Další dávky vhodně zvolených imunogenů by měly vést ke zrání B-lymfocytů do stádia plazmatických buněk produkujících bnAb (Leggat, Cohen et al. 2022).

Genová terapie

Genová terapie je odvětví medicíny, které se věnuje genetické modifikaci buněk. Modifikované buňky jsou využity pro léčbu nebo nahrazují defektní genetický materiál. V případě HIV-1 se jedná o transplantaci hematopoetických kmenových buněk s mutací CCR5 koreceptoru (CCR5 Δ 32). Díky této mutaci nejsou buňky schopny exprimovat tento protein, který je stěžejní pro vstup HIV-1 do hostitelské buňky. Nejznámější jsou případy tzv. Berlínského (BP) a Londýnského pacienta (LP). V obou případech se jednalo o nakažené HIV-1, u kterých byla dále diagnostikována i rakovina krve. V případě BP se jednalo o akutní myeloidní leukemii a v případě LP o Hodgkinsův lymfom. V obou případech se podařilo nalézt vhodného dárce se zmíněnou mutací a úspěšně provést transplantaci kmenových buněk (HSCT, Hematopoetic Stem Cell Transplantation). U obou zmíněných byla léčba úspěšná a po několika měsících byla léčba ART přerušena. S odstupem několika let, 9 let u BP a cca 2 roky u LP, byli pacienti testováni různými technikami na přítomnost HIV-1. Oba pacienti vykazovali remisi viru (Peterson and Kiem 2019, Gupta, Peppas et al. 2020). V souvislosti s dosaženými výsledky se často hovoří o nalezení léku na HIV-1. Obrovské riziko při transplantaci, specifická, vysoká cena a náročnost provedení vzhledem k množství nakažených jsou aspekty, které prozatím znemožňují plošné použití. I tak probíhají studie zabývající se zjednodušením celého procesu a využitím genové terapie v léčbě HIV-1 (Peterson, Wang et al. 2018, Jensen, Knops et al. 2023).

1.6.2.2 Pikornaviry

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

Picornavirales je početný řád malých neobalených virů napadajících obratlovce, hmyz a rostliny. Genom tvoří jednovláknová RNA s pozitivní polaritou (+ssRNA). U většiny členů genom kóduje autoproteolytické enzymy, RNA-dependentní RNA polymerázu (RDRP)

a strukturní proteiny. Strukturní proteiny tvoří ikosahedrální kapsidu (dvacetistěn) o velikosti zhruba 30 nm v průměru. Délka genové RNA bývá mezi 7000 až 12 500 nukleotidy.

Až na výjimky je na 5' konci gRNA navázán VPg protein (3-5 kDa) a 3' konec je polyadenylovaný. Virová RNA je infekční, slouží jako mRNA a zároveň jako templát pro replikaci.

Lidské pikornaviry

Jako zástupci lidských pikornavirů byly v této práci studováni 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 byly infekce provázené 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). Interakce 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).

Lidský echovirus 18 (E18)

E18 patří do skupiny enterovirů B. Virus obsahuje pouze genomovou RNA (cca 7410 nt), která zároveň slouží jako mRNA. Jedná se o lidský virus, který může způsobovat zažívací potíže, exantémy (vyrážky), akutní tonzilitidy a herpangíny (virové onemocnění dutiny ústní) u dětí. Jeho výskyt byl potvrzen i u pacientů s onemocněním ruka-noha-ústa (Zhang, Zhao et al. 2017, Chen, Ji et al. 2019). Pokud virus pronikne do nervové soustavy, pacienti vykazují příznaky aseptické meningitidy (Graf, Hartmann et al. 2019, Sun, Miao et al. 2019) nebo virové encefalitidy (Chen, Li et al. 2017). Při virové encefalitidě je E18 třetím nejčastěji identifikovaným enterovirem (Suresh, Rawlinson et al. 2020). V ojedinělých případech byla přítomnost E18 zjištěna i u pacientů s akutní chabou parézou (Suresh, Forgie et al. 2018).

Virová RNA je uvolněna z kapsidy po průniku viru do buňky. Nedávné studie používající cryo-elektronovou mikroskopii prokázaly, že pokud je kapsida vystavena kyselému prostředí, dochází k odlomení 1 až 3 sousedních pentamerových jednotek kapsidy a uvolnění gRNA. Takto vzniklý otvor je dostatečně velký na to, aby byla gRNA uvolněna bez strukturních změn, tedy i se svojí dsRNA částí (IRES) (Buchta, Füzik et al. 2019), která slouží k navázání ribozomu a spuštění translace.

Lidský rhinovirus typ 2 (RV2)

Lidský RV2 patří do skupiny enterovirů. Virus obsahuje pouze genomovou RNA (cca 7120 nt), která zároveň slouží jako mRNA. Rhinoviry, včetně RV2, jsou zodpovědné za více než 50 % onemocnění běžnou rýmou, a tím značně zatěžují ekonomickou a sociální sféru společnosti (Jacobs, Lamson et al. 2013). Přenos probíhá kontaktem s nakaženou osobou, s kontaminovanými předměty nebo kapénkami. Mále děti za rok onemocní rhinoviry 4krát více než dospělí a i když je průběh onemocnění většinou mírný, jsou rhinoviry druhými nejčastějšími původci virových bronchiolitid, které mohou vést k dalším, závažnějším onemocněním. Vliv virových infekcí horních a dolních dýchacích cest byl prokázán i na následný vývoj astmatu a opakující se sípaní v dětství (Jartti and

Gern 2017, Vandini, Biagi et al. 2019). U astmatických dětí virové infekce způsobují zhoršení stavu pacienta (Toivonen, Schuez-Havupalo et al. 2016). Rhinovirová infekce pro pacienty s chronickou obstruktivní plicní chorobou, cystickou fibrózou, ale i astmatem, může být až životu nebezpečná (Georgieva, Stoyanova et al. 2021). I proto probíhají v posledních dekádách pokusy o vytvoření vakcíny. Z důvodu velkého množství sérotypů (přes 160) tyto pokusy zatím nejsou úspěšné (Stobart, Nosek et al. 2017).

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 viry jsou z čeledi *Iflaviridae* a napadají včelu medonosnou (*Apis mellifera*). Včela medonosná se vyskytuje po celém světě a hraje významnou roli v zemědělství, kde mnoho zemědělských plodin závisí na opylování prováděném především včelou. Včela je 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, McMenamin et al. 2016, Gisder and Genersch 2017). K rychlejšímu a efektivnějšímu přenosu včelích virů napomáhá i vnější parazit včely, kleštík 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 u SBV a DWV prokázána. V 5' UTR se nachází IRES. 3' konec je polyadenylovaný. 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.

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

V této práci byl použit český druh SBV. Vir patří do čeledi *Iflaviridae* a napadá včelí larvy. Nákaza je pro larvy smrtelná, proto dochází během infekce ke zhoršení stavu celé kolonie. Virus obsahuje pouze genomovou RNA (8832 nt), která zároveň slouží jako mRNA. Kapsida SBV má kulovitý tvar s plošinami kolem ikosahedrální pětičetné osy symetrie. Struktura SBV virové partikule byla studována pomocí rentgenové krystalografie. Tyto studie prokázaly přítomnost malých kapsidových proteinů (minor capsid protein, MiCP) na povrchu virové partikule. MiCP nebyly charakterizovány u žádných jiných pikornavirů. Tento protein je nejspíše zodpovědný za interakci s membránou buňky, a tím i za uvolnění gRNA viru do buněčné cytoplazmy (Procházková, Füzik et al. 2018). Pro lepší pochopení

mechanismu rozpadu virové kapsidy a uvolnění gRNA bylo využito i kryo-elektronové mikroskopie (cryo-EM). *In vitro* bylo pozorováno, že v kyselém prostředí dochází v případě SBV k otevření (prasknutí) virové partikule a uvolnění gRNA viru v poměrně kompaktní formě. Celkový proces je tak rychlejší, což pravděpodobně snižuje riziko degradace této RNA RNázami (Škubník, Sukeník et al. 2021).

Virus deformovaných křídel (Deformed wing virus, DWV)

Jako další zástupce čeledi *Iflaviridae* byl zvolen včelí virus deformovaných křídel (DWV). Infekce DWV může vést ke smrti kukly, na dospělých včelách se infekce projevuje deformací křídel, zmenšením zadečku, popř. i končetin. Včely jsou slabé a rychle umírají, což vede ke kolapsu celé kolonie. Jeho výskyt byl potvrzen v 32 zemích, a tím se stává nejrozšířenějším včelím virem (Martin and Brettell 2019). Virová kapsida obsahuje genomovou RNA (cca 10 100 nt), která zároveň slouží jako mRNA. Překladem mRNA vzniká i zde polyprotein, který je dále štěpen na funkční podjednotky. Kapsida DWV je tvořena strukturními proteiny VP1, VP2 a VP3. Pomocí cryo-EM a rentgenové krystalografie byla objevena globulární vychlípenina (P doména) strukturního proteinu VP3. Díky tomu, že P doména vystupuje do prostoru, je kapsida DWV o něco větší než u ostatních zástupců pikornavirů. Tato strukturní doména obsahuje katalytickou triádu Asp-His-Ser, která je zřejmě zodpovědná za navázání na receptor nebo poskytuje proteázovou, lipázovou nebo esterázovou aktivitu, která je potřebná pro vstup viru do hostitelské buňky. V případě DWV byla dále objevena unikátní interakce gRNA s vnitřním povrchem ikosahedrálního virové partikule. Tato vazba RNA-kapsida má zřejmě vliv na stabilitu partikule a může hrát roli při tvorbě virové partikule (Škubník, Nováček et al. 2017). Další *in vitro* studie popisují, že oproti SBV nebo viru pomalé včelí paralýzy (slow bee paralysis virus, SBPV) nedochází u DWV k prasknutí virové partikule. Otevření virové partikule se přirovnává k otevření květu. Proces je ale podobně rychlý jako u SBV a SBPV (Škubník, Sukeník et al. 2021).

1.6.3 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 (m¹A, 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 m⁶A a jeho vliv na životní cyklus viru.

1.6.3.1 Inosin (I)

Inosin byl popsán u různých typů virů. Patří sem lidský herpesvirus 8 (dsDNA virus), lidský orthopneumovirus (-ssRNA virus, též zvaný jako respirační syncytiální virus, RSV)

a virus hepatitidy D (HDV) (Jayan and Casey 2002, Gandy, Linnstaedt et al. 2007, Liao, Thakur et al. 2011). Modifikace samotná nebo deaminázy za ni zodpovědné mají vliv na životní cyklus viru a to ať už přímou interakcí s modifikací nebo v rámci odpovědi imunitního systému proti viru (Nie, Hammond et al. 2007).

1.6.3.2 5-methylcytidin (m^5C)

Přítomnost m^5C 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^5C 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).

1.6.3.3 2'-O-methyl modifikace (Nm)

Ve virech byla 2'-O-methyl modifikace popsána jako součást čepičky i jako modifikace uvnitř řetězce RNA. Některé viry (flaviviry, pikornaviry, coronavirus...) potřebují mít očepičkovanou RNA k tomu, aby mohly zahájit svoji translaci. K tomuto využívají buď systém hostitelské buňky nebo mají kódovaný svůj vlastní aparát. Některé viry jsou schopné i odcizit čepičku z hostitelské mRNA a tu pak použít (vir chřipky) (Koonin and Moss 2010, Decroly, Ferron et al. 2012). V případě, že v čepičce 2'-O-methylace chybí, může na sebe vir buňku upozornit a spustit systémovou imunitní reakci.

Další studie se věnovaly přítomnosti 2'-O-methyl modifikace uvnitř řetězce RNA. V případě, že bylo zabráněno v methylaci ribózy u virové RNA, vykazovala infekce virem velkou imunitní reakci (Ringear, Marchand et al. 2019). Z toho vyplývá, že Nm jsou důležitou součástí funkční virové RNA, jsou potřebné pro úspěšný průběh životního cyklu viru a také slouží viru jako mimikry. Další pole výzkumu využívá nezbytnosti Nm ve virové RNA pro tvorbu tzv. vakcín využívajících oslabený vir (attenuated vaccine) (Li, Dong et al. 2013, Menachery, Yount et al. 2014, Zhang, Wei et al. 2014). V tomto případě je inhibována methylace virové RNA. Vir je funkční, ale velmi oslaben. Je schopný aktivovat imunitní systém, který vytvoří protilátky, ale bez rizika infekce.

1.6.3.4 N^6 -methyladenosin (m^6A)

Několik studií prezentovalo různý vliv m^6A na životní cyklus HIV. Protein obsahující YTH doménu je schopný se přímo vázat na m^6A v 3' UTR virové mRNA. Nadprodukce proteinu vede ke zvýšení virové exprese. Naopak vyřazení vázajícího proteinu pak virovou expresi velmi snižuje (Kennedy, Bogerd et al. 2016). Jiná studie ukazuje, že nadprodukce proteinu YTHDF redukuje množství virové gRNA a inhibuje RT (Lu, Tirumuru et al. 2018). Další práce prezentuje, že m^6A potlačuje tvorbu virových proteinů, a tím i uvolnění

viru z buňky (Tirumuru, Zhao et al. 2016). Různorodost výsledků může být způsobena použitím jiného typu buněk, buněčné fáze nebo zapojení jiných technik pro detekci m⁶A. Nemalý vliv na množství m⁶A v buňce může mít i probíhající infekce (Lichinchi, Gao et al. 2016).

U flavivirů jsou výsledky jednoznačnější. Bylo popsáno, že m⁶A má inhibiční efekt na virus hepatitidy C (HCV) a zika virus (ZIKV). Vyšší množství m⁶A ve virové RNA brání replikaci viru a naopak nižší množství m⁶A zvyšuje produkci viru (Bradrick 2017). Nadprodukce YTHDF vede k navázání na m⁶A ve virové RNA a tím brání přepisu a produkci viru (Gokhale, McIntyre et al. 2016). Obdobná situace byla popsána i u ZIKV (Lichinchi, Zhao et al. 2016).

1.6.3.5 Další modifikace

Ve virové RNA byl potvrzen výskyt i dalších modifikací. K takovému screeningu se nejčastěji používá kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí. Tato technika byla použita pro testování ZIKV, viru horečky dengue (DENV), HCV, HIV-1 a polioviru a odhalila 32, 39, 42, 36 a 41 různých chemických modifikací RNA (McIntyre, Netzband et al. 2018). Množství a typ modifikací u HIV-1 je ale v rozporu s pozorováním v této práci a bude diskutováno níže.

2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

V nedávné době byly u mRNA popsány různé modifikace. Informace o množství a typu modifikací se ale 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^6 -methyladenosin.

V posledních letech byla několika skupinami prezentována přítomnost 1-methyladenosinu v mRNA. V závislosti na technice provedení experimentu se množství m^1A pohybovalo od tisíců po jednotky pozic v mRNA. Přesná funkce m^1A v mRNA však nebyla dokonale popsána a výskyt m^1A 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^1A (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 sekvenčních technik pro získání informace o pozici testovaných modifikací.
- VIII. Zhodnocení významu testovaných methylací na RNA kompozici virové partikule vybraných pikornavirů.

3. MATERIÁL

3.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

Pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
Chlazená centrifuga Eppendorf 5810R (Eppendorf, Německo)
Eppendorf ThermoMixer[®] C (Eppendorf, Německo)
NanoDrop ONE (Thermo Scientific, USA)
Qubit 4 Fluorometr (ThermoFisher, USA)
Mastercycler Eppendorf nexus GSX1 (Eppendorf, Německo)
RT-PCR LightCycler (Roche, Švýcarsko)
4200 TapeStation Systém (Agilent, USA)
Vortex IKA[®] MS 3 (IKA-Werke, Německo)
LC system, I-Class (Waters, USA)
Hmotnostní spektrometr Synapt G2 (Waters, USA)
C18 column, Acquity UPLC[®] BEH C18 1.7 μm (Waters, USA)
Elektronický UV crosslinker (Ultralum, USA)
ProBlot hybridizační pírka (Labnet, USA)
Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, USA)
Vortex (Heidolph, Německo)
Jenway pH metr 3510 (Cole-Parmer Jenway[®], Velká Británie)
Zdroj EPS – 600 (C.B.S. Scientific, USA)
Centrifuga MiniSpin[®] (Eppendorf, Německo)
Centrifuga Mini Star (VWR, USA)
Speedvac Concentrator Savant SPD121P (ThermoScientific, USA)
Deska pro vývoj radioaktivně značených vzorků (phosphor imaging plate, GE healthcare, USA)
Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, USA)
CCD kamera (Las-3000, software Image Reader Las-3000, Fujifilm, Japonsko)
Dounce homogenizátor (piston-wall distance 0.075 mm) (Bellco Glass Inc, USA)
Ti50.2 rotor s fixovaným úhlem (Beckman Coulter, USA)
SW41 rotor s výkyvnými kapsami (Beckman Coulter, USA)
Allegra 25R centrifuga (Beckman Coulter, USA)
Optima X80 ultracentrifuga (Beckman Coulter, USA)
Firereader V10 (Uvitec Cambridge, VB)

3.2 Spotřební materiál

Laboratorní plastik bez RNáz a DNáz
Centrifugační filtry Microcon[®] -10 kDa (Merck Millipore, USA)

nylonová membrána (Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare, USA)
polyvinylidene difluoride (PVDF) membrána (BioRad, USA)
RNA High Sensitivity Assay strip (Agilent, USA)
Micro Bio-Spin P-30 kolonky (BioRad, USA)
0.45 µm pore size cellulose-acetate filtr (VWR, USA)
Vialky, Waters, USA
NAP™ -5 kolonky (Merck, USA)

3.3 Chemikálie, roztoky a kity

RNAzol reagent (Sigma-Aldrich, USA)
Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus (Zymo Reaserch, USA)
RNA Clean & Concentrator columns (Zymo Reaserch, USA)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey –Nagel, Německo)
Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (NEB, USA)
EZ RNA Methylation™ Kit (Zymo Research, USA)
Agaróza (Sigma-Aldrich, USA)
SYBR™ Gold (Thermo Fisher Scientific, USA)
Rotiphorese sequencing gel solution (Carl Roth, Německo)
Acrylamide/Bis Solution (30% / 40%) (Bio-Rad Laboratories)
Močovina (Sigma, USA)
40% (w/v) 19:1 akrylamid:bis-akrylamid (BioRad, USA)
10% (w/v) amonium persulfát (APS) (Sigma-Aldrich, USA)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED) (Sigma, USA)
Formaldehyd (40%) (Sigma, USA)
Formamid (de-ionizovaný) (Sigma-Aldrich, USA)
Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, USA)
Xylen cyanol FF (Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), (Sigma-Aldrich, USA)
Octan sodný (NaOAc) (Sigma-Aldrich, USA)
4-(3-sulfonatopropyl)morpholin-4-ium , MOPS (Sigma-Aldrich, USA)
NaCl (Sigma-Aldrich, USA)
MgCl₂ (Sigma-Aldrich, USA)
CaCl₂ (Sigma-Aldrich, USA)
CsCl (Sigma-Aldrich, USA)
Na₂CO₂ (Sigma-Aldrich, USA)
NaOH (Sigma-Aldrich, USA)
HCl (Sigma-Aldrich, USA)
KCl (Sigma-Aldrich, USA)

2-merkapt ethanol (Sigma-Aldrich, USA)
Trizma báze (Sigma-Aldrich, USA)
L-glutamin (Sigma-Aldrich, USA)
Penicilin (Sigma-Aldrich, USA)
Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
Citronan sodný (Sigma-Aldrich, USA)
Hovězí sérový albumin, BSA (Sigma-Aldrich, USA)
Dihydrogen fosforečnan sodný (NaH_2PO_4) (Sigma-Aldrich, USA)
Hydrogen fosforečnan sodný (Na_2HPO_4) (Sigma-Aldrich, USA)
Acetonitril Optima™ LC/MS Grade (Fisher Chemical™, USA)
Ethanol absolutní (Merk, USA)
Isopropanol p.a. (Penta, CZ)
Kyselina mravenčí (Penta, CZ)
Kyselina boritá (Sigma-Aldrich, USA)
Dubecco modifikované Eagle médium (Sigma-Aldrich, USA)
Fetální hovězí serum, FBS (Sigma-Aldrich, USA)
Kasein (Blocked casein, ThermoFisher Scientific, USA)
 $\gamma^{32}\text{P}$ ATP (Hartman analytic, Německo)
dNTP a rNTP (NEB, USA)
modifikované rNTP (Jena BioScience, Německo)
Super signal West Femto Maximum sensitivity substrát (Thermo Scientific, USA)

3.4 Pufry

Fosfátový pufr (PBS pufr), pH 7,4 (137 mM NaCl, 4 mM Na_2HPO_4 , 2,68 mM KCl, 1,76 mM KH_2PO_4)
TBE pufr, pH 8,3 (90 mM Trizma báze, 90 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA)
10 x MOPS pufr, pH 7 (200 mM MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA)
20 x SSC pufr, pH 7 (3 M NaCl, 0,3 M citronan sodný)
Church pufr, pH 7,2 (7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA, 70 mM NaH_2PO_4 , 180 mM Na_2HPO_4)
Fragmentační pufr, pH 7,4 (100 mM ZnCl_2 v 100 mM Tris HCl pufru, pH 7,4)
Alkalický pufr pH 10,4 (50 mM Na_2CO_3 , 2 mM EDTA)
5 x Defosforylační pufr pH 7,4 (500 mM Tris HCl, pH 7,4; 100 mM MgCl_2 ; 500 mM 2-merkapt ethanol)
TGIRT™-III reakční pufr, pH 7,5 (450 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 20 mM Tris-HCl, pH 7,5)

3.5 Buněčné linie

Lidské embryonální ledvinové HEK293T buňky (ATCC, LGC Standards, Velká Británie)

Lidské CD4+ T-buňky MT4 (NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH from Dr. Douglas Richman)

TZM-bl buňky (NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH from Dr. Douglas Richman)

GMK, 84113001 (Sigma-Aldrich, USA)

HeLa (ATCC-CCL2)

Larvy včel

3.6 Viry a plazmidy

cell-free HIV-1 linie NL4-3

pNL4-3 plazmid (obdrženo přes NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH od Dr. Malcolm Martin)

Virus pytlíčkového plodu (SBV)

Virus deformovaných křídel (DWV)

Echovirus 18 (linie METCALF, obdrženo přes ATCC-VR-852TM)

Rhinovirus 2 (linie HGP, ATCC-482)

3.7 Protilátky

Polykonální anti HIV-1 CA protilátka (sérum králíku imunizovaných CA proteinem HIV-1, připraveno na FGU AV ČR; ředění 1:1000, 1 h, laboratorní teplota).

Sekundární protilátka, Anti-Rabbit IgG konjugována s křenovou peroxidázou, produkována v kozách (Merck kat. č. A0545, 1:10000, 1 hour, laboratorní teplota).

3.8 Enzymy

Trypsin

DNáza I (10 U/ml, New England BioLabs, USA)

RNáza I (200 U/ml, Thermo Fisher Scientific, USA)

RNáza A (20 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, USA)

Nukleáza P1 (Sigma-Aldrich, USA)

Alkalická fosfatáza (Calf Bovine Alkaline phosphatase) (New England BioLabs, USA)

FastAP alkalická fosfatáza (ThermoFisher Scientific, USA)

T4 RNA ligáza (ThermoFisher Scientific, USA)

T4 RNA ligáza 2 truncated (New England Biolabs, USA)

5'-Deadenyláza (New England Biolab, USA)
 Lambda exonukleáza (ThermoFisher Scientific, USA)
 SuperScript III (ThermoFisher Scientific, USA)
 Exonucleáza I (ThermoFisher Scientific, USA)
 TGIRT™-III (InGex, USA)
 Deoxynukleotidyl transferáza (ThermoFisher Scientific, USA)
 Taq DNA Polymeráza (NEB, USA)
 Q5 High-Fidelity DNA Polymeráza (NEB, USA)
 T4 Polynukleotid kináza (ThermoFisher Scientific, USA)

3.9 Oligonukleotidy

Oligonukleotidy byly připraveny firmou Generi Biotech, ČR.

5'-fosforylový oligomer	5' p-CNNNNNAGATCGGAAGAGCACACGTCTG- (C3)
RT primer	5' CAGACGTGTGCTCTTCCGAT
cDNA kotva sense	5' p-CAGATCGGAAGAGCGTCGTGT- (C3)
cDNA kotva antisense	5' ACACGACGCTCTTCCGATCTGGG

NGS primery pro projekt HIV-1

FWDPrimer MID1s	<u>ACGAGTGCGTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
FWDPrimer MID5s	<u>ATCAGACACGACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
FWDPrimer MID11s	<u>TGATACGTCTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
FWDPrimer MID12s	<u>TACTGAGCTAACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
FWDPrimer MID27s	<u>ACGCGAGTATACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
FWDPrimer MID29s	<u>ACTGTACAGTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
FWDPrimer MID34s	<u>CACGCTACGTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
FWDPrimer MID35s	<u>CAGTAGACGTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
FWDPrimer MID36s	<u>CGACGTGACTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
FWDPrimer MID37s	<u>TACACACACTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
FWDPrimer MID39s	<u>TACAGATCGTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
FWDPrimer MID40s	<u>TACGCTGTCTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
REVPrimer MID3s	<u>AGACGCACTCCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
REVPrimer MID7s	<u>CGTGTCTCTACAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
REVPrimer MID14s	<u>CGAGAGATACCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
REVPrimer MID18s	<u>TCTACGTAGCCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
REVPrimer MID32s	<u>AGTACGCTATCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
REVPrimer MID33s	<u>ATAGAGTACTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
REVPrimer MID50s	<u>ACTAGCAGTACAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
REVPrimer MID55s	<u>CGATCGTATACAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
REVPrimer MID61s	<u>CTATAGCGTACAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>

REVPrimer MID84s	<u>AGTGACACACCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
REVPrimer MID91s	<u>CATACTCTACCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
REVPrimer MID93s	<u>CGAGACGCGCCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>

NGS primery pro mapování methylací v pikornavirech

m¹A mapování		
SBV_m ⁶ A_SS III.	FWDPrimer	<u>CACGCTACGTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
	REVPrimer	<u>ACTAGCAGTACAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
SBV_m ¹ A_SS III.	FWDPrimer	<u>CAGTAGACGTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
	REVPrimer	<u>CGATCGTATACAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
SBV_m ⁶ A_TGIRT	FWDPrimer	<u>ACGCGAGTATACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
	REVPrimer	<u>AGTACGCTATCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
SBV_m ¹ A_TGIRT	FWDPrimer	<u>ACTGTACAGTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
	REVPrimer	<u>ATAGAGTACTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>

Bisulfitové sekvenování		
SBV+	FWDPrimer	<u>ACGAGTGCGTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
	REVPrimer	<u>AGACGCACTCCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
SBV-	FWDPrimer	<u>TGATACGTCTACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
	REVPrimer	<u>CGAGAGATACCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
DWV +	FWDPrimer	<u>ATCAGACACGACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
	REVPrimer	<u>CGTGTCTCTACAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>
DWV-	FWDPrimer	<u>TACTGAGCTAACACGACGCTCTTCCGATCT</u>
	REVPrimer	<u>TCTACGTAGCCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</u>

Próby a templáty pro Northern blot analýzu HIV-1

Lys TTT 3' konec	5' TGGCGCCCGAACAGGGAC
Lys CTT 5' konec	5' ACCGACTGAGCTATCCGGGC
Lys CTT 3' konec	5' TGGCGCCCAACGTGGGGC
Lys CTT měřítko 18 nt sense	<u>TAATACGACTCACTATT</u> A GGGTCCCTGTTCGGGCGCCA
Lys CTT měřítko 18 nt antisense	TGGCGCCCGAACAGGGACCC T <u>AATAGTGAGTCGTATTA</u>
Lys CTT měřítko 39 nt antisense	<u>TAATACGACTCACTATT</u> A GGGATCTGAGGGTCCAGGGTTCA AGTCCCTGTTCGGGCGCCA
Lys CTT měřítko 39 nt antisense	TGGCGCCCGAACAGGGACTTGAACCCTGGACCCTCAGATCC <u>CTAATAGTGAGTCGTATTA</u>

Lys CTT měřítko 76 nt sense	<u>TAATACGACTCACTATTAGGGCCCGGATAGCTCAGTCGGTA</u> GAGCATCAGACTTTTAAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAAGTCC CTGTTCCGGGCGCCA
Lys CTT měřítko 76 nt antisense	TGGCGCCCGAACAGGGACTTGAACCCTGGACCCTCAGATTA AAAGTCTGATGCTCTACCGACTGAGCTATCCGGGCCCTAAAT <u>AGTGAGTCGTATTA</u>

Próby a templáty pro Northern blot analýzu pikornavirů

LysTTT 3' konec	TCGCCCCAACAGGGACTCG
LysTTT 5' konec	GACTGAGCTATCCGGGCG
LysTTT central	CCCTCAGATTAAAAGTCTGATGC
LysCTT 3' konec	TCGCCCAACGTGGGGCTC
LysCTT 5' konec	GACTGAGCTAGCCGGGCA
AspGTC 3' konec	TCTCCCCGACGGGGAATCG
AspGTC 5' konec	CACTATACTATCGAGGAA
GlyGCC-1 3' konec	TGCATCGGCCGGGAATCGA
GlyGCC-1 5' konec	CCACTGAACCACCGATGC
GluGTC 3' konec	TTCCGGTACCGGGAATCGAACC
GluGTC 5' konec	CCACTAGACCATAACCGGA
LysTTT měřítko 21 nt sense	CAGTAATACGACTCACTATAGGCGAGTCCCTGTTCGGGCGA
LysTTT měřítko 21 nt antisense	TCGCCCGAACAGGGACTCGCCTATAGTGAGTCGTATTACTG
LysTTT měřítko 38 nt sense	CAGTAATACGACTCACTATAGGTCTGAGGGTCCAGGGTTCG AGTCCCTGTTCGGGCGA
LysTTT měřítko 38 nt antisense	TCGCCCGAACAGGGACTCGAACCCCTGGACCCTCAGACCTAT AGTGAGTCGTATTACTG
LysTTT měřítko 75 nt sense	CAGTAATACGACTCACTATAGGCCCGGATAGCTCAGTCGGT AGAGCATCAGACTTTTAAATCTGAGGGTCCAGGGTTCGAGTC CCTGTTCGGGCGA
LysTTT měřítko 75 nt antisense	TCGCCCGAACAGGGACTCGAACCCCTGGACCCTCAGATTAAA AGTCTGATGCTCTACCGACTGAGCTATCCGGGCCCTATAGTG AGTCGTATTACTG

4. METODIKA

4.1 Všeobecné techniky

SDS PAGE

12% gel byl připraven smícháním roztoků Rotiphorese sequencing gel solution, 2x TBE, TEMED a 10% ASP. Následně byl gel ekvilibrován 10 min při 600 V a po nanesení vzorků probíhala separace 2 hodiny při 600 V. Separace probíhala v prostředí 1x TBE a gel byl po celou dobu chlazen.

20% denaturační polyakrylamidový gel použitý pro northern blot analýzy byl připraven smícháním 4,2 g močoviny, 0,5 mL 10x MOPS pufru, 5 mL 40% (w/v) 19:1 akrylamid:bisakrylamidu, 1,25 mL destilované vody, takto připravený roztok byl smíchán a zahříván, dokud se močovina nerozpustila. Následně bylo přidáno 70 μ L 10% APS a 2,5 μ L TEMED. Separace probíhala v 1x MOPS, ekvilibrace gelu 30 min 100 V, separace 3-4 h při 150 V.

Agarózový gel

Agarózové gely byly připravovány v hustotě 1% - 2%. Agaróza byla rozpuštěna v 1 x TBE pufru a po zchladnutí bylo přidáno vizualizační činidlo SYBR™ Gold (0,8 μ L / 100 mL gelu). Separace probíhala v 1 x TBE pufru, 2 hodiny při 140 V.

PCR

Pro získání maximálních výtěžků byly pro metodu PCR testovány dvě polymerázy (Taq DNA Polymeráza a Q5 High-Fidelity DNA Polymeráza) a různé teplotní a časové profily. Finální PCR reakce byly prováděny Taq DNA Polymerázou za podmínek uvedených níže (Tab 1.).

Tab 1: Podmínky PCR reakce.

Teplota	Čas
95°C	30 s
95°C	30 s
54°C	60 s
68°C	60 s
68°C	5 min

38 cyklů

Real Time – PCR

Pro Real Time – PCR byl použit kit Luna Universal One-Step RT-qPCR. Reakce probíhala na stoju RT-PCR LightCycler za popsaných podmínek (Obr. D11).

4.2 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.

4.2.1 Tkáňové kultury

T-buněčná linie MT4 lidských CD4⁺ a lidské embryonální ledvinové buňky, buněčná linie Hek293T byly kultivovány podle standardních protokolů při 37 °C, vlhkosti >90 % a pod atmosférou 5 % CO₂ / 95 % vzduch. Buněčná linie MT4 byla kultivována v RPMI 1640 w/o L-glutamin s přidavkem 10 % fetálního hovězího séra (FBS), penicilinu (100 U/mL) a streptomycinu (100 µL/mL). Buněčná linie Hek293T byla kultivována v DMEM mediu s vysokým obsahem glukózy s přidavkem 10 % FBS, penicilinu (100 U/mL) a streptomycinu (100 µL/mL).

4.2.2 Izolace malých a velkých RNA frakcí z buněčných kultur

MT4 buňky byly sesbírány a stočeny (225 x g, 5 min, 20 °C), Hek293T buňky byly trypsinovány, sesbírány a následně stáčeny (225 x g, 5 min, 20 °C). Buněčné pelety byly promyty PBS a lyzovány RNAzolovým činidlem. Frakce velkých a malých RNA byla získána podle protokolu výrobce a množství a čistota získané RNA byla kontrolována na HS RNA ScreenTape (4200 TapeStation, Agilent). Množství RNA bylo stanoveno pomocí RNA High Sensitivity Assay (Qubit 4 Fluorometer).

4.2.3 Infekce

Hek293T buňky byly transfekované plazmidem pNL4-3. Získaný virus HIV-1 linie NL4-3 byl použit pro infekci MT4 buněk. Infikovaná buněčná kultura byla následně zvětšena ko-infekcí. 48 h po infikování byl supernatant obsahující virové partikule a infikované buňky přidány k neinfikovaným MT4 buňkám ($5 \cdot 10^5$ buněk/mL) v poměru 1:9. Ko-kultivace byla synchronizována třemi po sobě jdoucími přidavky infikované kultury k neinfikovaným MT4 buňkám ($5 \cdot 10^5$ buněk/mL, 27 h odstup mezi přidavky). Po 40 hodinách od posledního synchronizačního kroku byl supernatant obsahující virové partikule sebrán, stočen (225 x g, 5 min, 20 °C), filtrován přes 0,45 µm celulózo-acetátový filtr a zamražen (-80 °C).

Kvalita infekce byla ověřena analýzou TZM, kdy byl titr HIV-1 měřen 10-ti násobnou sériovou infekcí buněk TZM-bl v triplicátech. Titr viru byl vypočten metodou Reed Muench a vyjádřen jako 50% infekční dávka tkáňové kultury.

4.2.4 Izolace na sacharózovém polštáři

Virové partikule byly zakoncentrovány z čistého kultivačního média stočením skrz 20 % (v/v) sacharózu v PBS pufru (90 000 x g, rotor JS 24.38, 90 min, 4 °C). Peleta byla resuspendována v reakčním pufru pro RNázu/DNázu (Tris HCl 100 mM, MgCl₂ 25 mM, CaCl₂ 25 mM). Pro zbavení se zbytků DNA a RNA z buněk byla použita DNáza I (10 U/ml), RNáza I (200 U/ml) a RNáza A (20 mg/ml). Reakce probíhala 2 h při 37 °C a byla zastavena přidáním RNazolu.

Kontrolní vzorek bez infekce byl připraven stejným způsobem z neinfikovaných MT4 buněk.

4.2.5 Čištění na gradientu OptiPrep.

Předčištěné pelety virových partikulí (viz výše) byly rozsuspendovány v PBS pufru, nanесeny na povrch připraveného iodixanového gradientu (6 % - 35 % OptiPrep Density Gradient medium ředěno PBS puftrem) a stočeny (90 000 x g, rotor MLS50, 90 min, 4 °C). Kvalita frakcí obsahujících HIV-1 byla ověřena analýzou Western blot (Obr. 14A, str.67). Frakce obsahující HIV-1 virové partikule byly spojeny, pět krát zředěny PBS a stočeny pro získání pelety (90 000 x g, rotor MLS50, 90 min, 4 °C). Získané pelety byly resuspendovány v reakčním pufru pro RNázu/DNázu (Tris HCl 100 mM, MgCl₂ 25 mM, CaCl₂ 25 mM). Pro zbavení se zbytků DNA a RNA z buněk byla použita DNáza I (10 U/ml), RNáza I (200 U/ml) a RNáza A (20 mg/ml). Reakce probíhala 2 h při 37 °C a byla zastavena přidáním RNazolu.

4.2.6 Analýza Western blot

Vzorky z každé frakce OptiPrep gradientu byly smíchány s nanášecím puftrem v poměru 5:1 a denaturovány 5 min při 95 °C. Rozdělení probíhalo na 15 % SDS polyakrylamidovém gelu po dobu 90 min a napětí 150 V. Proteiny rozdělené na gelu byly přeneseny na polyvinylidenfluoridovou membránu (PVDF) a blokovány kaseinem. HIV-1 kapsidový protein (CA protein) byl detekován pomocí polyklonální anti HIV-1 CA protilátky (králíčí sérum imunizované přečištěným HIV-1 CA proteinem; ředění 1:1000, 1 h, RT) a jako sekundární protilátka byla použita anti IgG protilátka značená křenovou peroxidázou (1:10000, 1 h, RT). Po opláchnutí byla membrána inkubována se SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrát a intenzita chemiluminiscence byla zjištěna pomocí CCD kamery.

RNA z virových partikulí byla izolována s použitím Zymo-Spin™ IIC Columns (Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus) podle protokolu výrobce. Kvalita RNA vzorku byla ověřena na HS RNA ScreenTape (4200 TapeStation, Agilent) (Obr. 14B, str. 67) a množství RNA bylo naměřeno na fluorometru Qubit 4 pomocí RNA High Sensitivity Assay. Přítomnost virové RNA byla potvrzena RT-PCR (LightCycler, Roche) (Obr 15, str. 68).

4.3 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..

4.3.1 Infekce SBV

Barevné a strukturní prvky víčka komůrky v plástvi byly použity k identifikaci míst, kde dozrávají včelí kukly. Bílo-oké kukly byly poté opatrně vyjmuty z komůrek a položeny břišní (ventrální) stranou nahoru do drážek poskládaného papíru. Inokulum SBV (1 μ L) bylo vpíchnuté skrz mezisegmentální kutikuly mezi čtvrtý a pátý sternit pomocí Hamiltonovy skleněné mikropipety (jehla 30 - gauge, 22 mm dlouhá). Infikované kukly byly vloženy do petriho misek a inkubovány při 30 °C a 75 % vlhkosti po dobu pěti dnů. Vysoké množství viru v infikované kukle vede ke změně zbarvení centrální části oka kukly. Po inkubaci byly kukly pro uchování zamrazeny (-20 °C, nebo pro dlouhodobé uchování -80 °C) nebo dále zpracovávány.

256 infikovaných včelích kulek bylo homogenizováno (Dounce homogenizátor, vzdálenost pístu od stěny zkumavky 0,075 mm) ve 100 mL PBS, pH 7.4. Extrakt byl stočen (10 000 x g, 30 min, 4 °C). Sebraný supernatant byl dále ultracentrifugován (50 000 RPM) na Ti50.2 rotoru s fixním úhlem (Beckman-Coulter™) po dobu 3 hodin. Výsledná peleta byla rozsuspendována v 5 mL PBS. Pro zbavení se zbytků DNA a RNA, které nepocházejí z viru byla použita DNáza a RNáza. K resuspendované peletě byl přidán roztok MgCl₂ (výsledná koncentrace 5 mM), 20 μ g/mL DNázy I a 20 μ g/mL RNázy. Reakce probíhala při laboratorní teplotě po dobu 30 min a poté byla reakční směs stočena 15 min při 6 000 x g. Výsledný supernatant byl rozdělen na gradientu CsCl (0,6 g/mL) v PBS pomocí ultracentrifugace (rotor SW41, 30 000 RPM, 15 h). Opalescentní proužky odpovídající viru byly vyjmuty z centrifugační zkumavky jehlou (18 - gauge). Ve vzorcích obsahujících virové partikule byl vyměněn pufr na PBS a vzorek byl zakoncentrován. Takto provedený protokol vedl k výtěžku okolo 7 mg viru vhodného pro další analýzy.

4.3.2 Infekce DWV

Průběh infekce a produkce DWV je velmi podobný produkci SBV (viz výše). Stručně, 2 581 vybraných včelích kulek bylo infikováno vpichem 1 μ L inokula DWV mezi čtvrtý a pátý sternit. Kukly s unikající hemolymfou byly vyřazeny. Infikované kukly byly inkubovány pět dní, při teplotě 30 °C a vlhkosti 75 %. Dále byly skladovány při -20 °C nebo -80 °C pro dlouhodobé uskladnění.

600-700 experimentálně infikovaných kukel bylo homogenizováno (Dounce homogenizátor, vzdálenost pístu od stěny zkumavky 0,075 mm) ve 30 mL PBS, pH 7,5. Extrakt byl stočen (15 000 x g, 30 min, 10 °C). Sebraný supernatant byl dále ultracentrifugován (150 000 x g) na Ti50.2 rotoru s fixním úhlem po dobu 3 hodin. Výsledná peleta byla resuspendována v 5 mL PBS. K resuspendované peletě byl přidán roztok MgCl₂ (výsledná koncentrace 5 mM), 20 µg/mL DNázy I a 20 µg/mL RNázy. Reakce probíhala při laboratorní teplotě po dobu 30 min a poté byla reakční směs stočena 15 min při 5 500 x g. Výsledný supernatant byl rozdělen na gradientu CsCl (0,6 g/mL) v PBS pomocí ultracentrifugace (rotor SW41, 30 000 RPM, 16 h). Proužky obsahující virus byly vyjmuty z centrifugační zkumavky jehlou (18 - gauge). Ve vzorcích obsahujících virové partikule byl vyměněn pufr na PBS a vzorek byl zakoncentrován.

4.3.3 Příprava lidských pikornavirů

Echovirus 18 (linie METCALF, obdržena od ATCC-VR-852TM) byl namnožen v permanentní linii ledvinových buněk kočkodana zeleného (African green monkey, GMK) v Dulbecco modifikované Eagle médiu s přidavkem 10 % FBS.

Rhinovirus 2 (linie HGP, ATCC-482) byl namnožen v HeLa buňkách (ATCC-CCL2) v Dulbecco modifikované Eagle médiu s přidavkem 10 % FBS.

Pro přípravu viru bylo použito 50 kultivačních misek o poloměru 150 mm. Infekce probíhala 2-3 dny, do bodu, kdy 90 % buněk projevovalo cytopatický efekt. Medium bylo sebráno. Zbytky adherentních buněk bylo seškábnuto ze dna kultivační misky a buněčná suspenze byla stočena (15 000 x g, rotor A-10, 10 °C, 30 min). Výsledná peleta byla resuspendována v 10 mL PBS. Roztok byl podroben třem cyklům zmrazení (-80 °C) a roztání 37 °C a homogenizován (Dounce homogenizátor). Směs byla stočena 30 min při teplotě 10 °C a otáčkách 3 000 x g (centrifuga Beckman Coulter Allegra 25R, rotor A-10). Supernatant byl přidán k médiu sebranému z infikovaných buněk. Virové partikule byly vysráženy přidáním PEG-8000 a NaCl (výsledná koncentrace 0,6 M) a inkubovány přes noc při mírném třepání a 10 °C. Inkubovaná směs byla stočena 30 min při 10 °C (15 000 x g, centrifuga Beckman Coulter Allegra 25R, rotor A-10). Bílá sraženina byla resuspendována ve 12 mL PBS. Ke směsi byl přidán MgCl₂ (výsledná koncentrace 5 mM) a aby byly virové partikule zbaveny zbytků RNA a DNA z buněk, byly podrobeny enzymové reakci s DNázou I a RNázou (výsledná koncentrace 10 µg/mL). Reakce probíhala při laboratorní teplotě 30 min. Následně byla reakce zastavena přidáním trypsinu (výsledná koncentrace 0,5 µg/mL, 30 °C, 10 min). Následně byla přidána EDTA (výsledná koncentrace 15 mM, pH 9,5) a detergent NP-40TM (výsledná koncentrace 1 %). Virové partikule byly přečištěny na sacharózovém polštáři (30 % (w/v) sacharóza v PBS) ultracentrifugací (21 000 x g, centrifuga Optima X80, rotor Beckman Coulter SW41Ti, 18 hodin, 10 °C). Neprůhledné proužky obsahující virus byly jehlou

(20 - gauge na 5 mL stříkačce) přeneseny do mikrozkušavky, pufr byl vyměněn za PBS a vzorek byl zakoncentrován (2 mg/mL).

4.4 LC-MS RNA z HIV-1

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

Všechny vzorky byly měřeny v technických duplikátech. Kapalinová chromatografie byla provedena na systému I-Class s kolonou C18 (Acquity UPLC® BEH C18 1,7 μm , 15 cm, Waters). Na vyhřátou kolonu (40 °C) bylo naneseno 8 μL vzorku a separace probíhala na gradientu vody (A) a acetonitrilu (B), obojí obsahovalo 0,1 % (v/v) kyseliny mravenčí (Tab.2) (Su, Chan et al. 2014).

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 m⁶A.

Tab. 2.: 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

Všechny hmotnostní chromatogramy byly analyzovány softwarem MassLynx V4.1. Směs nukleosidů (m^1A , m^6A , Am, A, t^6A) 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 triplikátech. Pro každý testovaný nukleosid byl extrahován chromatogram (Extracted ion chromatogram, EIC) na základě majoritního fragmentu (fragmentace bylo dosaženo již ve zdroji) (Obr. DI2-DI3). Chromatografické píky EIC byly integrovány a plocha píku (plocha pod křivkou, area under curve, AUC) byla použita k výpočtu efektivity ionizace testovaných nukleosidů.

4.5 LC-MS RNA izolované z vybraných pikornavirů

Vzorky pikornavirů (1-10 μ g) 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 methylací (A, m^1A , m^6A , Am, G, m^1G , m^2G , m^7G , Gm; C, m^3C , m^5C , Cm; U, m^5U , Um) byly naměřeny v poměru 100 x kanonická báze ku 1 x methylované báze. Takto připravené vzorky standardů byly proměřeny v triplikátech, 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 (Obr. DI8-DI12).

4.6 Příprava sekvenačních knihoven

4.6.1 Mapování m^1A

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 μ g) byly inkubovány ve fragmentačním pufru (100 mM $ZnCl_2$ ve 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[®].

Polovina každého vzorku byla inkubována s alkalickým pufrem (50 mM Na_2CO_3 , 2 mM EDTA, pH 10,4) 1 hodinu při 60 °C, aby bylo dosaženo co nejvyšší konverze m^1A na m^6A pomocí Dimrothova přesmyku. Vzorky byly přečištěny na kolonkách RNA Clean and

Concentration columns (Zymo) a analyzovány HS RNA Screen Tape[®]. 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 MgCl₂, 0,1 mg/mL BSA a 100 mM 2-mercaptoethanol) po přidání 0,5 U FastAP alkalické fosfatázy 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.

Pre-adenylovaný adaptér byl připraven dle publikovaného protokolu (Winz, Cahová et al. 2017). Stručně, adenosin-5'-fosfoimidazolid (ImpA) byl připraven Ing. Oldřichem Hudečkem Ph.D. podle protokolu (Hafner, Landgraf et al. 2008). 50 µL směsi syntetizovaného ImpA (100 mM) a MgCl₂ (50 mM) bylo smícháno s 50 µL komerčně dodaného 5'-fosforylovaného oligomeru (50 nmol). Reakční směs byla zahřívána na 37 °C po dobu 20 min. Následně byla teplota zvýšena na 50 °C a při této teplotě reakce probíhala 1,5 h. Dále bylo ke směsi přidáno 50 µL ImpA (50 mM) a inkubace probíhala další 1 h. Reakční směs byla přečištěna na kolonkách NAP[™]-5 (Merck, USA). Přítomnost pre-adenylovaného adaptéru (3' RNA adaptéru) v jednotlivých frakcích byla testována přístrojem NanoDrop One. Frakce, které adaptér obsahovaly, byly smíchány a kvalita vzorku byla kontrolována 12% SDS PAGE.

Ligace adaptéru 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 adaptér; 0,5 U/µL T4 RNA ligázu a 1 U/µL T4 RNA ligázu 2 truncated. Reakce byla zastavena zahřátím na 75 °C po dobu 15 minut. Nenavázaný 3'- adaptor byl odstraněn 5'-deadenylázou a lambda exonukleázou. Celá směs byla vysrážena ethanolem.

Pro přesnější určení místa, kde se nachází m¹A byly pro reverzní transkripci zvoleny dva různé enzymy (transkriptázy), SuperScript III a TGIRT[™]-III.

Reverzní transkripce s enzymem SuperScript III (10 U/µL) byla provedena v 30 µL směsi obsahující First-Strand Buffer (1 x), RT-primer (5 µM), dNTP mix (výsledná koncentrace 0,5 mM), DTT (5 mM) a BSA (50 µg/µL). reakční směs byla zahřívána na 50 °C po dobu 1 hodiny. Nadbytečný RT-primer byl odstraněn kombinací enzymů (Lambda exonukleáza, exonukleáza 1 a FastAP alkalická fosfatáza). RNA byla degradována pomocí NaOH a reakční směs byla vysrážena 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 MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) s přísadkou 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 vysráženy ethanolem.

Prodloužení vzniklé cDNA na 3'-konci bylo provedeno použitím 1 U/µL enzymu deoxynukleotidyl transferázy (TdT). 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 MgCl₂ pomocí enzymu T4 RNA ligázou (1,5 U/µL) při 4 °C 72 hodin. Reakce byla zastavena zahřátím na 65 °C po dobu 10 minut, vzorky byly vysráženy 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 s přidavkem 5 µM obou značených primerů, 0,5 mM dNTP (každý) a 0,25 U TaqDNA polymerázy a celková reakční směs měla 20 µL. Počáteční denaturace byla provedena při 95 °C po dobu 60 s, annealing 60 s 54 °C, elongace 60 s 68 °C, a denaturace 30 s 95 °C. Závěrečný krok 68 °C, 5 min.

Vzorky po PCR byly nanášeny 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 kitu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

4.6.2 Bisulfitové sekvenování

Pro zjištění pozice m⁵C 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 kitu EZ RNA Methylation™ Kit podle protokolu dodaného výrobcem. Kvalita vzorku byla testována HS RNA Screen Tape® a množství bylo zjištěno RNA High Sensitivity Assay. Vzorky byly vysráženy ethanolem.

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

4.7 Northern blot

Northern blot analýza pro studii pikornavirů byla dodělána Ing. Barborou Svojanovskou a Ing. Kristínou Spustovou.

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 m¹A. 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 močoviny. 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 nanášeno 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) kapilárním transferem provedeném ve 20 x SSC pufru přes noc. Membrána byla dvakrát crosslinkována (120 mJ, 30 s) pomocí elektronického UV crosslinkeru. Poté byla membrána hybridizována v 10 mL Church pufru při 45 °C 1 hodinu (ProBlot hybridizační pícka, Labnet).

Próba (5 µL ze 100 µM zásobního roztoku) byla radioaktivně značena použitím 20 U T4 polynukleotidyl kinázy, 2 µL γ-³²P 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 a přečtena pomocí přístroje Typhoon FLA 9500.

4.8 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..

4.8.1 Bioinformatická analýza knihoven HIV-1

Knihovny byly zpracovány programy cutadapt (50) a Atropos (51). Čisté sekvence delší než 20 bp byly namapovány na lidský genom a HIV-1 genom použitím systému bwa aligner v0.7.10-r789 (52). Všechny statistiky a grafy byly vyrobeny vytvořeným skriptem (github).

4.8.2 Bioinformatická analýza knihoven pikornavirů

Kontrola kvality byla provedena systémem FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) a knihovny byly dále rozděleny pomocí fastx toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html/). Knihovny byly zbaveny barcodových a technických sekvencí kombinací softwarů trimmomatic(26) and cutadapt(27). Sekvence delší než 20 bp byly namapovány použitím bwa aligner v0.7.17 (28). Ready byly namapovány na modifikované sekvence SBV (GeneBank accession NC_002066.1) a DWV (NC_004830.2) virového genomu. Včelí tRNA byly podle literatury seskupeny a pouze jeden zástupce každé skupiny byl použit pro mapování. Detekce a statistické vyhodnocení vnesení chybného nukleosidu, prodloužení, zkrácení nebo předčasného konce byly udělány vlastním softwarem <https://github.com/bioinfocz/rnamod/> pod MIT licenci. Program používá SAM soubory vytvořené bwa jako vstup a z pole řetězce CIGAR detekuje rozdíly a provádí párový t-test mezi vzorkem a kontrolou, poté vytváří grafický a textový výstup pokrytí a významných pozic. Parametry pro významné pozice použité pro nesprávnou inkorporaci a předčasný konec byly: (coverage >100 && err >0.4) || (coverage >100 && p-value < 0.1 && err > 0.1); for insertion or deletion simply err > 0.3(29).

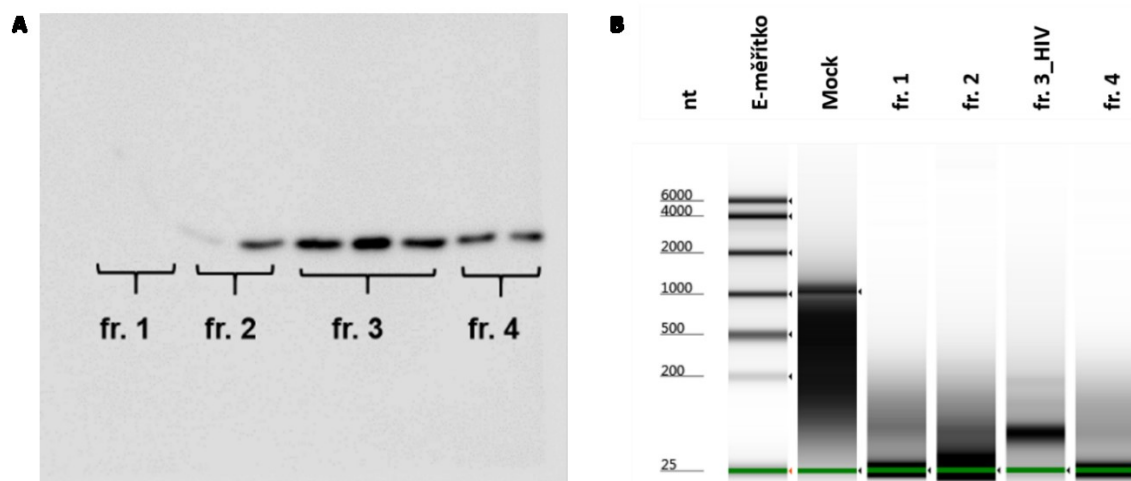
5. VÝSLEDKY

5.1 Studium RNA modifikací ve virové RNA z HIV-1

První část práce se zabývá studiem RNA modifikací RNA získané z HIV-1 virových partikulí. Pro tuto studii byly použity dvě techniky, kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií a mapovací technika pro 1-methyladenosin (m¹A).

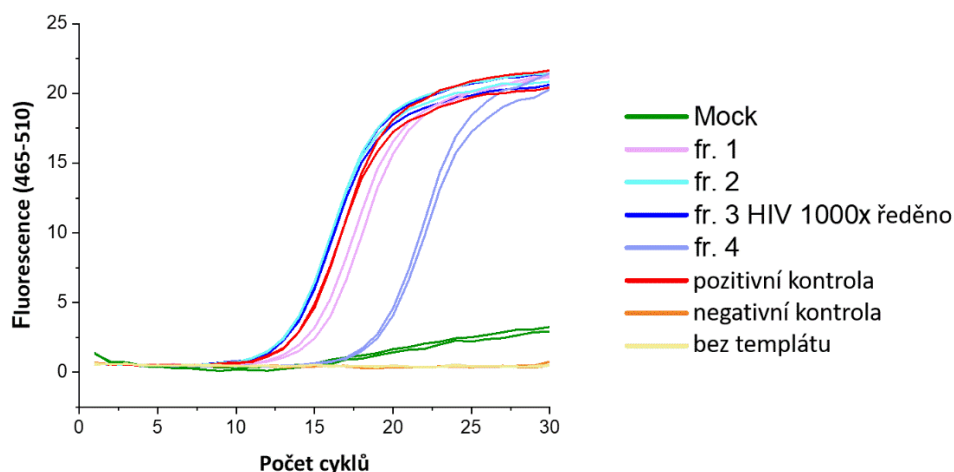
5.1.1 Analýza RNA izolované z HIV-1 virových partikulí

HIV-1 virové partikule byly připraveny infekcí MT4 buněk a následně izolovány z kultivačního media. Virové partikule byly přečištěny na sacharózovém polštáři a iodixolovém gradientu. Přítomnost HIV partikulí byla testována analýzou Western blot (Obr. 14A). Tato část práce byla provedena v laboratoři Virologie (ÚOCHB, Praha) RNDr. Janou Trylčovou Ph.D. a Ing. Barborou Benoni.



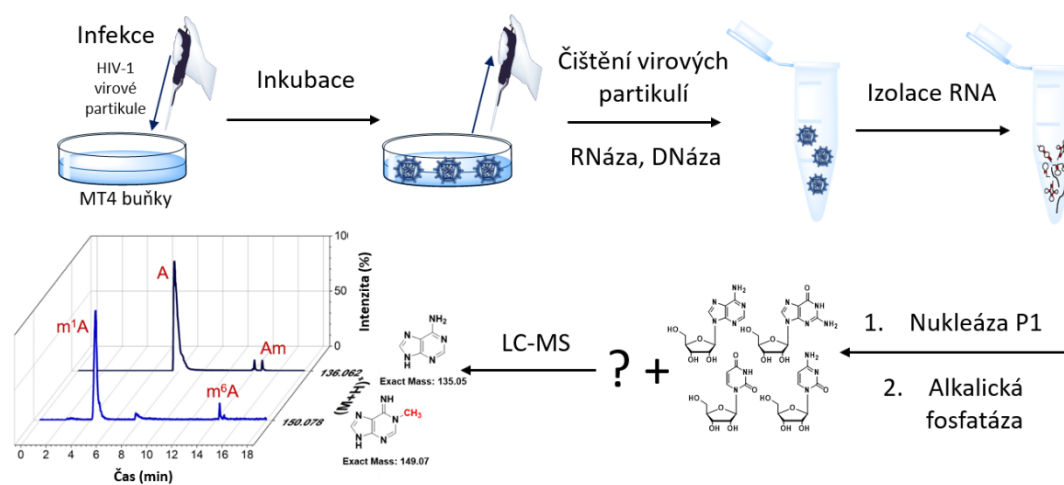
Obr. 14: (A) Analýza Western blot vzorků HIV získaných po gradientovém přečištění Optiprep. (B) HS RNA ScreenTape analýza vzorků HIV. Mock je kontrolní vzorek a jedná se o označení pro RNA izolovanou ze supernatantu neinfikovaných MT4 buněk.

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. 14B, 15). RNA z HIV-1 virových partikulí byla získána pomocí RNázolu. Kvalita získané RNA byla testována na HS RNA ScreenTape (Obr. 14B). Přítomnost gHIV RNA byla potvrzena metodou Real Time-PCR (Obr. 15).



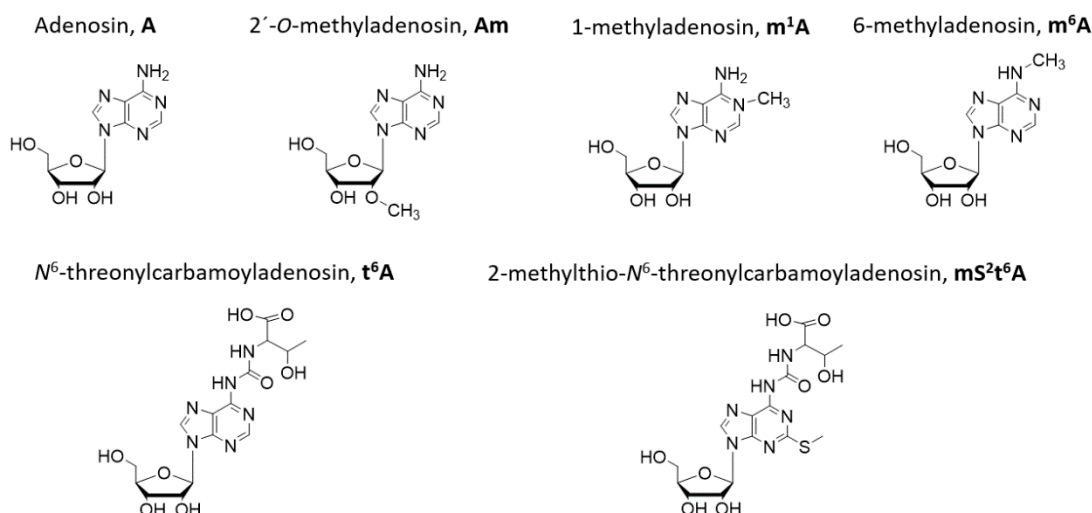
Obr. 15: Grafický záznam analýzy Real Time-PCR vzorků RNA prokazující přítomnost gHIV RNA v testovaných frakcích.

Vzorky RNA byly dále vysráženy ethanolem a naštěpeny do formy nukleosidů pomocí nukleázy P1 a alkalické fosfatázy. Směs nukleosidů byla analyzována LC-MS systémem (Synapt G2) (Obr 16).



Obr.16: Schematické znázornění přípravy vzorků HIV-1 pro LC-MS analýzu.

Pro kvalitativní stanovení kanonických i modifikovaných nukleosidů byly také analyzovány synteticky připravené standardy, které poskytují stejné fragmentační spektrum a jsou eluovány ve stejném čase, jako testované nukleosidy (Obr 17, Obr. DI2, DI3).



Obr. 17: Modifikace adenosinu identifikované v naštěpené RNA z HIV-1.

Pomocí LC-MS analýzy byly detekovány methylované adenosiny. Všeobecně nejhojněji se vyskytující methylovaný adenosin m⁶A byl v RNA izolované z virových partikulí HIV-1 zastoupen ve velmi malém množství, pouze kolem 1 % (Tab.3 A.). Oproti tomu množství m¹A bylo poměrně vysoké, okolo 4,1 % všech adenosinů přítomných v různých RNA obsažených ve virové partikuli (Tab. 3 A). Z dalších známých adenosinových modifikací byly potvrzeny pouze Am, t⁶A a mS²t⁶A (Tab. 3 A). Některé další byly obsaženy stopově a jejich přítomnost byla určena pouze na základě m/z, bez testování standardů (Tab. DI1.).

Tab. 3: (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).

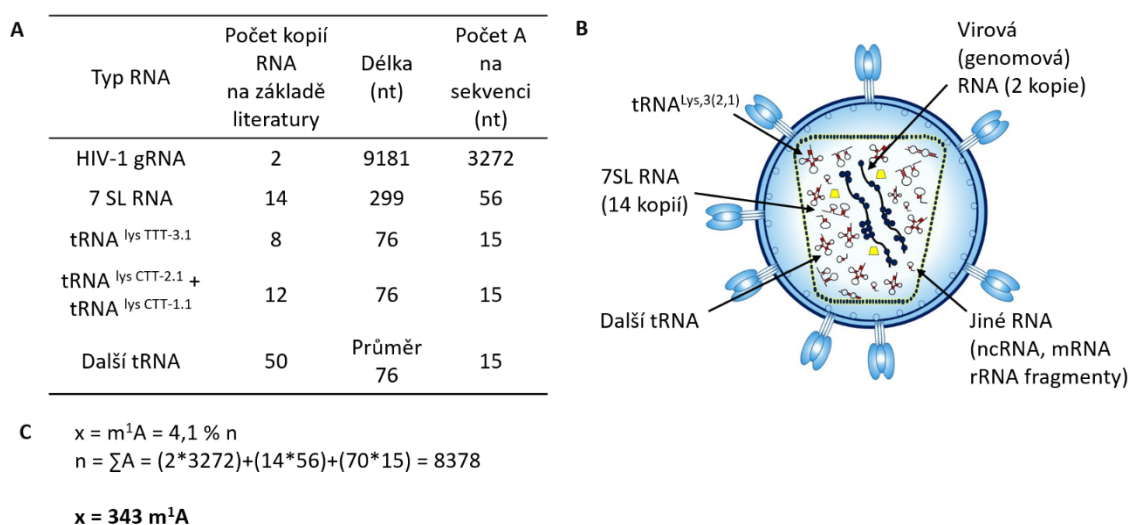
*Za předpokladu, že mS²t⁶A má stejné ionizační podmínky jako t⁶A.

A	Nukleosidy *	%	B	Nukleosidy *	%
	A	89,3 ± 2,0		A	98,8
	m ¹ A	4,1 ± 1,0		m ¹ A	0,1
	m ⁶ A	1,1 ± 0,2		m ⁶ A	0
	Am	0,9 ± 1,0		t ⁶ A	0,5
	t ⁶ A	3,2 ± 0,8		Am, mS ² t ⁶ A	0,6
	mS ² t ⁶ 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. 3 B). 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 genomové RNA, 14 kopií 7SL RNA a zhruba 70 kopií tRNA) (Obr 18A, B) (Bilbille, Vendeix et al. 2009, Kleiman, Jones et al. 2010, Telesnitsky and Wolin 2016) a údaji o množství m^1A získaných přepočtem z hmotnostní spektrometrie bylo dopočítáno, že na jednu virovou partikuli spadá zhruba 340 m^1A (Obr. 18C). Přítomnost m^1A byla doposud prokázána pouze u různých tRNA (pozice 58 v $tRNA^{Lys}$), což by vedlo k závěru, že 270 m^1A modifikací připadá na další RNA ve virové partikuli obsažených.



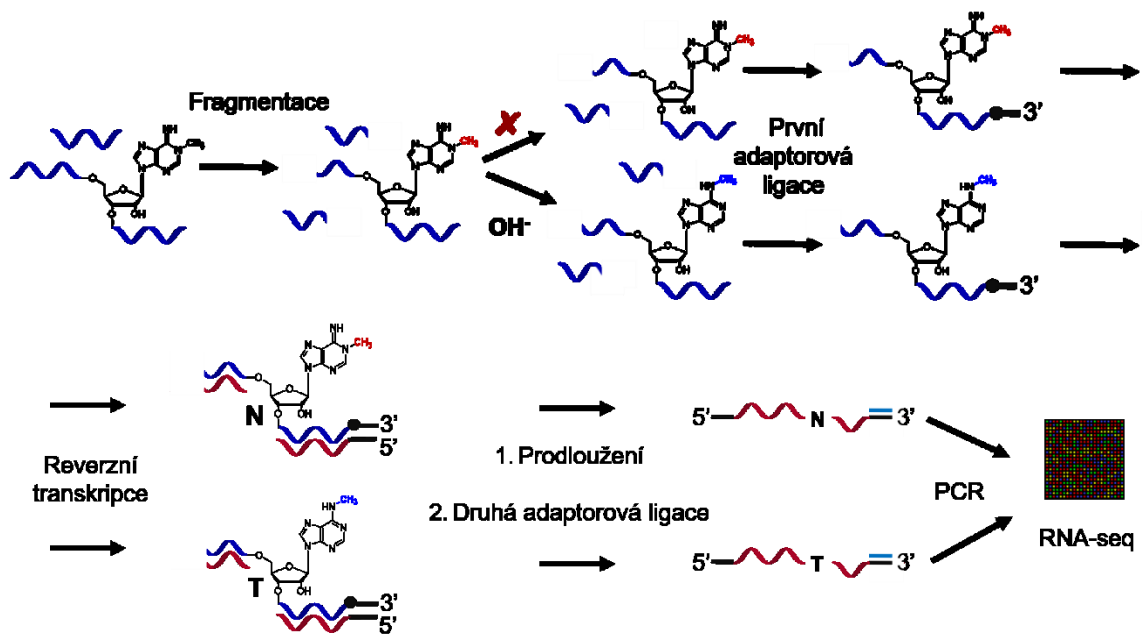
Obr. 18: Zastoupení jednotlivých typů RNA ve virové partikuli (A) Tabulka zastoupení RNA a počtu adenosinů v jednotlivých typech RNA obsažených v HIV-1 virové partikuli (Telesnitsky and Wolin 2016). (B) Schematické znázornění zastoupení jednotlivých typů RNA v HIV-1 virových partikulích. (C) Počet m^1A molekul na jednu virovou partikuli. Výpočet na základě hmotnostní analýzy, vztahený na publikovaná data (výše).

5.1.2 Mapování m^1A

Pro ověření, z jaké RNA m^1A 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^1A na m^6A (Dimrothův přesmyk, viz výše Obr. 6, str. 23).

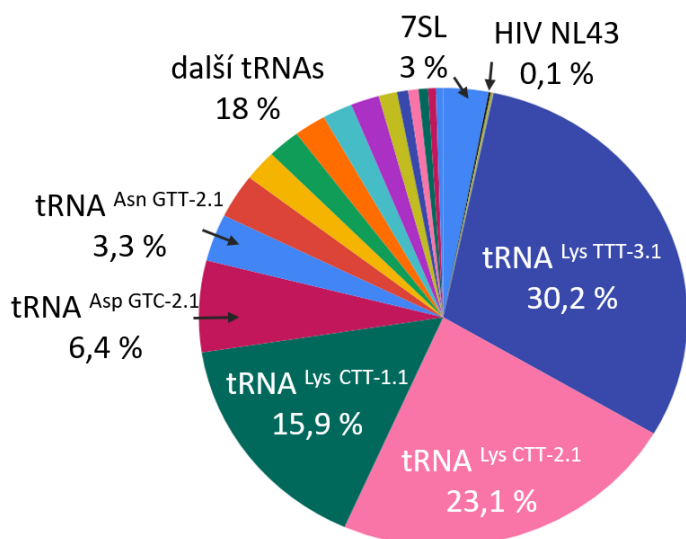
N^6 -methyladenosin je reverzní transkriptázou čten jako A, proto upravený vzorek sloužil jako negativní kontrola. Pro přípravu třech sekvenačních knihoven byla použita reverzní transkriptáza SuperScript™ III. Ta by při styku s m^1A měla ukončit transkripci, popř. m^1A chybně přečíst a vložit do přepisovaného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

Pro přípravu sekvenační knihovny byly použity následující kroky (Obr. 19): 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. 19: Schématické znázornění postupu přípravy sekvenačních knihoven.

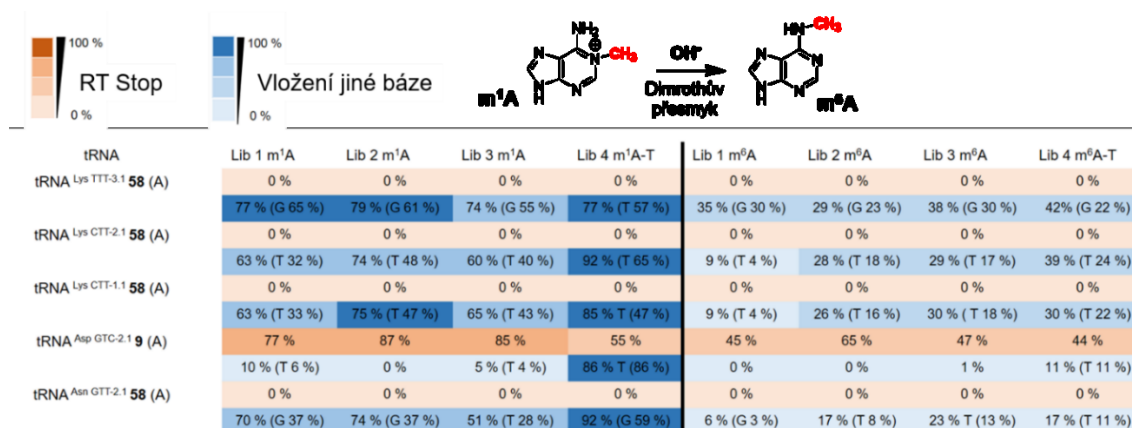
Bioinformatickou analýzou dat (provedenou Mgr. Janem Pačesem, Ph.D.) získaných ze sekvenačních knihoven, bylo potvrzeno, že virová částice HIV-1 obsahuje převážně tRNA, 7SL RNA a genomovou HIV-1 RNA (Obr. 20, Obr. DI4, DI5, Tab. 2 A, B). Všechny ostatní buněčné RNA se vyskytovaly v zanedbatelném množství (0,1 %).



Obr: 20: Procentuální zastoupení RNA nejhojněji se vyskytujících ve virové partikulě HIV-1 na základě dat ze sekvenačních knihoven.

Analýzou získaných dat se dále podařilo identifikovat m¹A v pozici 58 u tRNA^{Lys} TTT-3.1, tRNA^{Lys} CTT-2.1, tRNA^{Lys} CTT-1.1 a tRNA^{Asn} GTT-2.1 a v pozici 9 u tRNA^{Asp} GTC-2.1. Literatura uvádí, že v případě, že reverzní transkriptáza narazí na m¹A, zastaví svou činnost (Hauenschild, Tserovski et al. 2015). Dále byly popsány situace, kdy docházelo k chybnému přečtení m¹A a prepis pokračoval (Hauenschild, Tserovski et al. 2015, Kietrys, Velema et al. 2017). Naše data prokazovala obě varianty v závislosti na pozici m¹A. Inkorporace chybného nukleosidu v transkriptu byla v našich datech pozorována u m¹A v pozici 58 u některých tRNA. Asi 70 % těchto pozic bylo v případě obou testovaných transkriptáz chybně přečteno (Obr. 21, 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. 21), což odpovídá předpokládané konverzi m¹A na m⁶A ve vzorcích RNA. Zároveň se také jedná o potvrzení skutečné přítomnosti m¹A 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^{Asp} 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 21, oranžová barva).



Obr. 21: 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 použita SuperScript™ III RT a pro Lib 4-T byla použita TGIRT™ reverzní transkriptáza.

Pro potvrzení, že takto vytvořený protokol na mapování m¹A 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 m¹A 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 (Obr. DI6).

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 nukleosidu potvrzuje přítomnost m¹A 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 metylaci) (Safra, Sas-Chen et al. 2017). Tato sekvence byla potvrzena v tRNA v místě výskytu m¹A, proto byla v datech pro 7SL RNA a genomovou RNA hledána kombinace všech tří fenoménů; vložení chybného nukleotidu, ukončení přepisu a přítomnost výše uvedené sekvence.

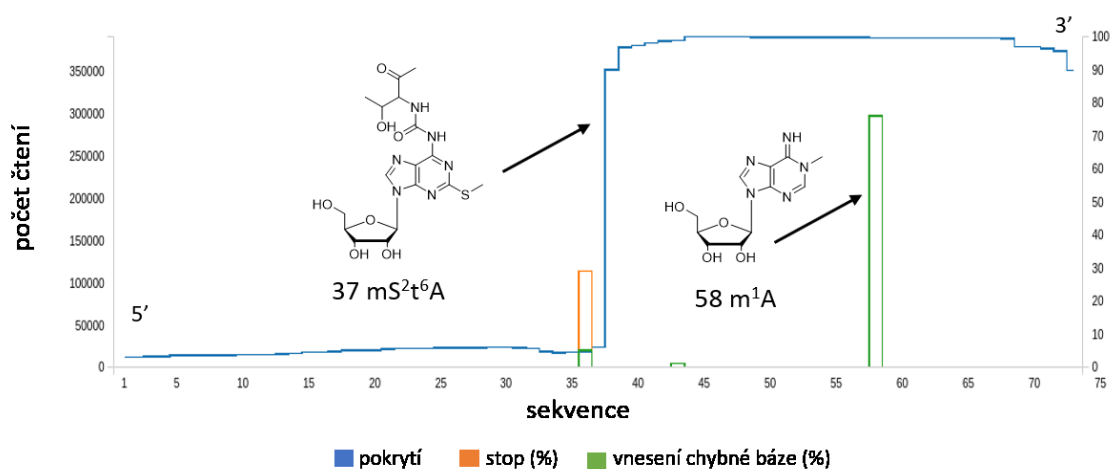
V gRNA bylo nalezeno několik míst s danou sekvencí, přesto ani jedno z těchto míst, kde by mělo být m¹A neukazovalo výrazné zastavení transkripce ani vložení jiného nukleotidu. Stejně tomu tak bylo i mimo definovanou sekvenci. 7SL RNA obsahovala jeden sekvenciální motiv, ale ani zde nebyly pozorovány výrazné změny v transkriptech, které by potvrdily přítomnost m¹A. Vzhledem k faktu, že se ve virové partikulě nevyskytují ve větším množství žádné další RNA kromě tRNA (Telesnitsky and Wolin 2016), bylo dospěno k závěru, že m¹A 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^{Lys TTT-3.1}, zhruba 30 %, dále tRNA^{Lys CTT-2.1}, 23 %, tRNA^{Lys CTT-1.1}, 16 %, tRNA^{Asp GTC-2.1}, 6 % a tRNA^{Asn GTT-2.1} 3 % (Obr 20, str. 72, Tab DI2 A, B).

5.1.3 Northern Blot analýza tRNA z HIV-1 virových partikulí

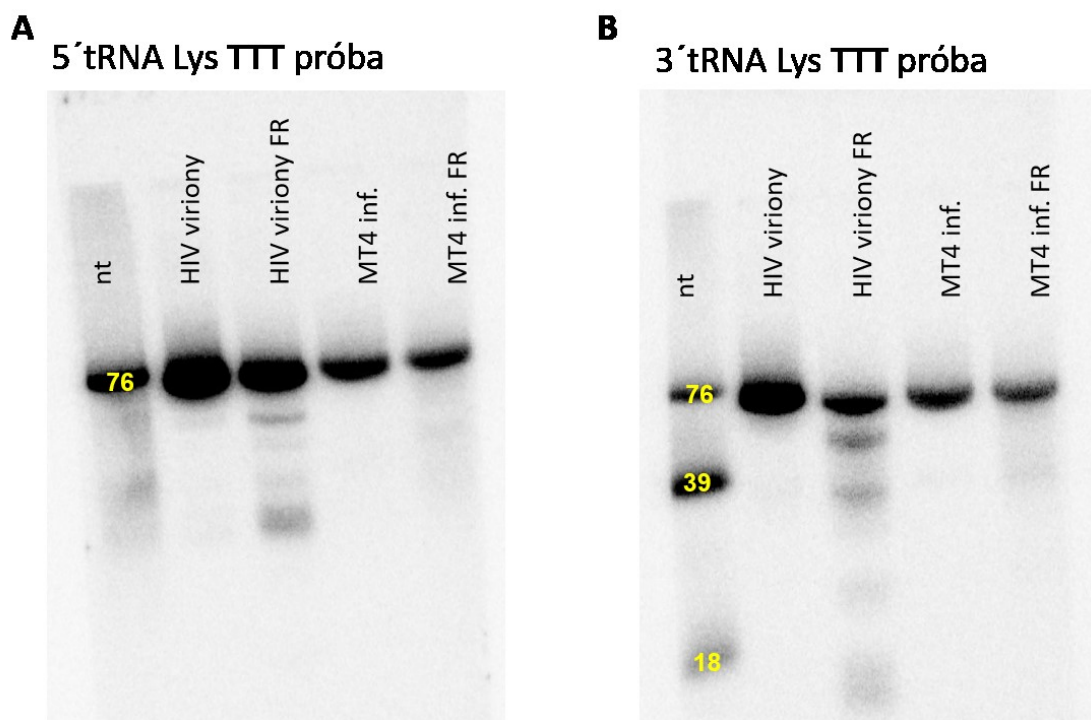
V sekvenačních datech byla pozorována pouze 3' polovina tRNA^{Lys TTT-3.1} (Obr. 22). To mohlo být způsobeno přítomností prostorově výrazné modifikace v mS²t⁶A nad antikodonovou smyčkou, která zabránila čtení reverzní transkriptázy nebo to mohlo být způsobeno tím, že virová partikule obsahuje pouze 3' fragment tRNA.



Obr. 22: Záznam výsledků bioinformatické analýzy pro tRNA^{Lys3}.

K ověření, která hypotéza je správná, byla využita northern blot analýza tRNA. Radioaktivně značené proby byly navrženy pro 3' konec tRNA^{Lys TTT-3.1} a tRNA^{Lys CTT-2.1}, (1.1). Vzhledem k podobnosti sekvencí 5' konce všech tří tRNA, hybridizovala takto navržená próba se všemi zmíněnými. S použitím sekvence tRNA^{Lys TTT-3.1} byly in vitro transkripce 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 kontrola použita RNA z infikovaných MT4 buněk. Přítomnost 3' fragmentů byla pozorována pouze u vzorků RNA z virových partikulí po fragmentaci (Obr. 23). Tyto analýzy vedly k závěru, že m¹A obsažený v RNA pochází z celkové tRNA a k tvorbě fragmentů dochází až v průběhu přípravy knihovny.



Obr. 23.: Northern blot analýza RNA izolované z 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^{Lys TTT-3.1}. **(B)** Radioaktivně značené próby použity pro 3' konec tRNA^{Lys TTT-3.1}. Žlutá čísla uvádějí velikost fragmentů (v nt) tRNA^{Lys TTT-3.1} připravených synteticky podle sekvence tRNA^{Lys TTT-3.1}

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 m¹A pouze v tRNA a sloučíme-li tuto informaci s vypočítaným množstvím m¹A 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. 24 A, B)

A	$x = m^1A$ $n = \sum A$ 4.1% $n = 0.041 n = x$ G = 2 gRNA HIV= 6544 A S = 14 7SL RNA = 784 A 1 tRNA = T= 15 A 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 tRNA= 770	B	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">RNA obsažené ve virové partikuli</th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Počet kopií RNA na základě literatury*</th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Počet kopií RNA na základě LC-MS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">gRNA HIV-1</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">2</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">2</td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">7 SL RNA</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">14</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">14</td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">tRNA^{Lys} TTT-3.1</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">8</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">tRNA^{Lys} CTT-2.1</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">12</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">tRNA^{Lys} CTT-1.1</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;"></td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">770</td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">tRNA^{Asp} GTC-2.1</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;"></td> <td style="border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">tRNA^{Asn} GTT-2.1</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">50</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">další tRNA</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;"></td> <td style="border-bottom: 1px solid black;"></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 ^{Lys} TTT-3.1	8		tRNA ^{Lys} CTT-2.1	12		tRNA ^{Lys} CTT-1.1		770	tRNA ^{Asp} GTC-2.1			tRNA ^{Asn} 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 ^{Lys} TTT-3.1	8																													
tRNA ^{Lys} CTT-2.1	12																													
tRNA ^{Lys} CTT-1.1		770																												
tRNA ^{Asp} GTC-2.1																														
tRNA ^{Asn} GTT-2.1	50																													
další tRNA																														

Obrázek 24: (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).

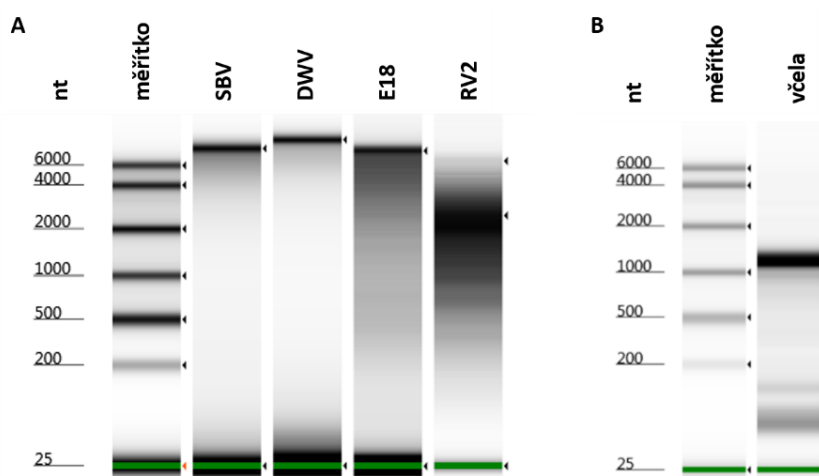
Studiem RNA získané z virové partikule HIV-1 jsme zjistili, že gRNA ani 7SL RNA neobsahují m¹A. Veškerý detekovaný m¹A pochází z přibalených hostitelských tRNA. Dále práce přinesla novou metodu výpočtu množství tRNA přítomných ve virové partikuli HIV-1, a tím i nové informace o kompozici RNA ve virové partikuli HIV-1.

5.2 Studium RNA methylocí 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.

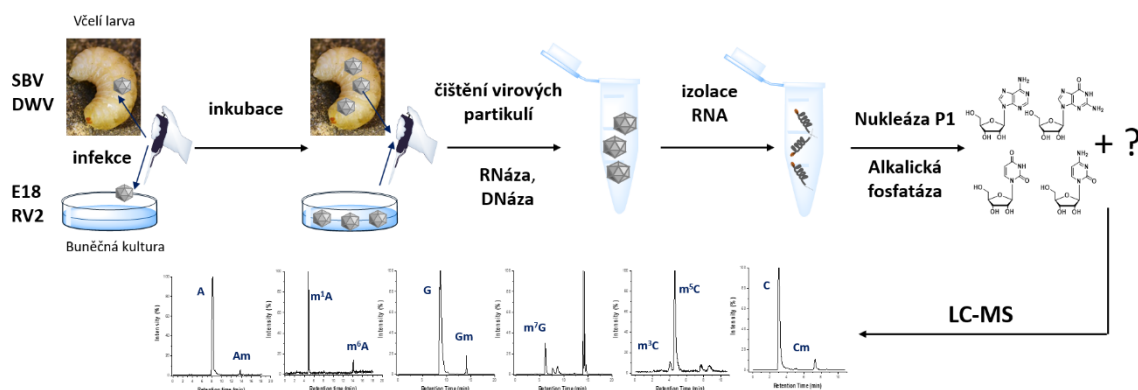
5.2.1 Analýza RNA izolované z různých pikornavirů

Virové partikule ze dvou testovaných lidských (E18 a RV2) a dvou včelích (SBV a DWV) byly přečištěny pomocí CsCl gradientu. Jejich čistota byla kontrolována kryo-elektronovou mikroskopií (Obr. DI7 A, B). 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 partikul byla izolována RNA pomocí RNázu. Kvalita získané RNA byla testována HS RNA ScreenTape (Obr. 25 A, B).



Obr 25: HS RNA ScenTape 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 , m^7G Gm, m^3C , m^5C , Cm, m^5U a Um) (Obr. 26, DI8-DI12).



Obr. 26.: Schematické znázornění přípravy vzorků pikornavirů pro LC-MS analýzu.

LC-MS analýzou byly detekovány tyto modifikace (m^1A , m^6A , Am, m^1G , m^2G , m^7G , Gm, m^3C , m^5C , Cm, m^5U a Um). 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. 4).

Tab. 4: Přehled detekovaných metylovaných nukleosidů pro SBV, DWV, RV2, E18. Vždy vztaženo na 100 nemodifikovaných nukleosidů. Odstíny modré ilustrují množství zastoupené methylace.

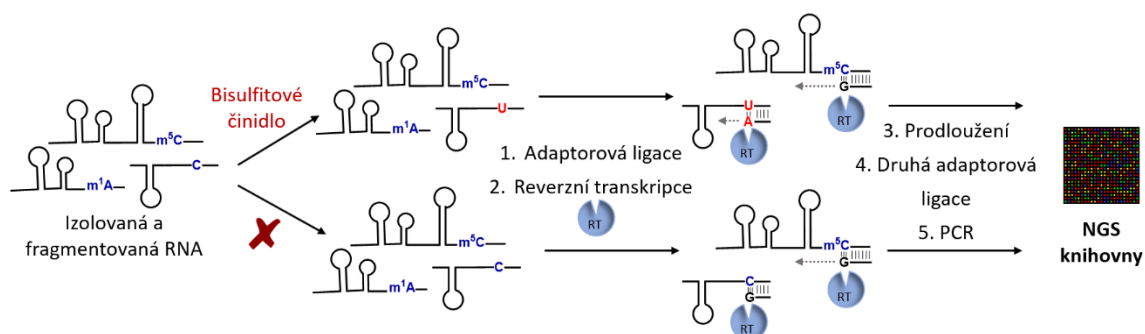
Virus	Délka genomu (nt)	$m^1A/100A$	$m^6A/100A$	Am/100A	$m^1G/100G$	$m^2G/100G$	$m^7G/100G$	Gm/100G
SBV	8832	0,06 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,18 ± 0,12	0,08 ± 0,03	0,22 ± 0,08	0,19 ± 0,04	0,66 ± 0,31
DWV	10071	0,37 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,95 ± 0,06	0,53 ± 0,02	1,32 ± 0,07	0,99 ± 0,01	2,43 ± 0,19
RV2	7120	0,01 ± 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
E18	7410	0,00	0,00	0,12 ± 0,07	0,00	0,02 ± 0,03	0,00	0,00

Virus	Délka genomu (nt)	$m^3C/100C$	$m^5C/100C$	Cm/100C	$m^5U/100U$	Um/100U
SBV	8832	0,03 ± 0,04	0,28 ± 0,13	1,00 ± 0,60	0,03 ± 0,04	0,36 ± 0,32
DWV	10071	0,16 ± 0,02	1,44 ± 0,02	3,67 ± 1,09	0,60 ± 0,01	1,75 ± 0,16
RV2	7120	0,00	0,00	0,14 ± 0,17	0,00	0,00
E18	7410	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.
--------	----------	-------	-----	--

5.2.2 Mapování m¹A a bisulfitové sekvenování pikornavirů

Pro zjištění pozic m¹A a m⁵C byly připraveny sekvenační knihovny pro mapování m¹A (SBV) a m⁵C (SBV, DWV). Pro mapování m¹A byla použita stejná technika, jako v případě HIV-1 (Obr. 19, str.71). Pro mapování m⁵C bylo použito bisulfitového sekvenování (Obr. 27). Data z obou připravených knihoven byla namapována na virovou gRNA.



Obr. 27: Schéma bisulfitového sekvenování.

Bioinformatická analýza (provedená Mgr. Janem Pačesem, Ph.D. a Mgr. Lenkou Gahurovou, Ph.D.), nepotvrdila přítomnost m¹A a m⁵C 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 organizmem nejvíce užívané (Tab. 5). 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. 5).

Mapovací technika pro m¹A prokazatelně nepotvrdila přítomnost m¹A v genomové RNA SBV. Podařilo se ale potvrdit přítomnost methylace např. pro pozici 59 tRNA^{LysCTT} a pozici 56 tRNA^{GlyGCC-1} (Obr. DI13). 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 m¹A 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 m¹A.

Tab. 5: 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).

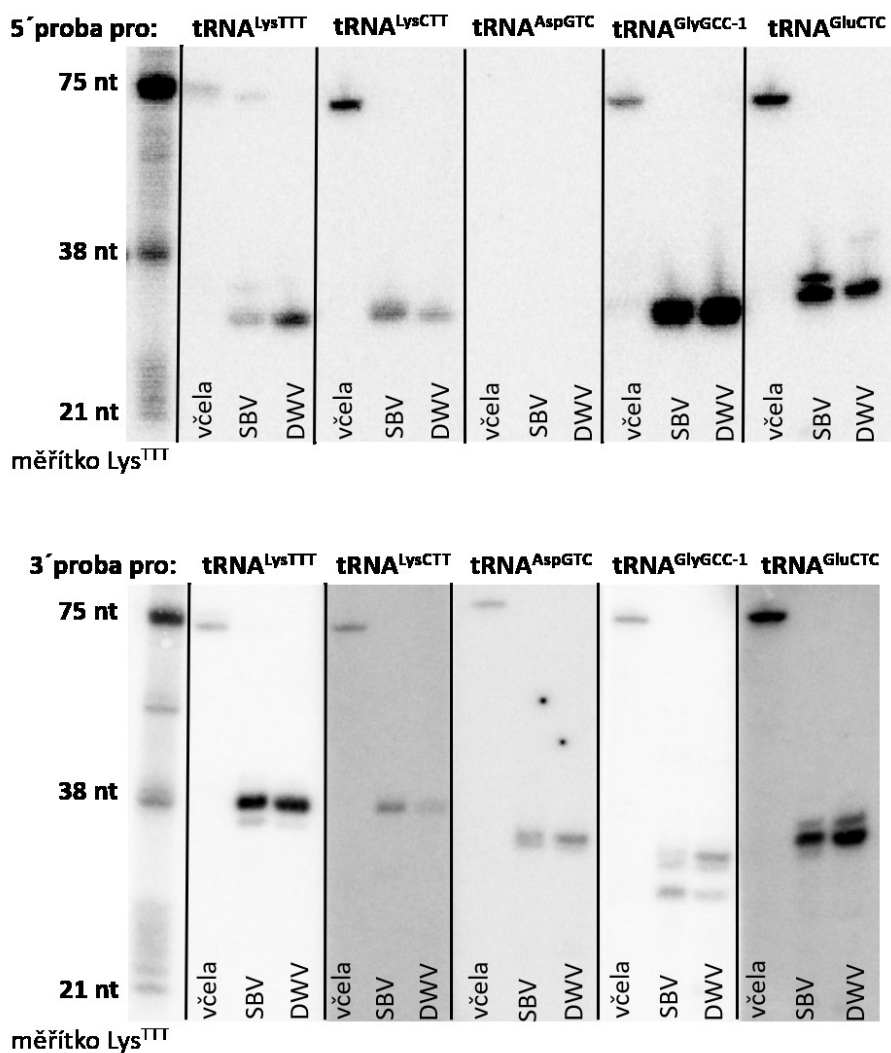
	tRNA v SBV	tRNA v DWV	Užití kodonu včely
1.	Lys CTT	Gly GCC-1	Glu GAA
2.	Gly GCC-1	Asp GTC	Lys AAA
3.	Lys TTT	Lys TTT	Asn AAT
4.	Asp GTC	Glu CTC	Asp GAT
5.	Ala TGC	His GTG	Gln CAA
6.	Glu CTC	Glu TTC	Leu TTA
7.	Glu TTC	Met-1 CAT	Glu GAG
8.	Val AAC	Ala TGC	Ile ATT

I výsledky bisulfitového sekvenování potvrzují přítomnost některých tRNA v RNA izolované z virových partikulí SBV a DWV. 5-methylcytidin byl potvrzen v nejhojněji zastoupených tRNA obsažených ve virové partikuli včelích virů. V případě SBV byl m⁵C potvrzen např. na pozici 49 v tRNA^{GluTTC} a dalších (Tab DI4 A). V případě DWV byl m⁵C potvrzen na pozici 47 v tRNA^{GlyGCC}, na pozici 37 v tRNA^{AspGTC}, na pozici 49 v tRNA^{GluCTC} a v dalších, méně zastoupených tRNA (Tab. DI4 B). V případě uvedených tRNA je přítomnost m⁵C 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 lze předpokládat, že se jedná pouze o nekompletní bisulfitovou reakci než o přítomnost m⁵C v sekvenci (Tab. DI5 A, B).

Obě sekvenační techniky potvrzují přítomnost m¹A a m⁵C pouze v přibalených tRNA. Pro další podpoření získaných výsledků byly z hmotnostních chromatogramů získána data o přítomnosti a/nebo absenci dalších modifikací, specifických pro eukaryontní tRNA (t⁶A, mS²t⁶A, i⁶A) pro všechny testované viry. Přítomnost těchto modifikovaných nukleosidů byla potvrzena na základě detekované hmoty a retenčního času pro t⁶A (porovnáním se standardem t⁶A) a na základě spočítané hmoty pro další dvě modifikace (mS²t⁶A, i⁶A). Uvedené modifikace byly pozorovány u obou včelích virů, SBV i DWV. Nebyly však nalezeny v chromatogramech lidských virů E18 a RV2 (Tab. 4, Obr. DI11, DI12). Toto pozorování tedy potvrzuje teorii, že veškeré detekované RNA modifikace skutečně pocházejí z tRNA. Tyto modifikace následně způsobují zastavení reverzní transkripce při přípravě sekvenačních knihoven (viz výše). I tento fenomén byl v sekvenačních datech nalezených tRNA pozorován.

5.2.3 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 (^{32}P) značenými probami pro 3' a 5' konec tRNA^{GlyGCC-1}, tRNA^{AspGTC} a tRNA^{LysTTT}, tRNA^{LysCTT} a tRNA^{GluCTC}. Jako měřítko byly připraveny různé dlouhé sekvence tRNA^{LysTTT} (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^{GlyGCC-1}, tRNA^{LysTTT}, tRNA^{LysCTT} a tRNA^{GluCTC}) byla srovnatelná nebo menší než v případě 3' fragmentů (Obr. 28). 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. 28: 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 m¹A ani m⁵C. 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.

6. DISKUZE

6.1 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 m¹A a proto se práce dále zaměřovala pouze na tuto modifikaci. Pro mapování m¹A byla vybrána metoda založená na použití reverzní transkriptázy a jejího specifického chování v případě, že je v sekvenci modifikace přítomna. Mapování m¹A potvrdilo přítomnost methylace pouze v tRNA. Ve všech ostatních RNA vyskytujících se ve virové partikuli HIV-1 nebyla přítomnost modifikace prokázána. Poté, co byla potvrzena přítomnost pouze celých molekul tRNA byl proveden přepočet 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^{LysTTT-3.1}, 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^{LysTTT-3.1}, dochází téměř vždy k přerušení transkripce RT v pozici 37, kde se nachází objemná molekula mS²t⁶A a čtená sekvence v cDNA je tedy 39 nt dlouhá.

Ze sekvenačních dat vyplývá, že okolo 69 % RNA v HIV-1 virové partikuli je tvořeno třemi verzemi tRNA^{Lys}. 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^{Lys} (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 m¹A. 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 partikulí 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 m¹A 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 % methylovány. Kromě toho, že se takto nízké množství m¹A 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 m¹A 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^{LysTTT-3.1}. Tyto fragmenty jsou komplementární místu navázání primeru v 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. 23, A, B, str. 75). Zároveň tím bylo vyloučeno, že by m¹A pocházel z 3' fragmentů tRNA.

6.2 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 (Obr. DI8-DI12). Tato analýza odhalila poměrně velké množství methylovaných nukleosidů (m^1A , Am, m^1G , m^2G , m^7G , Gm, m^5C , Cm a Um) v případě hmyzích virů. Lidské pikornaviry obsahovaly pouze stopové množství 2'-*O*-methylovaných nukleosidů a m^6A , který byl nedávno potvrzen i u enteroviru 71 (Hao, Hao et al. 2019).

Pro určení přesné pozice m^1A a m^5C v sekvenci virové gRNA obou hmyzích virů, byly připraveny sekvenční knihovny. Bioinformatická analýza dat získaných z knihoven nepotvrdila přítomnost m^1A ani m^5C v genomové RNA ani u SBV ani u DWV. Podařilo se ale identifikovat určité typy tRNA v obou testovaných virech. Analýza dat přinesla 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^1A 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) (Tab. DI6). 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. 5). 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 28, str. 8). 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 m¹A ani m⁵C. 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.

7. ZÁVĚR

- I. Ve spolupráci s oddělením Virologie (Mgr. Jan Weber Ph.D., ÚOCHB AV ČR, 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^1A . Metoda potvrdila přítomnost m^1A v RNA izolované z HIV-1. Technika byla použita i pro popis dalších adenosinových modifikací (Tab. DII). Dále byla provedena kvantifikace nejvíce zastoupených adenosinových modifikací (Tab. 3).
- III. Kombinací několika sekvenačních technik byla vytvořena nová metoda pro mapování m^1A . Analýzou sekvenačních dat bylo zjištěno, že m^1A obsahují pouze přibalené molekuly tRNA.
- IV. Přítomnost m^1A 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. 4).
- VII. Pro stanovení pozice m^1A a m^5C v sekvenci včelích virů bylo využito sekvenačních technik mapování m^1A 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).

DOPLŇUJÍCÍ INFORMACE



AS_HIV_180803

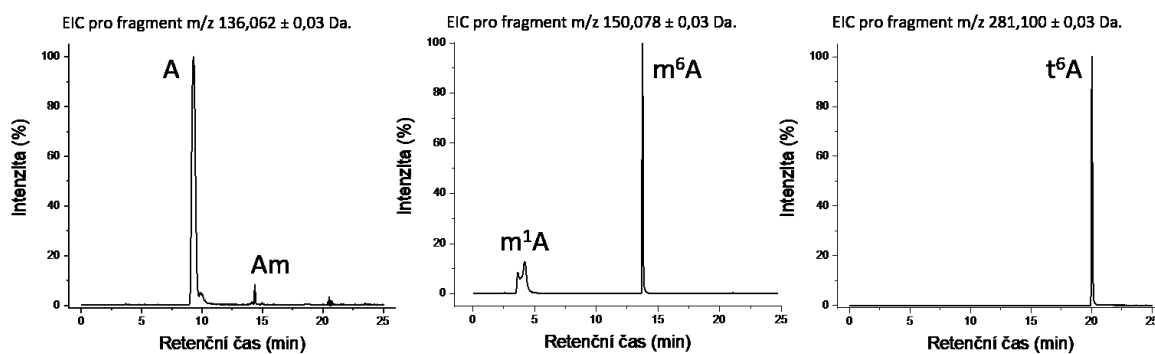
Experiment

Creation Date	08/03/2018 10:20:37 AM	Last Modified Date	08/03/2018 12:26:21 PM
Operator	operator	Owner	operator
Start Time	08/03/2018 10:49:43 AM	End Time	08/03/2018 12:01:57 PM
Run State	Completed	Software Version	LCS480 1.5.1.62
Macro		Macro Owner	
Macro Status			
Templates	BS luna Run Protocol	Plate ID	
Test ID		Lot ID	
Color Comp ID			
Run Notes			

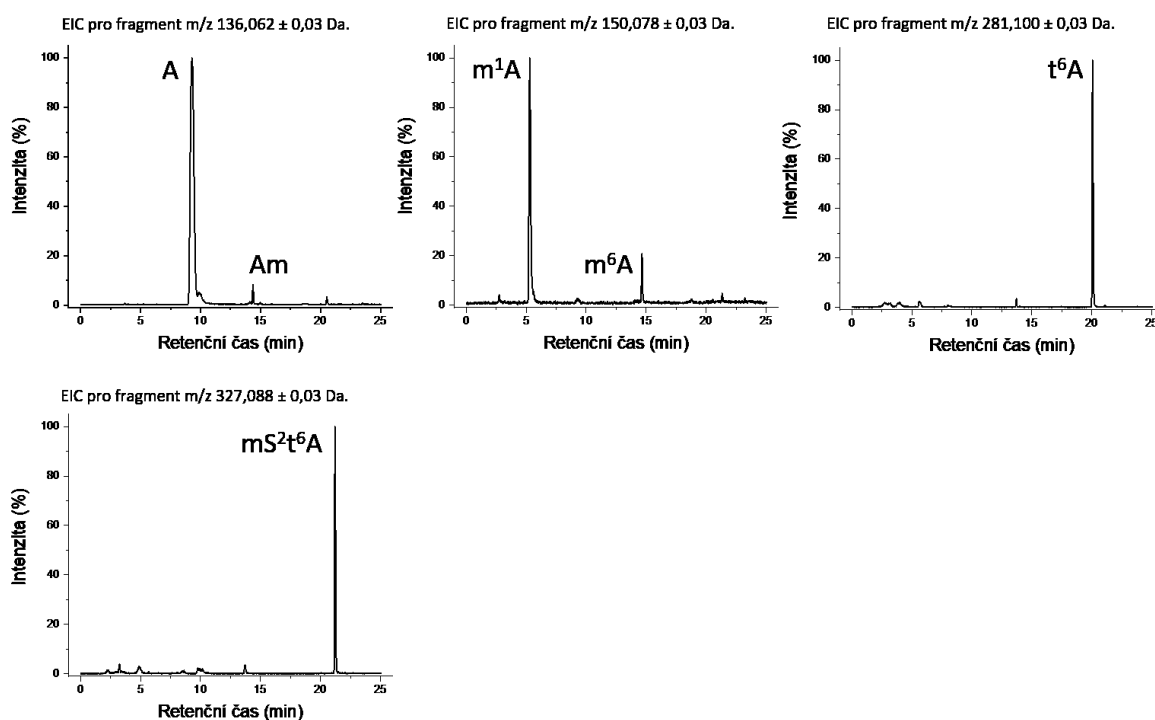
Programs

Program Name		Reverse Transcription					
Cycles	1	Analysis Mode		None			
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
55	None	00:15:00	4.40		0	0	0
Program Name		Pre incubation					
Cycles	1	Analysis Mode		None			
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:01:00	4.40		0	0	0
Program Name		Amplification					
Cycles	40	Analysis Mode		Quantification			
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
63	Single	00:00:30	2.20		0	0	0
Program Name		Denaturace					
Cycles	1	Analysis Mode		Melting Curves			
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
37	None	00:00:01	2.20		0	0	0
95	Continuous		0.11	5	0	0	0
20	None	00:00:10	1.50		0	0	0

Obr DI1: Podmínky Real Time PCR.



Obr DI2: Extrahované chromatogramy (EIC) pro standardy modifikovaných adenosinů.



Obr DI3: Extrahované chromatogramy (EIC) potvrzených adenosinových modifikací v RNA z HIV-1.

Tab. D11: Seznam známých adenosinových modifikací, které byly hledány v chromatogramu štěpené RNA z HIV-1 virové partikule (n.d. = nebylo detekováno, detekováno = pouze stopové množství).

Modifikace	Vzorec	Zkratka	Výskyt v RNA z HIV-1
1,2'- <i>O</i> -dimethyladenosin	C ₁₂ O ₄ N ₅ H ₁₇	m1Am	n.d.
1,2'- <i>O</i> -dimethylinosin	C ₁₂ O ₅ N ₄ H ₁₆	m1Im	n.d.
1-methyladenosin	C ₁₁ O ₄ N ₅ H ₁₅	m1A	potvrzeno
1-methylinosin	C ₁₁ O ₅ N ₄ H ₁₄	m1I	n.d.
2,8-dimethyladenosin	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₄	m2,8A	n.d.
2-methylthiomethylenethio- <i>N</i> ⁶ -isopentenyl-adenosin	C ₁₇ H ₂₅ N ₅ O ₄ S ₂	msms2i6A	n.d.
2-methyladenosin	C ₁₁ O ₄ N ₅ H ₁₅	m2A	n.d.
2-methylthio cyclic <i>N</i> ⁶ -threonylcarbamoyl-adenosin	C ₁₇ H ₂₁ N ₅ O ₇ S	ms2ct6A	n.d.
2-methylthio- <i>N</i> ⁶ -(cis-hydroxyisopentenyl)adenosin	C ₁₆ O ₅ N ₅ H ₂₃ S ₁	ms2io6A	n.d.
2-methylthio- <i>N</i> ⁶ -hydroxynorvalylcarbamoyl-adenosin	C ₁₇ O ₈ N ₆ H ₂₄ S ₁	ms2hn6A	n.d.
2-methylthio- <i>N</i> ⁶ -isopentenyladenosin	C ₁₆ O ₄ N ₅ H ₂₃ S ₁	ms2i6A	detekováno
2-methylthio- <i>N</i> ⁶ -methyladenosin	C ₁₂ O ₄ N ₅ H ₁₇ S ₁	ms2m6A	n.d.
2-methylthio- <i>N</i> ⁶ -threonylcarbamoyl-adenosin	C ₁₆ O ₈ N ₆ H ₂₂ S ₁	ms2t6A	detekováno
2'- <i>O</i> -methyladenosin	C ₁₁ O ₄ N ₅ H ₁₅	Am	potvrzeno
2'- <i>O</i> -methylinosin	C ₁₁ O ₅ N ₄ H ₁₄	Im	n.d.
8-methyladenosin	C ₁₁ O ₄ N ₅ H ₁₅	m8A	n.d.
<i>N</i> ⁶ ,2'- <i>O</i> -dimethyladenosin	C ₁₂ O ₄ N ₅ H ₁₇	m6Am	n.d.
<i>N</i> ⁶ , <i>N</i> ⁶ ,2'- <i>O</i> -trimethyladenosin	C ₁₃ O ₄ N ₅ H ₁₉	m6,6Am	n.d.
<i>N</i> ⁶ , <i>N</i> ⁶ -dimethyladenosin	C ₁₂ O ₄ N ₅ H ₁₇	m6,6A	n.d.
<i>N</i> ⁶ -(cis-hydroxyisopentenyl)adenosin	C ₁₅ O ₅ N ₅ H ₂₁	io6A	potvrzeno
<i>N</i> ⁶ -acetyl-adenosin	C ₁₂ O ₅ N ₅ H ₁₅	ac6A	n.d.
<i>N</i> ⁶ -formyl-adenosin	C ₁₁ H ₁₃ N ₅ O ₅	f6A	n.d.
<i>N</i> ⁶ -glycinylcarbamoyl-adenosin	C ₁₃ O ₇ N ₆ H ₁₆	g6A	n.d.
<i>N</i> ⁶ -hydroxymethyl-adenosin	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₅	hm6A	n.d.
<i>N</i> ⁶ -hydroxynorvalylcarbamoyl-adenosin	C ₁₆ O ₈ N ₆ H ₂₂	hn6A	n.d.
<i>N</i> ⁶ -isopentenyl-adenosin	C ₁₅ O ₄ N ₅ H ₂₁	i6A	detekováno
<i>N</i> ⁶ -methyl- <i>N</i> ⁶ -threonylcarbamoyl-adenosin	C ₁₆ O ₈ N ₆ H ₂₂	m6t6A	n.d.

N^6 -methyladenosin	$C_{11}O_4N_5H_{15}$	m6A	potvrzeno
N^6 -threonylcarbamoyladenosin	$C_{15}O_8N_6H_{20}$	t6A	potvrzeno
cyclic N^6 -threonylcarbamoyladenosin	$C_{15}O_7N_6H_{18}$	ct6A	n.d.
hydroxy- N^6 -threonylcarbamoyladenosin	$C_{15}H_{20}N_6O_9$	ht6A	n.d.
inosin	$C_{10}O_5N_4H_{12}$	I	n.d.

A) Porovnání sekvencí tří lidských lysinových tRNA

```

hs-tRNA-Lys-TTT-3-1  GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTTTTAAATCTGAGGGTCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCGGGGC
hs-tRNA-Lys-CTT-1-1  GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACTCTTAAATCCAGGGTCGTGGGTTCCGAGCCCCACGTTGGGGC
hs-tRNA-Lys-CTT-2-1  GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTCTTAAATCTCAGGGTCGTGGGTTCCGAGCCCCACGTTGGGGC
*****

```

B) Odlišné pozice pro tři lidské lysinové tRNA a procento počtu čtení pro každou z těchto pozic

hs-tRNA-Lys-TTT-3-1	G	A	C	T	G	A	C	T	G	A	C	T	G	A	C	T	G	A	C	T
A:	99.0	0.0	99.8	1.7	0.0	0.0	0.0	100	100	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C:	0.9	99.5	0.0	0.8	0.0	0.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100
G:	0.0	0.5	0.1	0.4	0.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0
T:	0.0	0.0	0.0	97.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0

hs-tRNA-Lys-CTT-1-1	G	A	C	T	G	A	C	T	G	A	C	T	G	A	C	T	G	A	C	T
A:	0.6	0.1	0.7	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	99.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C:	99.1	0.0	0.0	99.8	100	99.9	0.0	0.1	0.0	0.0	98.4	0.1	99.9	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
G:	0.1	99.8	99.3	0.0	0.0	0.0	99.9	0.2	99.9	1.5	0.1	0.0	99.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
T:	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	99.7	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	99.7	0.0	0.0	0.0	0.0

hs-tRNA-Lys-CTT-2-1	G	A	C	T	G	A	C	T	G	A	C	T	G	A	C	T	G	A	C	T
A:	0.4	0.0	100	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	99.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C:	99.4	0.1	0.0	99.8	0.4	99.9	0.0	0.1	0.1	98.7	0.1	99.9	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
G:	0.1	99.9	0.0	0.0	0.0	0.0	99.9	0.2	99.8	1.1	0.1	0.0	99.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
T:	0.1	0.1	0.0	0.1	99.5	0.0	0.1	99.7	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	99.7	0.0	0.0	0.0	99.7

Obr. D14: Kvalita mapování třech lidských lysinových tRNA (tRNA^{Lys}).

Tab. D12: Bioinformatická analýza.

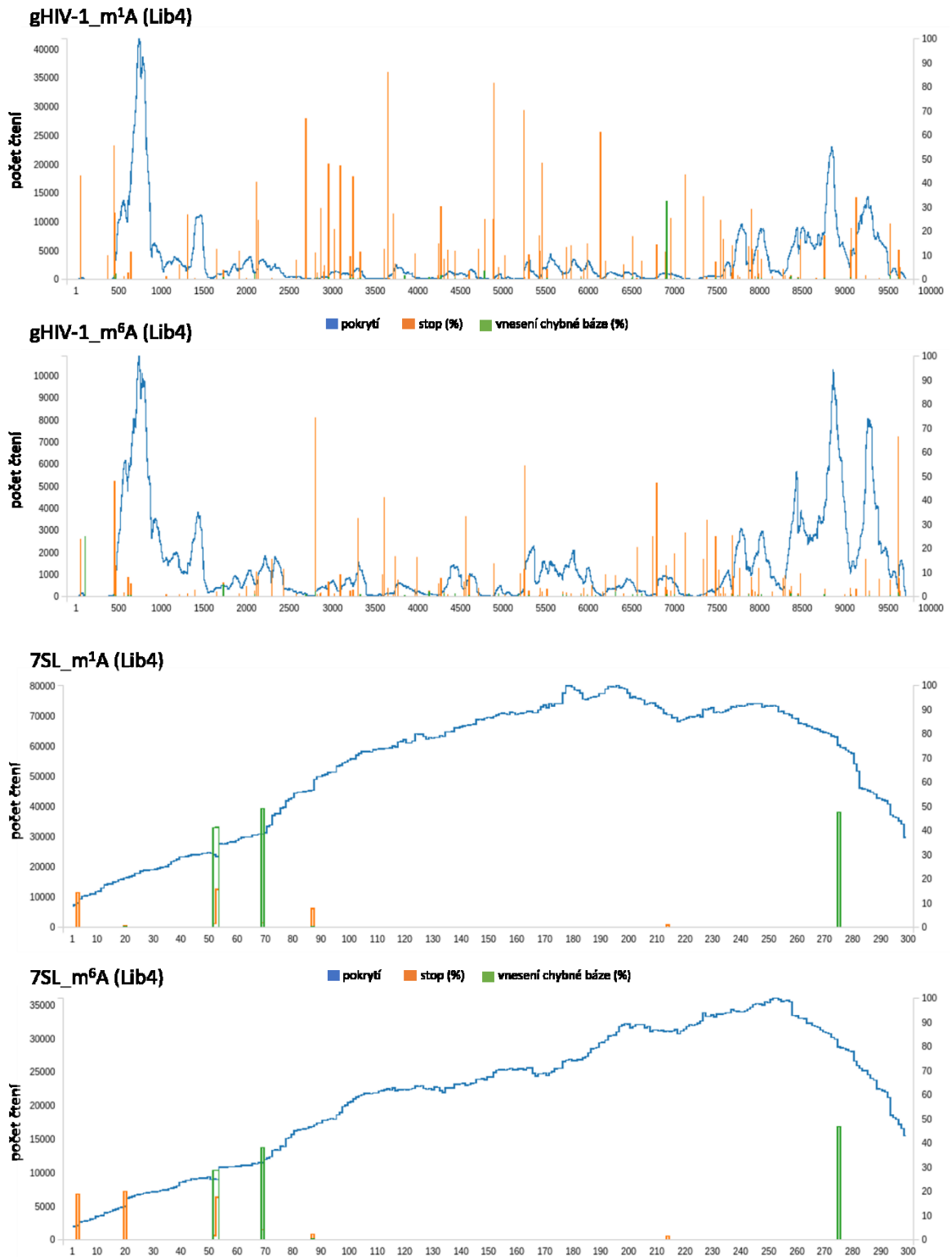
A) Počty čtení (readů) nejvíce zastoupených RNA sekvencí detekovaných v sekvenačních datech z HIV-1 (libAS je symbol pro knihovnu, číslo uvádí číslo dané knihovny).

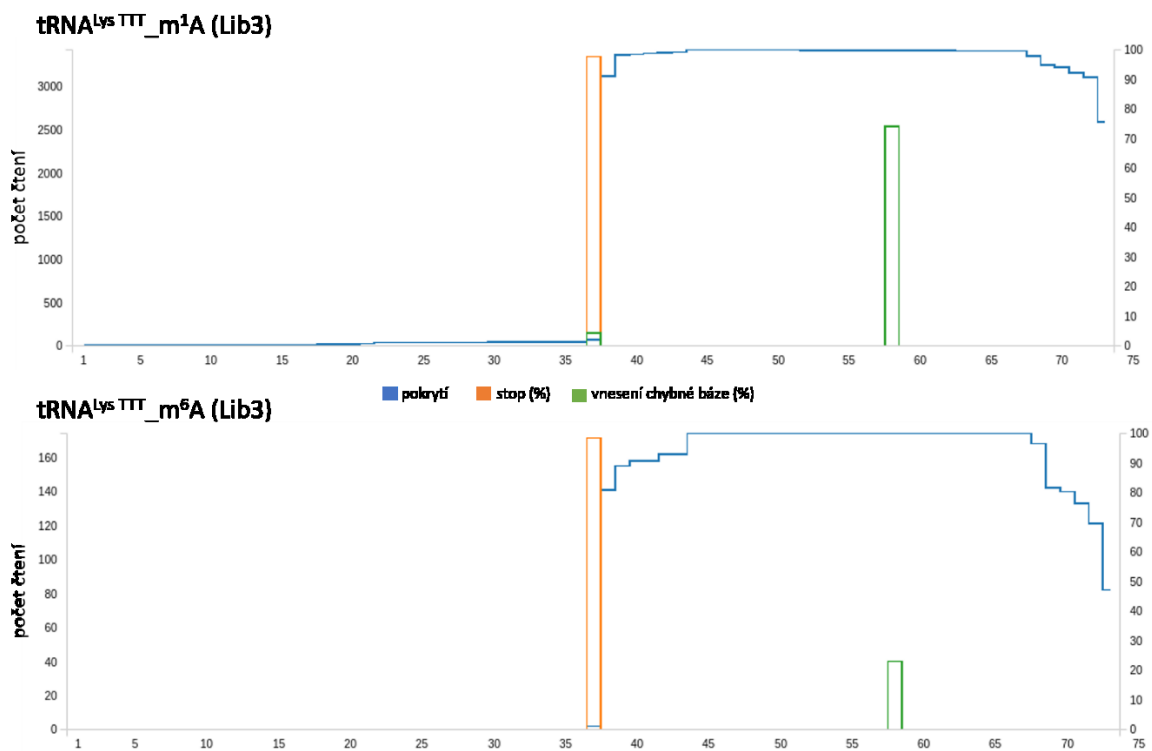
RNA	libAS2-m1AHIV	libAS2-m6AHIV	libAS3-m1AHIV	libAS3-m6AHIV	libAS4-m1AHIV	libAS4-m6AHIV
7SL	74,98	56,88	43,15	33,44	90,61	31,29
gHIV-1 (HIVNL43)	2,82	1,30	1,10	1,05	5,13	1,80
ALU	0,72	0,67	0,61	0,53	2,82	0,80
RNU1-1	0,11	0,06	2,96	0,67	1,39	0,54
RNU6-1	0,79	0,35	0,70	0,55	1,73	0,79
VTRNA1-1	0,59	0,73	0,83	0,55	1,31	0,33
SNAR-A1	0,05	0,06	0,04	0,03	0,15	0,03
L1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,03

B) Počty čtení prvních 20 lidských tRNA sekvencí detekovaných v sekvenačních datech HIV-1.

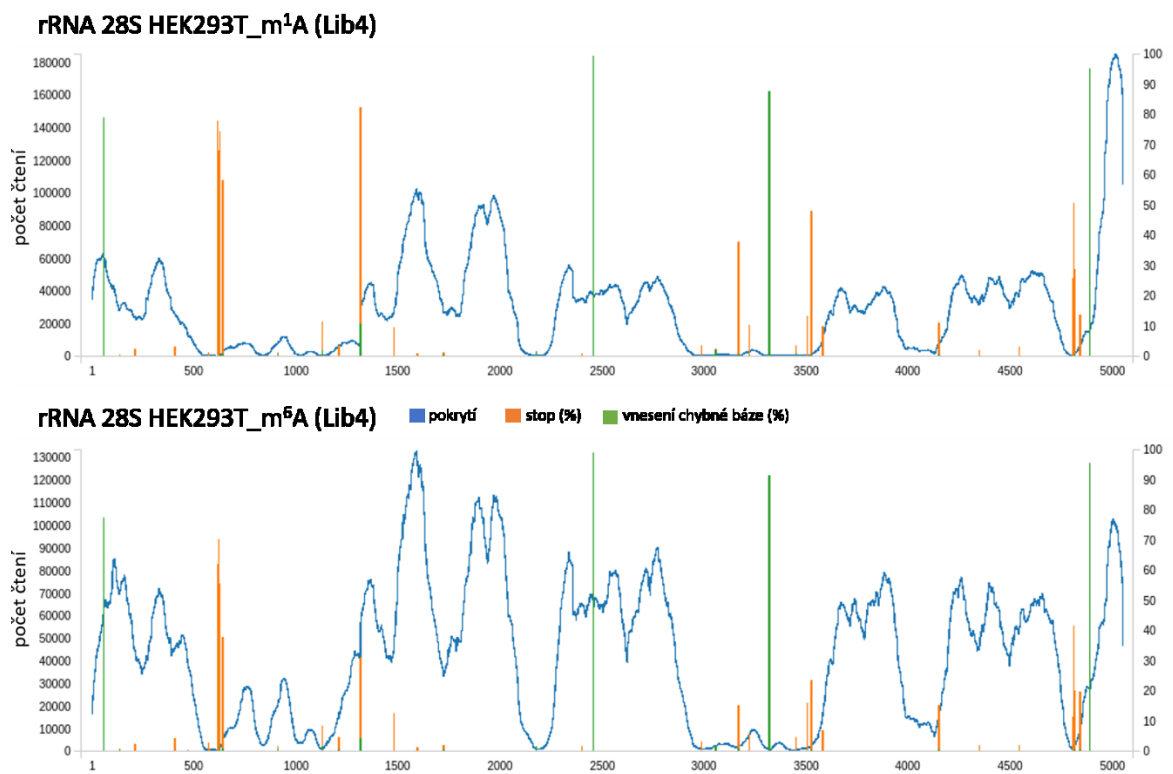
lidská tRNA	libAS2- m1AHIV	libAS2- m6AHIV	libAS3- m1AHIV	libAS3- m6AHIV	libAS4- m1AHIV	libAS4- m6AHIV
Lys-TTT-3-1	1312,6	157,12	914,85	278,86	440,15	214,88
Lys-CTT-2-1	330,63	62,05	1341,64	85,73	572,93	154,7
Lys-CTT-1-1	274,87	52,61	874,39	72,15	382,84	96,52
Asp-GTC-2-1	28,62	16,01	354,96	22,65	239,89	47,31
Asn-GTT-2-1	54,97	26,35	195,3	23,65	44,53	20,55
Lys-CTT-4-1	68,94	38,16	125,66	38,84	41,88	29,49
Glu-CTC-1-1	24,08	13,57	64,41	16,33	86,05	34,78
Lys-CTT-3-1	46,89	36,18	69,83	34,12	27,88	22,23
Lys-TTT-4-1	73,06	7,5	86,49	14,58	38,05	13,83
Lys-TTT-2-1	66,38	6,75	82,14	13,97	35,56	13,47
Gly-GCC-2-1	15,51	12,55	108,18	19,98	36,63	15
Asn-GTT-3-1	25,52	20,51	56,48	15,35	9,97	6,24
His-GTG-1-1	9,97	3,62	32,92	5,71	21,01	7,94
Gly-TCC-2-1	7,61	1,86	34,1	4,24	18,67	8,55
Met-CAT-6-1	10,48	5,97	23,73	7,43	12,56	7,67
Lys-TTT-5-1	16,69	4,53	18,03	5,99	9,82	1,95
Asp-GTC-3-1	5,1	8,72	13,32	5,85	13,11	6,63
Gly-GCC-1-1	5,35	4,16	19,21	4,77	8,57	3,75
Asp-GTC-1-1	1,77	1,59	24,16	1,9	12,02	3,02
Met-CAT-1-1	7,86	1,3	15,66	3,79	10,15	5,65
Glu-TTC-2-1	3,01	1,66	19,2	2,86	11,98	3,11

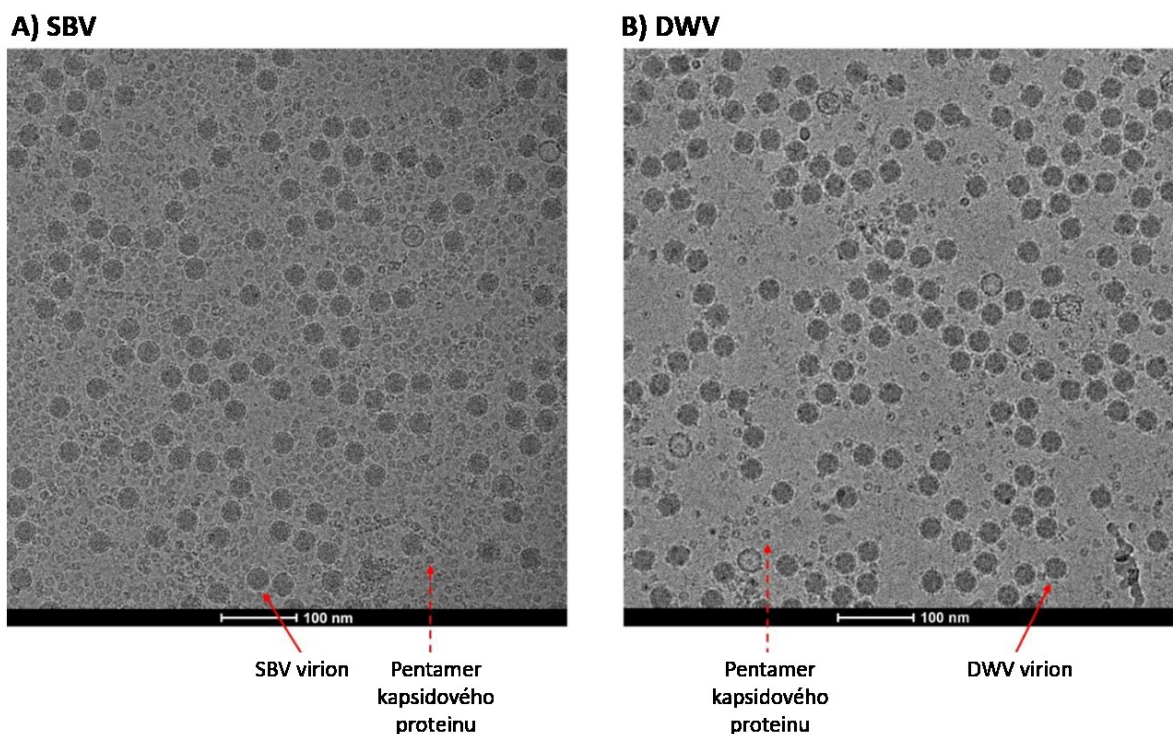
Obr. D15: Výsledky bioinformatické analýzy sekvenačních knihoven mapujících m¹A v HIV-1 (vybraná data, více viz (Šimonová, Svojanovská et al. 2019)). Grafy znázorňují neupravené vzorky (m¹A) a vzorky po působení alkalického prostředí (konverze na m⁶A).





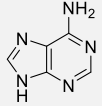
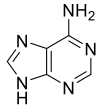
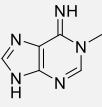
Obr. D16: Výsledky bioinformatické analýzy sekvenačních knihoven mapujících m¹A v rRNA 28S (Hek 293T). (vybraná data, více viz (Šimonová, Svojanovská et al. 2019)). Grafy znázorňují neupravené vzorky (m¹A) a vzorky po působení alkalického prostředí (konverze na m⁶A).

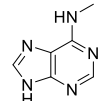
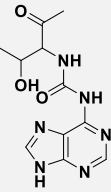
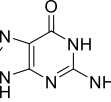
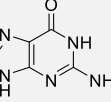
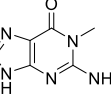
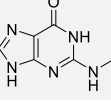
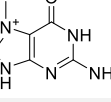
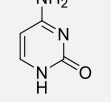
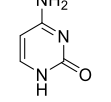
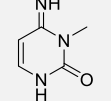
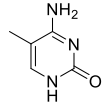
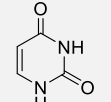


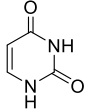
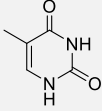


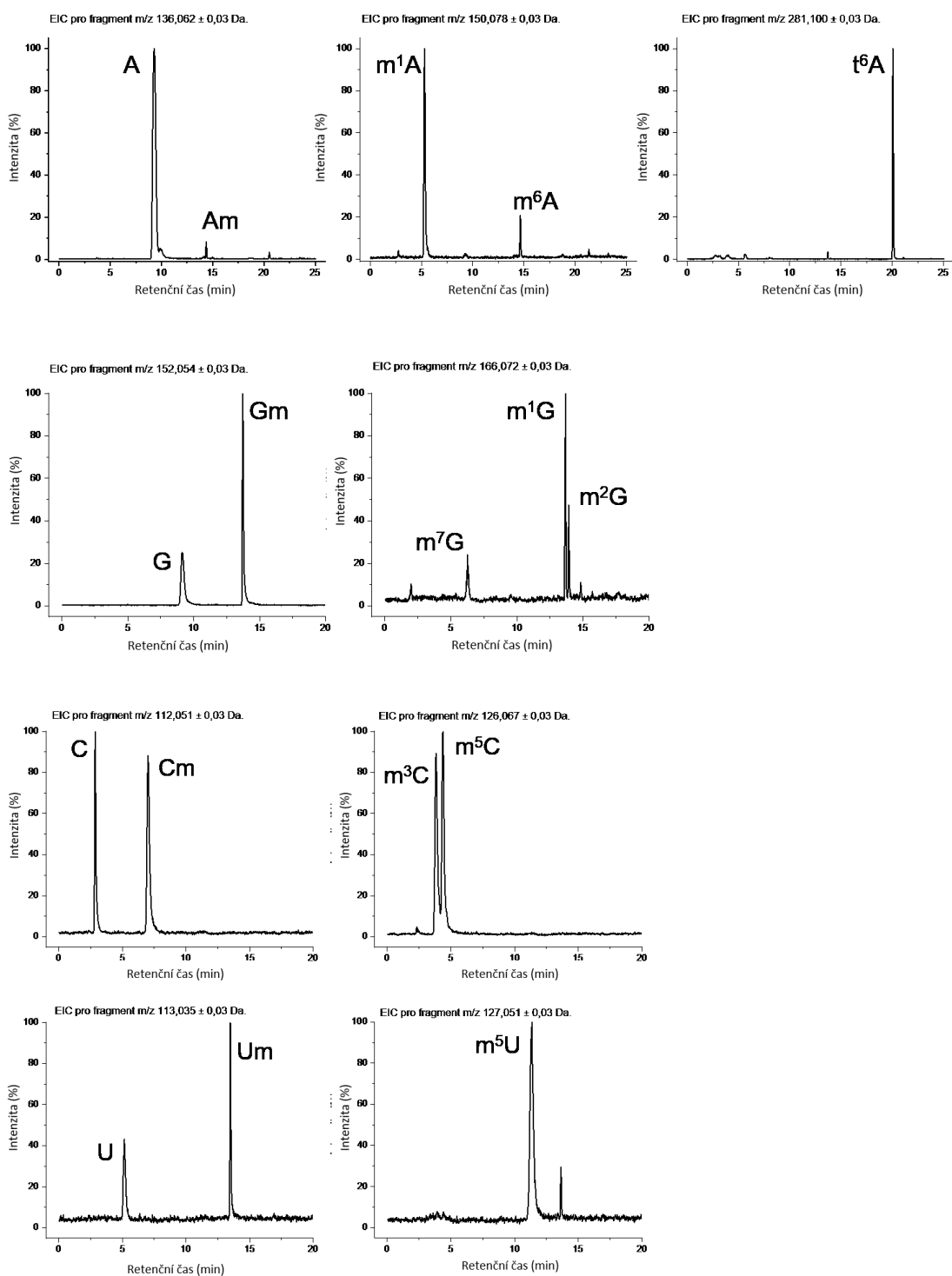
Obr. DI7: Snímek z cryo-EM přečištěných SBV (A) a DWV (B) virových partikulí po působení DNázy a RNázy a před izolací RNA. Menší částice jsou pentamery kapsidových proteinů původem z prasklých obalů. Měřítko 100 nm. (Fotografie byly pořízeny v laboratoři Strukturní virologie, CEITEC, Brno.)

Tab. DI3: Seznam modifikací, které byly hledány v chromatogramu štěpené RNA z pikornavirů.

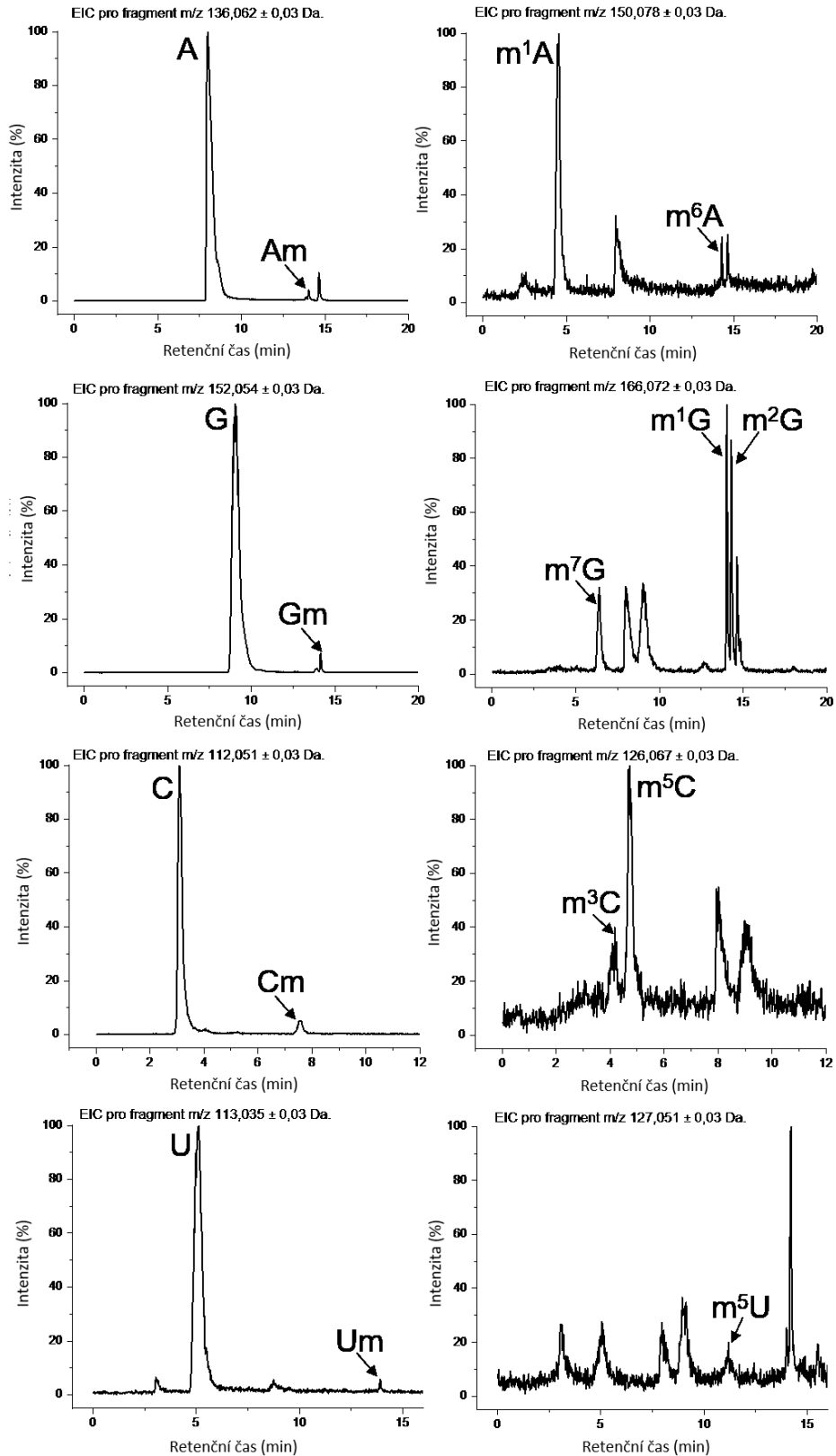
Název modifikace	Zkratka	Struktura fragmentu	Přesná hmota fragmentu	Detekovaná hmota [X+H] ⁺	Retenční čas
Adenosin	A		135,054	136,062	8,2 min
2'-O-methyladenosin	Am		135,054	136,062	13,3 min
1-methyladenosin	m ¹ A		149,070	150,078	4,3 min

<i>N</i> ⁶ -methyladenosin	m ⁶ A		149,070	150,078	13,6 min
<i>N</i> ⁶ -threonylcarbamoyladenosin	t ⁶ A		279,121	280,128	20,3 min
Guanosin	G		151,049	152,057	9,1 min
2'- <i>O</i> -methylguanosin	Gm		151,049	152,057	13,8 min
1-methylguanosin	m ¹ G		165,065	166,072	13,6 min
<i>N</i> ² -methylguanosin	m ² G		165,065	166,072	13,8 min
7-methylguanosin	m ⁷ G		166,072	166,072	5,9 min
Cytidin	C		111,043	112,051	2,9 min
2'- <i>O</i> -methylcytidin	Cm		111,043	112,051	6,7 min
3-methylcytidin	m ³ C		125,059	126,067	3,9 min
5-methylcytidin	m ⁵ C		125,059	126,067	4,4 min
Uridin	U		112,027	113,035	5,0 min

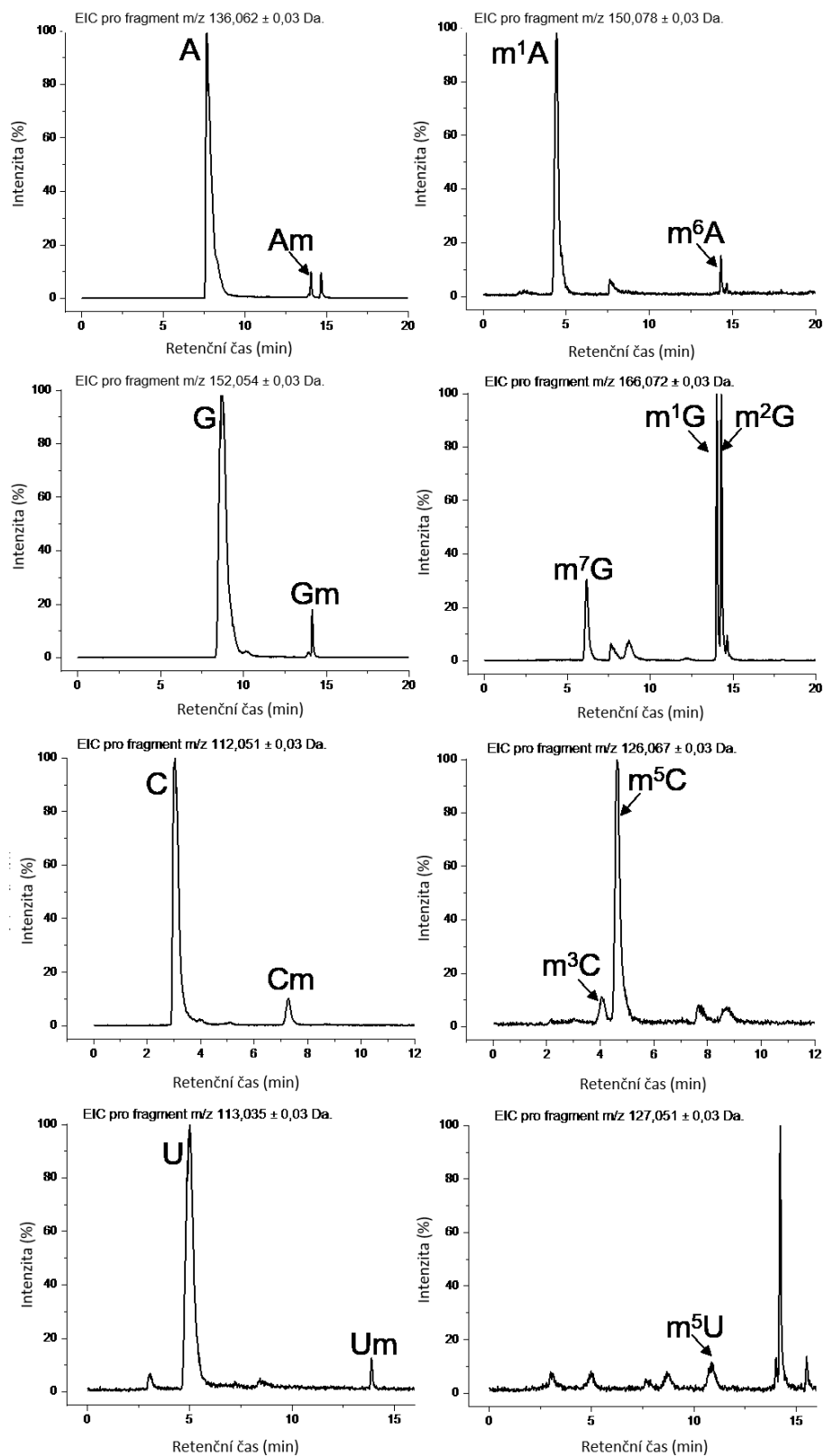
2'- <i>O</i> -methyluridin	Um		112,027	113,035	13,5 min
5-methyluridin	m ⁵ U		126,043	127,051	11,4 min



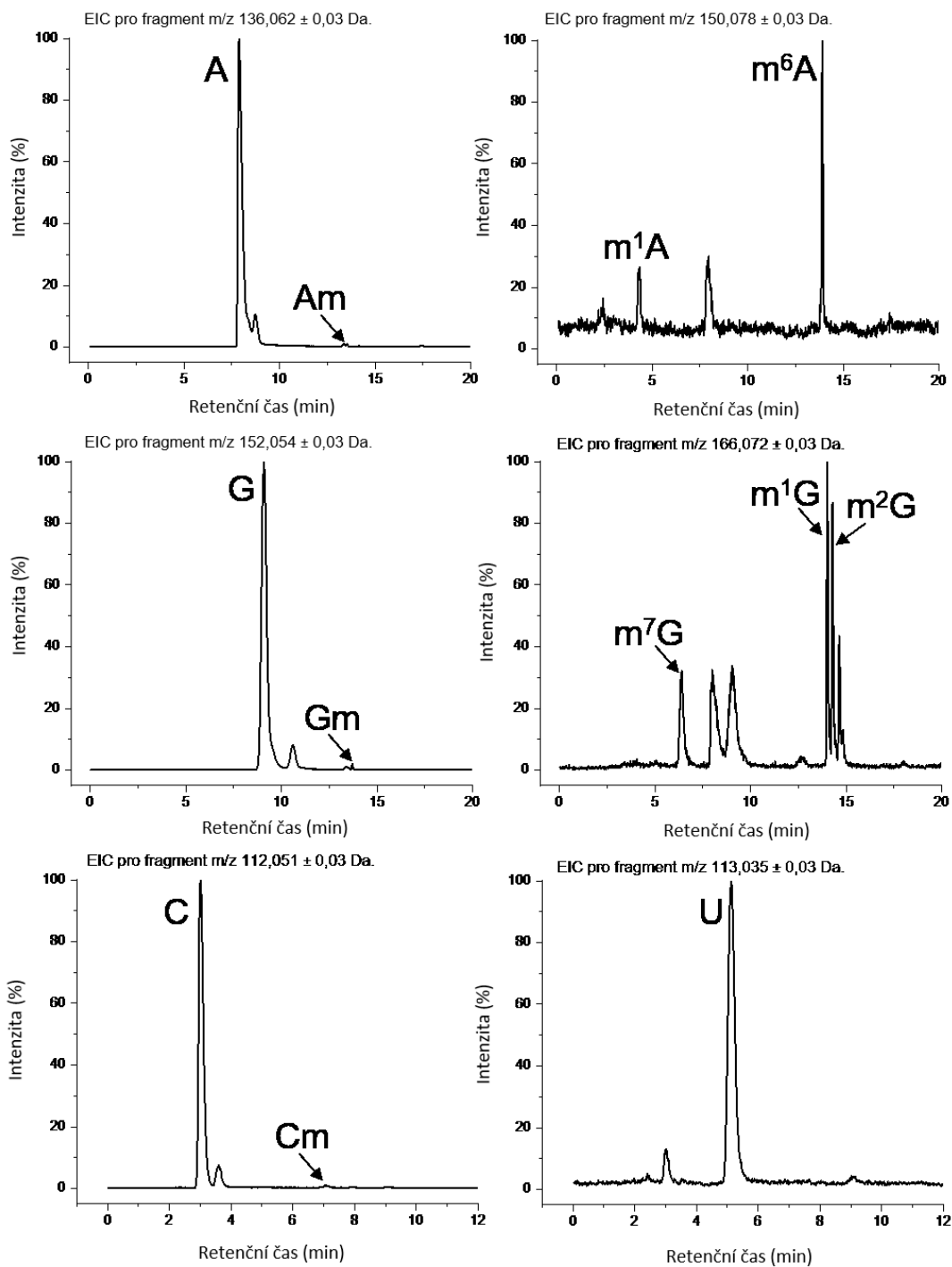
Obr. D18: Extrahované chromatogramy (EIC) pro standardy modifikovaných nukleosidů.



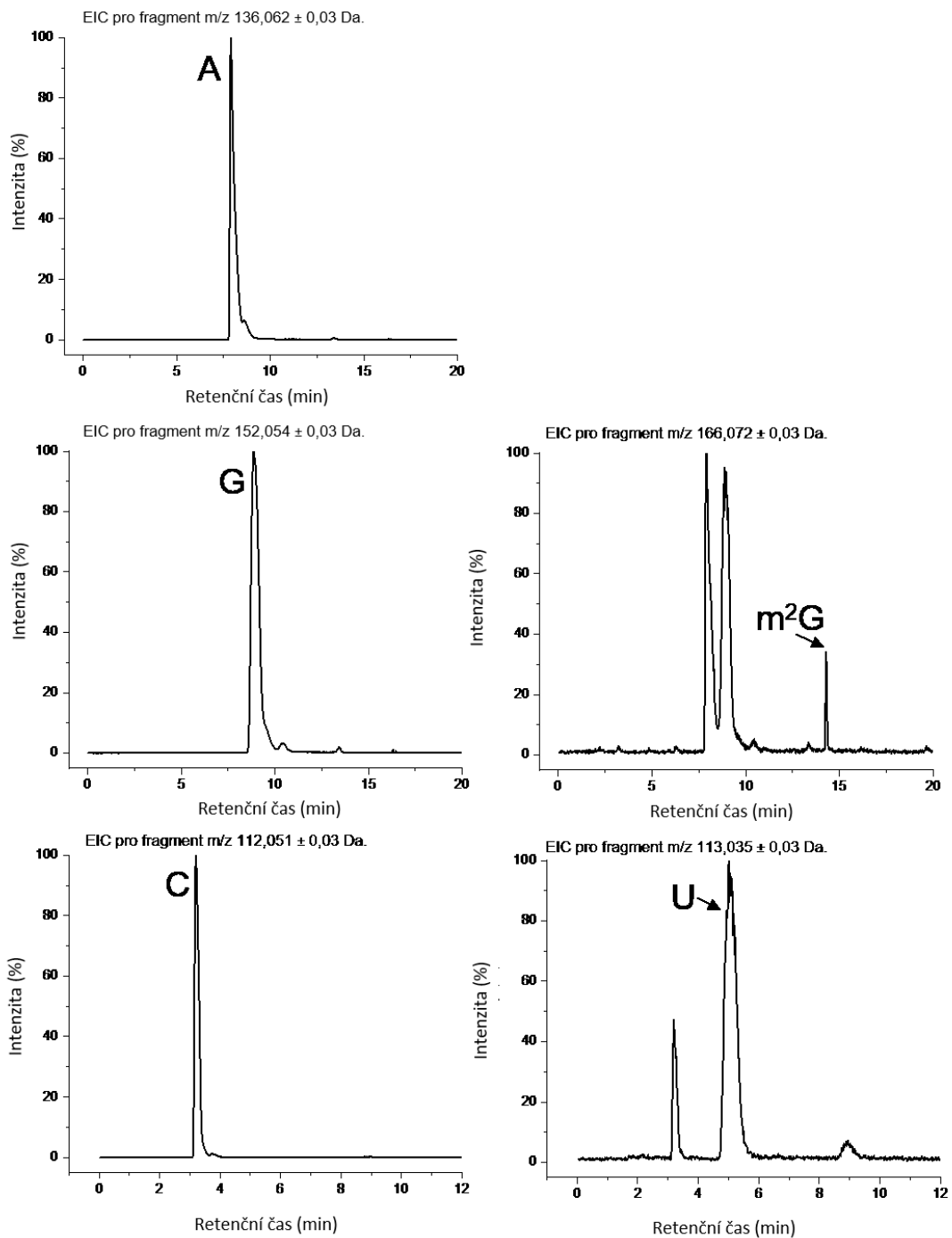
Obr. D19: Extrahované chromatogramy (EIC) pro detekované nukleosidy v RNA z SBV.



Obr. D110: Extrahované chromatogramy (EIC) pro detekované nukleosidy v RNA z DWV.



Obr. D111: Extrahované chromatogramy (EIC) pro detekované nukleosidy v RNA z hRV2.



Obr. DI12: Extrahované chromatogramy (EIC) pro detekované nukleosidy v RNA z E18.

Tab. DI4: Seznam přibalených tRNA potvrzených bisulfitovým sekvenováním pro SBV (A) a DWV (B).

A)	SBV	C pozice	% četnosti čtení bez konverze na U v této pozici	B)	DWV	C pozice	% četnosti čtení bez konverze na U v této pozici
	přibalené tRNA				přibalené tRNA		
	Ala AGC	49	100%		Ala AGC	49	100%
	Ala TGC	49	97%		Ala TGC	49	97%
	Asp GTC	48	33%		Asp GTC	37	100%
	Glu CTC	49	95%			48	33%
	Glu TTC	49	98%			49	50%
	Gly TCC	49	100%		Glu CTC	49	98%
		50	100%		Glu TTC	49	97%
	His GTG	48	75%		Gly GCC	47	100%
		49	77%		Gly TCC	49	100%
	Val CAC	49	100%		His GTG	48	96%
					Lys TTT	49	50%
						50	50%
						48	100%
					Pro AGG	48	100%
						49	66%
					Pro CGG	48	100%
						49	92%
					ProTGG	48	100%
						49	100%
					Thr AGT	49	100%
					Thr CGT	47	100%
					Val AAC	49	87%
					Val CAC	49	100%

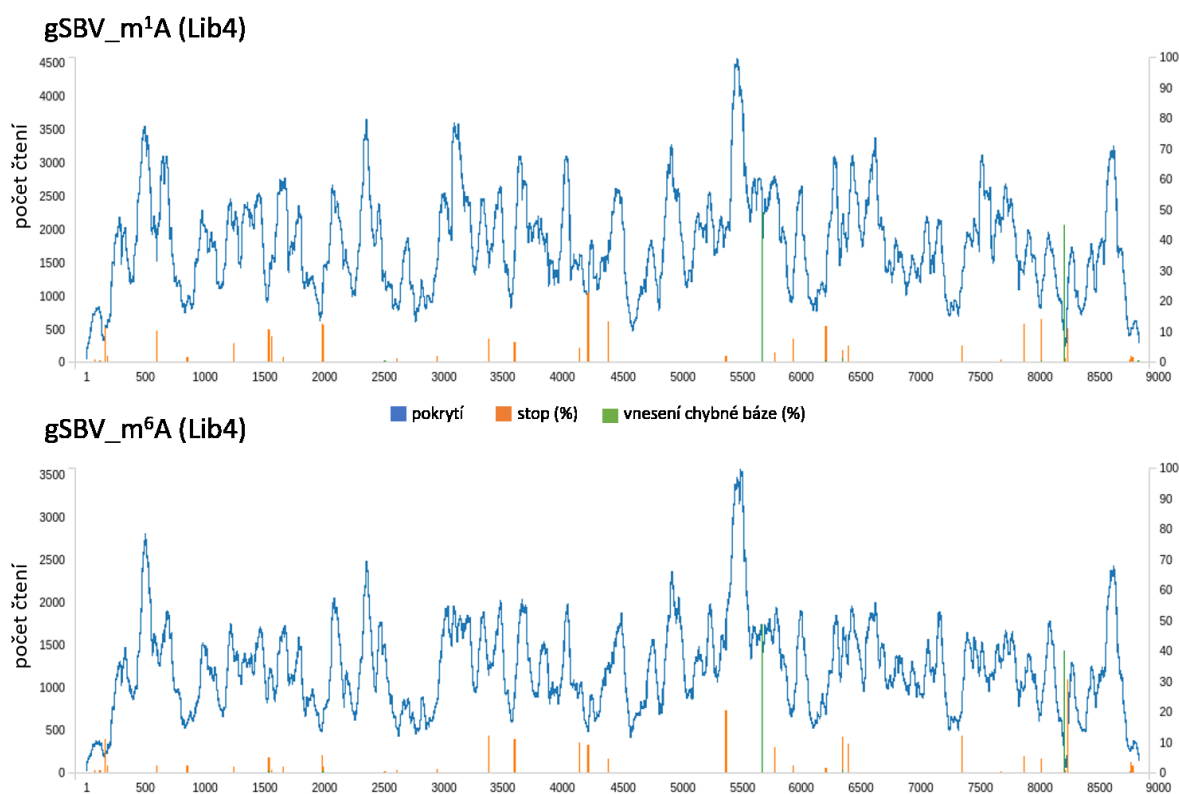
Tab. DI5: Detekované pozice m⁵C v genomové SBV (A) a DWV (B) po bisulfitovém sekvenování.

A)				B)	
C pozice	% četnosti čtení bez konverze na U v této pozici	C pozice	% četnosti čtení bez konverze na U v této pozici	C pozice	% četnosti čtení bez konverze na U v této pozici
90	5,5	4557	6,7	321	6,5
1080	5	4676	5,9	1073	16,7
1142	7,5	4684	5,3	1096	7,4
1663	5,6	4801	5,4	1113	5,9
1685	5,1	4813	6,5	1170	5,1
1949	5,1	5008	5,4	4512	7,4
1956	7,6	5744	7	5874	6,7
1973	5,8	6114	5,1	7055	9,1
2031	5,1	6461	5,3	7541	5,5
2154	5,2	6648	5,7	9009	5,1
2316	7,1	6741	5,2		
2633	9,1	6843	7,2		
2700	10,4	7233	6,6		
2768	5,2	7240	5,3		
2783	6,3	7437	5,9		
3285	6,1	7439	5,9		
3729	5,7	7469	5,1		
3993	6	7513	7,2		
4077	6,3	7811	5,1		
4207	8,7	8142	6,2		
4209	9,1	8378	11,1		
4278	6,2	8491	5,1		
4509	5,8	8671	5,4		
4554	5,9	8772	5,8		

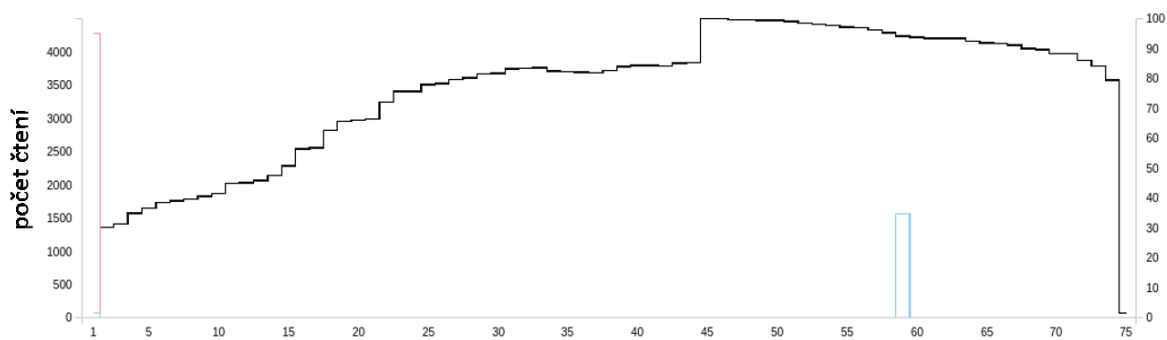
Tab. DI6: Přítomnost typických eukaryotických tRNA modifikací v analyzované RNA z virových partikulí pikornavirů.

	Délka gRNA (nt)	$t^6A/100A$	$mS^2t^6A/100A$	$i^6A/100A$
SBV	8832	$0,02 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,004$	$0,00 \pm 0,004$
DWV	10071	$0,16 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,004$	$0,03 \pm 0,04$
RV2	7120	0	0	0
E18	7410	0	0	0

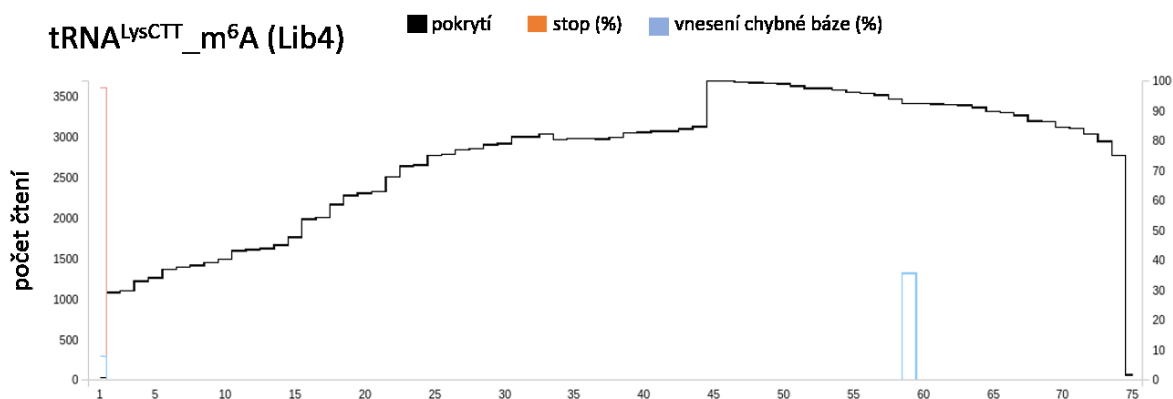
Obr. DI13: Výsledky bioinformatické analýzy sekvenačních knihoven mapujících m^1A v SBV virové partikuli (vybraná data, více viz (Šimonová, Romanská et al. 2022) a <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home> pod projektovým číslem PRJEB53666). Grafy znázorňují neupravené vzorky (m^1A) a vzorky po působení alkalického prostředí (konverze na m^6A).



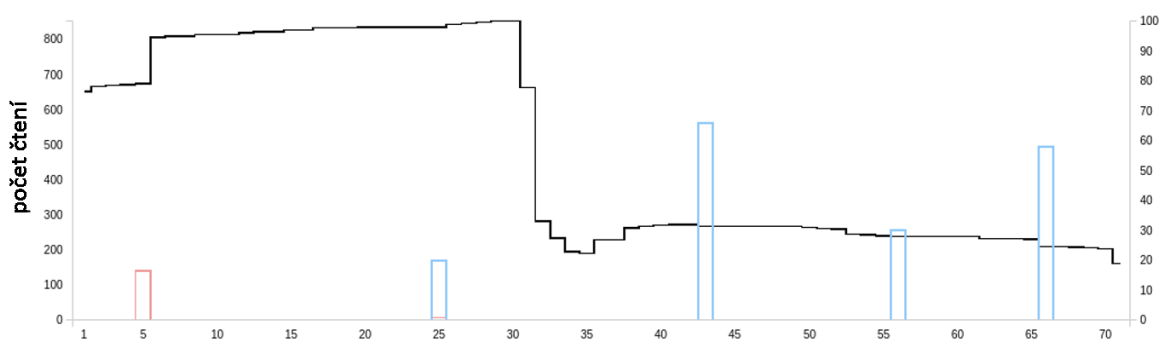
tRNA^{LysCTT}_m¹A (Lib4)



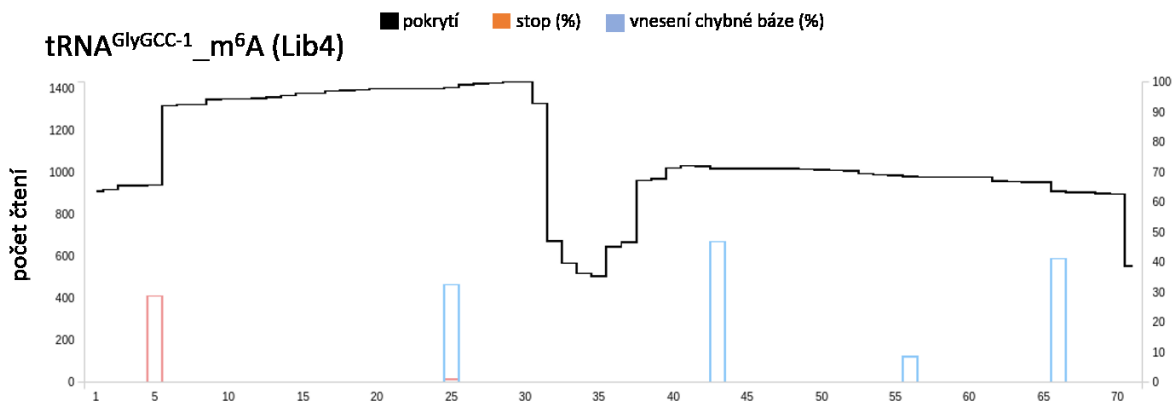
tRNA^{LysCTT}_m⁶A (Lib4)



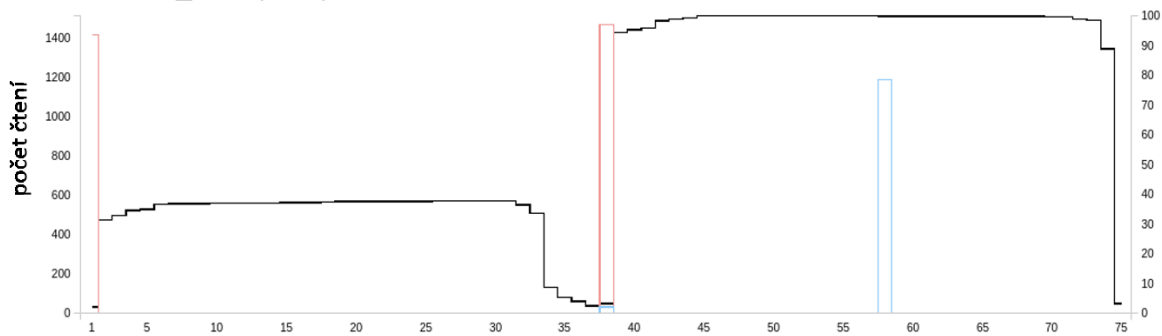
tRNA^{GlyGCC-1}_m¹A (Lib4)



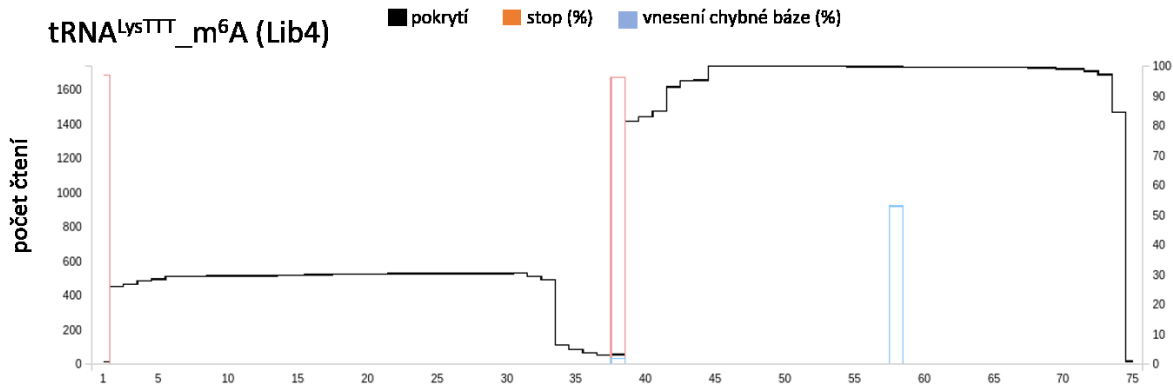
tRNA^{GlyGCC-1}_m⁶A (Lib4)



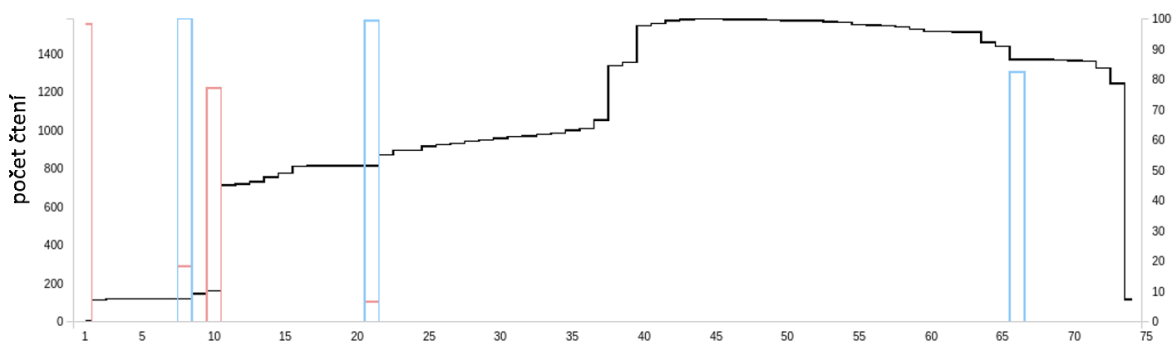
tRNA^{LysTTT}_m¹A (Lib4)



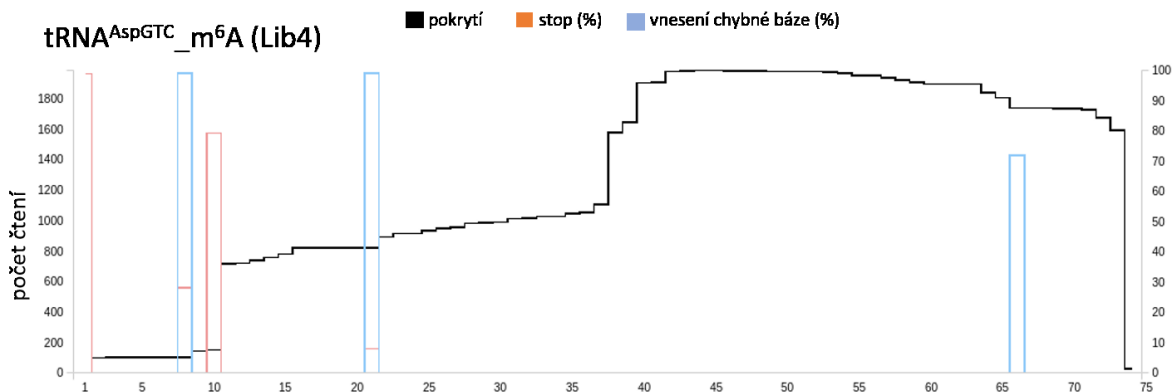
tRNA^{LysTTT}_m⁶A (Lib4)



tRNA^{AspGTC}_m¹A (Lib4)



tRNA^{AspGTC}_m⁶A (Lib4)



POUŽITÁ LITERATURA

- Adachi, H., M. D. De Zoysa and Y.-T. Yu (2019). "Post-transcriptional pseudouridylation in mRNA as well as in some major types of noncoding RNAs." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms **1862**(3): 230-239.
- Agol, V. I. and A. P. Gmyl (2018). "Emergency services of viral RNAs: repair and remodeling." Microbiology and Molecular Biology Reviews **82**(2).
- Aubert, M., M.-F. O'Donohue, S. Lebaron and P.-E. Gleizes (2018). "Pre-ribosomal RNA processing in human cells: from mechanisms to congenital diseases." Biomolecules **8**(4): 123.
- Baltimore, D. (1971). "Expression of animal virus genomes." Bacteriological reviews **35**(3): 235.
- Banoub, J. H. and P. A. Limbach (2009). Mass spectrometry of nucleosides and nucleic acids, CRC Press.
- Barré-Sinoussi, F., J.-C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun and C. Rouzioux (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-871.
- 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 tRNA^{Lys3} anticodon bound to the HIV genome is stabilized by modified nucleosides and adjacent mismatch base pairs." Nucleic acids research **37**(10): 3342-3353.
- Bilyard, M. K., S. Becker and S. Balasubramanian (2020). "Natural, modified DNA bases." Current opinion in chemical biology **57**: 1-7.
- Bird, J. G., Y. Zhang, Y. Tian, N. Panova, I. Barvík, L. Greene, M. Liu, B. Buckley, L. Krásný and J. K. Lee (2016). "The mechanism of RNA 5' capping with NAD⁺, NADH and desphospho-CoA." Nature **535**(7612): 444-447.
- Birkedal, U., M. Christensen-Dalsgaard, N. Krogh, R. Sabarinathan, J. Gorodkin and H. Nielsen (2015). "Profiling of ribose methylations in RNA by high-throughput sequencing." Angewandte Chemie **127**(2): 461-465.
- Blanco, G. and A. Blanco (2017). Medical biochemistry, Academic Press.
- Boccalletto, 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.
- Boccalletto, 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.
- Bradrick, S. S. (2017). "Causes and consequences of flavivirus RNA methylation." Frontiers in microbiology **8**: 2374.
- Broche, J., A. R. Köhler, F. Kühnel, B. Osteresch, T. T. Chandrasekaran, S. Adam, J. Brockmeyer and A. Jeltsch (2023). "Genome-wide deposition of 6-methyladenine in human DNA reduces the viability of HEK293 cells and directly influences gene expression." Communications Biology **6**(1): 138.
- 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.

Buchta, D., T. Füzik, D. Hrebík, Y. Levdansky, L. Sukeník, L. Mukhamedova, J. Moravcová, R. Vácha and P. Plevka (2019). "Enterovirus particles expel capsid pentamers to enable genome release." *Nature communications* **10**(1): 1-9.

Cahová, H., M.-L. Winz, K. Höfer, G. Nübel and A. Jäschke (2015). "NAD captureSeq indicates NAD as a bacterial cap for a subset of regulatory RNAs." *Nature* **519**(7543): 374-377.

Carlile, T. M., M. F. Rojas-Duran, B. Zinshteyn, H. Shin, K. M. Bartoli and W. V. Gilbert (2014). "Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells." *Nature* **515**(7525): 143-146.

Caskey, M., F. Klein and M. C. Nussenzweig (2019). "Broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibodies in the clinic." *Nature medicine* **25**(4): 547-553.

Cattenoz, P. B., R. J. Taft, E. Westhof and J. S. Mattick (2013). "Transcriptome-wide identification of A>I RNA editing sites by inosine specific cleavage." *Rna* **19**(2): 257-270.

Charette, M. and M. W. Gray (2000). "Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why." *IUBMB life* **49**(5): 341-351.

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.

Chen, B. (2019). "Molecular mechanism of HIV-1 entry." *Trends in microbiology* **27**(10): 878-891.

Chen, K., Z. Lu, X. Wang, Y. Fu, G. Z. Luo, N. Liu, D. Han, D. Dominissini, Q. Dai and T. Pan (2015). "High-resolution N6-methyladenosine (m6A) map using photo-crosslinking-assisted m6A sequencing." *Angewandte Chemie* **127**(5): 1607-1610.

Chen, X., T. Ji, J. Guo, W. Wang, W. Xu and Z. Xie (2019). "Molecular epidemiology of echovirus 18 circulating in mainland China from 2015 to 2016." *Virologica Sinica* **34**(1): 50-58.

Chen, X., J. Li, J. Guo, W. Xu, S. Sun and Z. Xie (2017). "An outbreak of echovirus 18 encephalitis/meningitis in children in Hebei Province, China, 2015." *Emerging microbes & infections* **6**(1): 1-3.

Chen, Y. G., W. E. Kowtoniuk, I. Agarwal, Y. Shen and D. R. Liu (2009). "LC/MS analysis of cellular RNA reveals NAD-linked RNA." *Nature chemical biology* **5**(12): 879-881.

Cihlar, T. and M. Fordyce (2016). "Current status and prospects of HIV treatment." *Current opinion in virology* **18**: 50-56.

Cohn, W. E. (1959). "5-Ribosyl uracil, a carbon-carbon ribofuranosyl nucleoside in ribonucleic acids." *Biochimica et biophysica acta* **32**: 569-571.

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.

Dai, Q., S. Moshitch-Moshkovitz, D. Han, N. Kol, N. Amariglio, G. Rechavi, D. Dominissini and C. He (2017). "Nm-seq maps 2'-O-methylation sites in human mRNA with base precision." *Nature methods* **14**(7): 695-698.

Dai, Q., S. Moshitch-Moshkovitz, D. Han, N. Kol, N. Amariglio, G. Rechavi, D. Dominissini and C. He (2018). "Correction: corrigendum: Nm-seq maps 2'-O-methylation sites in human mRNA with base precision." *Nature Methods* **15**(3): 226-227.

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.

Decroly, E., F. Ferron, J. Lescar and B. Canard (2012). "Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA." Nature Reviews Microbiology **10**(1): 51-65.

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.

Desrosiers, R., K. Friderici and F. Rottman (1974). "Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **71**(10): 3971-3975.

Dominissini, D., S. Moshitch-Moshkovitz, M. Salmon-Divon, N. Amariglio and G. Rechavi (2013). "Transcriptome-wide mapping of N 6-methyladenosine by m 6 A-seq based on immunocapturing and massively parallel sequencing." Nature protocols **8**(1): 176-189.

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.

Duette, G., B. Hiener, H. Morgan, F. G. Mazur, V. Mathivanan, B. A. Horsburgh, K. Fisher, O. Tong, E. Lee and H. Ahn (2022). "The HIV-1 proviral landscape reveals that Nef contributes to HIV-1 persistence in effector memory CD4+ T cells." The Journal of Clinical Investigation **132**(7).

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 5 C within archaeal mRNAs." PLoS Genet **9**(6): e1003602.

Elliott, D. and M. Ladomery (2017). Molecular biology of RNA, Oxford University Press.

Eyler, D. E., M. K. Franco, Z. Batool, M. Z. Wu, M. L. Dubuke, M. Dobosz-Bartoszek, J. D. Jones, Y. S. Polikanov, B. Roy and K. S. Koutmou (2019). "Pseudouridylation of mRNA coding sequences alters translation." Proceedings of the National Academy of Sciences **116**(46): 23068-23074.

Fabryova, H. and K. Strebel (2019). "Vpr and its cellular interaction partners: R we there yet?" Cells **8**(11): 1310.

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).

Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl and S. Zolla-Pazner (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 865-867.

Gandy, S. Z., S. D. Linnstaedt, S. Muralidhar, K. A. Cashman, L. J. Rosenthal and J. L. Casey (2007). "RNA editing of the human herpesvirus 8 kaposin transcript eliminates its transforming activity and is induced during lytic replication." Journal of virology **81**(24): 13544-13551.

Galalde, D. R., E. A. Snell, D. Jachimowicz, B. Sipos, J. H. Lloyd, M. Bruce, N. Pantic, T. Admassu, P. James and A. Warland (2018). "Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores." Nature methods **15**(3): 201.

Garcia-Campos, M. A., S. Edelheit, U. Toth, M. Safra, R. Shachar, S. Viukov, R. Winkler, R. Nir, L. Lasman and A. Brandis (2019). "Deciphering the "m6A code" via antibody-independent quantitative profiling." Cell **178**(3): 731-747. e716.

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.

Georgieva, I., A. Stoyanova, S. Angelova, S. Stoitzova, S. Voleva, N. Korsun and L. Nikolaeva-Glomb (2021). "DO WE KNOW RHINOVIRUSES AND THEIR CLINICAL IMPACT?" PROBLEMS of Infectious and Parasitic Diseases **49**(1): 5-12.

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.

Gokhale, N. S., A. B. McIntyre, M. J. McFadden, A. E. Roder, E. M. Kennedy, J. A. Gandara, S. E. Hopcraft, K. M. Quicke, C. Vazquez and J. Willer (2016). "N6-methyladenosine in Flaviviridae viral RNA genomes regulates infection." Cell host & microbe **20**(5): 654-665.

Graf, J., C. Hartmann, H. Lehmann, C. Otto, O. Adams, M. Karenfort, C. Schneider, K. Ruprecht, H. Bosse and S. Diedrich (2019). "Meningitis gone viral: Description of the Echovirus Wave 2013 in Germany."

Gray, M. W. and V. Gopalan (2020). "Piece by piece: building a ribozyme." Journal of Biological Chemistry **295**(8): 2313-2323.

Grosjean, H., G. Keith and L. Droogmans (2004). Detection and quantification of modified nucleotides in RNA using thin-layer chromatography. RNA Interference, Editing, and Modification, Springer: 357-391.

Grudzien-Nogalska, E., J. G. Bird, B. E. Nickels and M. Kiledjian (2018). "'NAD-capQ" detection and quantitation of NAD caps." Rna **24**(10): 1418-1425.

Gruell, H. and F. Klein (2018). "Antibody-mediated prevention and treatment of HIV-1 infection." Retrovirology **15**(1): 1-11.

Gupta, R. K., D. Peppas, A. L. Hill, C. Gálvez, M. Salgado, M. Pace, L. E. McCoy, S. A. Griffith, J. Thornhill and A. Alrubayyi (2020). "Evidence for HIV-1 cure after CCR5Δ32/Δ32 allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report." The Lancet HIV **7**(5): e340-e347.

Hafner, M., P. Landgraf, J. Ludwig, A. Rice, T. Ojo, C. Lin, D. Holoch, C. Lim and T. Tuschl (2008). "Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing." Methods **44**(1): 3-12.

Hall, R. H. (1964). "On the 2'-O-methylribonucleoside content of ribonucleic acids." Biochemistry **3**(7): 876-880.

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

Haruehanroengra, P., S. Vangaveti, S. V. Ranganathan, S. Mao, M. D. Su, A. A. Chen and J. Sheng (2020). "Terpene Chain Length Affects the Base Pairing Discrimination of S-geranyl-2-thiouridine in RNA Duplex." Isience **23**(12): 101866.

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-1-methyladenosine in RNA-Seq is sequence dependent." *Nucleic acids research* **43**(20): 9950-9964.

Haynes, B. F., K. Wiehe, P. Borrow, K. O. Saunders, B. Korber, K. Wagh, A. J. McMichael, G. Kelsoe, B. H. Hahn and F. Alt (2022). "Strategies for HIV-1 vaccines that induce broadly neutralizing antibodies." *Nature Reviews Immunology*: 1-17.

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.

Hu, H., N. Flynn, H. Zhang, C. You, R. Hang, X. Wang, H. Zhong, Z. Chan, Y. Xia and X. Chen (2021). "SPAAC-NAD-seq, a sensitive and accurate method to profile NAD⁺-capped transcripts." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**(13): e2025595118.

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.

Hudeček, O., R. Benoni, P. E. Reyes-Gutierrez, M. Culka, H. Šanderová, M. Hubálek, L. Rulíšek, J. Cvačka, L. Krásný and H. Cahová (2020). "Dinucleoside polyphosphates act as 5'-RNA caps in bacteria." *Nature Communications* **11**(1): 1052.

Hundley, H. A. and B. L. Bass (2010). "ADAR editing in double-stranded UTRs and other noncoding RNA sequences." *Trends in biochemical sciences* **35**(7): 377-383.

Jacobs, S. E., D. M. Lamson, K. S. George and T. J. Walsh (2013). "Human rhinoviruses." *Clinical microbiology reviews* **26**(1): 135-162.

Jartti, T. and J. E. Gern (2017). "Role of viral infections in the development and exacerbation of asthma in children." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **140**(4): 895-906.

Jayan, G. C. and J. L. Casey (2002). "Inhibition of hepatitis delta virus RNA editing by short inhibitory RNA-mediated knockdown of ADAR1 but not ADAR2 expression." *Journal of virology* **76**(23): 12399-12404.

Jensen, B.-E. O., E. Knops, L. Cords, N. Lübke, M. Salgado, K. Busman-Sahay, J. D. Estes, L. E. Huyveneers, F. Perdomo-Celis and M. Wittner (2023). "In-depth virological and immunological characterization of HIV-1 cure after CCR5Δ32/Δ32 allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Nature Medicine*: 1-5.

Jia, G., Y. Fu, X. Zhao, Q. Dai, G. Zheng, Y. Yang, C. Yi, T. Lindahl, T. Pan and Y.-G. Yang (2011). "N⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO." *Nature chemical biology* **7**(12): 885-887.

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.

Jones, J. W. and R. K. Robins (1963). "Purine nucleosides. III. Methylation studies of certain naturally occurring purine nucleosides." *Journal of the American Chemical Society* **85**(2): 193-201.

Julius, C. and Y. Yuzenkova (2017). "Bacterial RNA polymerase caps RNA with various cofactors and cell wall precursors." *Nucleic Acids Research* **45**(14): 8282-8290.

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

Karijovich, J. and Y.-T. Yu (2011). "Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation." *Nature* **474**(7351): 395-398.

Kennedy, E. M., H. P. Bogerd, A. V. Kornepati, D. Kang, D. Ghoshal, J. B. Marshall, B. C. Poling, K. Tsai, N. S. Gokhale and S. M. Horner (2016). "Posttranscriptional m⁶A editing of HIV-1 mRNAs enhances viral gene expression." *Cell host & microbe* **19**(5): 675-685.

Khan, N. and J. D. Geiger (2021). "Role of viral protein U (Vpu) in HIV-1 infection and pathogenesis." *Viruses* **13**(8): 1466.

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

Khoddami, V., A. Yerra, T. L. Mosbrugger, A. M. Fleming, C. J. Burrows and B. R. Cairns (2019). "Transcriptome-wide profiling of multiple RNA modifications simultaneously at single-base resolution." Proceedings of the National Academy of Sciences **116**(14): 6784-6789.

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.

King, A. M., M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz (2012). "Virus taxonomy." Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: 486-487.

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.

Klinge, S. and J. L. Woolford Jr (2019). "Ribosome assembly coming into focus." Nature reviews Molecular cell biology **20**(2): 116-131.

Koonin, E. V. and B. Moss (2010). "Viruses know more than one way to don a cap." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(8): 3283-3284.

Kowtoniuk, W. E., Y. Shen, J. M. Heemstra, I. Agarwal and D. R. Liu (2009). "A chemical screen for biological small molecule-RNA conjugates reveals CoA-linked RNA." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(19): 7768-7773.

Kumar, S., V. Chinnusamy and T. Mohapatra (2018). "Epigenetics of modified DNA bases: 5-methylcytosine and beyond." Frontiers in genetics **9**: 640.

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.

Lauman, R. and B. A. Garcia (2020). "Unraveling the RNA modification code with mass spectrometry." Molecular omics **16**(4): 305-315.

Leger, A., P. P. Amaral, L. Pandolfini, C. Capitanchik, F. Capraro, I. Barbieri, V. Migliori, N. M. Luscombe, A. J. Enright and K. Tzelepis (2019). "RNA modifications detection by comparative Nanopore direct RNA sequencing." BioRxiv: 843136.

Leggat, D. J., K. W. Cohen, J. R. Willis, W. J. Fulp, A. C. deCamp, O. Kalyuzhniy, C. A. Cottrell, S. Menis, G. Finak and L. Ballweber-Fleming (2022). "Vaccination induces HIV broadly neutralizing antibody precursors in humans." Science **378**(6623): eadd6502.

Levanon, E. Y., E. Eisenberg, R. Yelin, S. Nemzer, M. Hallegger, R. Shemesh, Z. Y. Fligelman, A. Shoshan, S. R. Pollock and D. Sztybel (2004). "Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome." Nature biotechnology **22**(8): 1001-1005.

Li, S.-H., H. Dong, X.-F. Li, X. Xie, H. Zhao, Y.-Q. Deng, X.-Y. Wang, Q. Ye, S.-Y. Zhu and H.-J. Wang (2013). "Rational design of a flavivirus vaccine by abolishing viral RNA 2'-O methylation." Journal of virology **87**(10): 5812-5819.

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 N¹-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.

Li, X., P. Zhu, S. Ma, J. Song, J. Bai, F. Sun and C. Yi (2015). "Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome." Nature chemical biology **11**(8): 592-597.

Liao, J.-y., S. A. Thakur, Z. B. Zalinger, K. E. Gerrish and F. Imani (2011). "Inosine-containing RNA is a novel innate immune recognition element and reduces RSV infection." *PLoS One* **6**(10): e26463.

Lichinchi, G., S. Gao, Y. Saletore, G. M. Gonzalez, V. Bansal, Y. Wang, C. E. Mason and T. M. Rana (2016). "Dynamics of the human and viral m⁶A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells." *Nature microbiology* **1**(4): 1-9.

Lichinchi, G., B. S. Zhao, Y. Wu, Z. Lu, Y. Qin, C. He and T. M. Rana (2016). "Dynamics of human and viral RNA methylation during Zika virus infection." *Cell host & microbe* **20**(5): 666-673.

Licht, K., M. Hartl, F. Amman, D. Anrather, M. P. Janisiw and M. F. Jantsch (2019). "Inosine induces context-dependent recoding and translational stalling." *Nucleic acids research* **47**(1): 3-14.

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.

Liu, J., Y. Yue, D. Han, X. Wang, Y. Fu, L. Zhang, G. Jia, M. Yu, Z. Lu and X. Deng (2014). "A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation." *Nature chemical biology* **10**(2): 93-95.

Liu, N., M. Parisien, Q. Dai, G. Zheng, C. He and T. Pan (2013). "Probing N⁶-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA." *Rna* **19**(12): 1848-1856.

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

Lovejoy, A. F., D. P. Riordan and P. O. Brown (2014). "Transcriptome-wide mapping of pseudouridines: pseudouridine synthases modify specific mRNAs in *S. cerevisiae*." *PLoS one* **9**(10): e110799.

Lu, W., N. Tirumuru, C. S. Gelais, P. C. Koneru, C. Liu, M. Kvaratskhelia, C. He and L. Wu (2018). "N⁶-Methyladenosine-binding proteins suppress HIV-1 infectivity and viral production." *Journal of Biological Chemistry* **293**(34): 12992-13005.

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

Martin, S. J. and L. E. Brettell (2019). "Deformed wing virus in honeybees and other insects." *Annual review of virology* **6**: 49-69.

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.

Mauer, J., X. Luo, A. Blanjoie, X. Jiao, A. V. Grozhik, D. P. Patil, B. Linder, B. F. Pickering, J.-J. Vasseur and Q. Chen (2017). "Reversible methylation of m⁶A in the 5' cap controls mRNA stability." *Nature* **541**(7637): 371-375.

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.

Menachery, V. D., B. L. Yount, L. Josset, L. E. Gralinski, T. Scobey, S. Agnihothram, M. G. Katze and R. S. Baric (2014). "Attenuation and restoration of severe acute respiratory syndrome coronavirus mutant lacking 2'-O-methyltransferase activity." *Journal of virology* **88**(8): 4251-4264.

Meyer, K. D. (2019). "DART-seq: an antibody-free method for global m⁶A detection." *Nature methods* **16**(12): 1275-1280.

Meyer, K. D. and S. R. Jaffrey (2014). "The dynamic epitranscriptome: N⁶-methyladenosine and gene expression control." *Nature reviews Molecular cell biology* **15**(5): 313-326.

Meyer, K. D., Y. Saletore, P. Zumbo, O. Elemento, C. E. Mason and S. R. Jaffrey (2012). "Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons." *Cell* **149**(7): 1635-1646.

Morris, K. V. and J. S. Mattick (2014). "The rise of regulatory RNA." *Nature Reviews Genetics* **15**(6): 423-437.

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.

Motorin, Y., S. Muller, I. Behm-Ansmant and C. Branlant (2007). "Identification of modified residues in RNAs by reverse transcription-based methods." *Methods in enzymology* **425**: 21-53.

Nakamoto, M. A., A. F. Lovejoy, A. M. Cygan and J. C. Boothroyd (2017). "mRNA pseudouridylation affects RNA metabolism in the parasite *Toxoplasma gondii*." *Rna* **23**(12): 1834-1849.

Narayanan, A., S. Iordanskiy, R. Das, R. Van Duyne, 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.

Nie, Y., G. L. Hammond and J.-H. Yang (2007). "Double-stranded RNA deaminase ADAR1 increases host susceptibility to virus infection." *Journal of virology* **81**(2): 917-923.

Nishikura, K. (2010). "Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases." *Annual review of biochemistry* **79**: 321-349.

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.

Okada, S., M. Sakurai, H. Ueda and T. Suzuki (2015). Biochemical and transcriptome-wide identification of A-to-I RNA editing sites by ICE-Seq. *Methods in Enzymology*, Elsevier. **560**: 331-353.

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.

Pai, S., J. Mudgal, B. V. Kamath and K. S. R. Pai (2021). "An insight on promising strategies hoping to cure HIV-1 infection by targeting Rev protein—short review." *Pharmacological Reports*: 1-8.

Pardi, N., M. J. Hogan, F. W. Porter and D. Weissman (2018). "mRNA vaccines—a new era in vaccinology." *Nature reviews Drug discovery* **17**(4): 261-279.

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

Perrochia, L., D. Guetta, A. Hecker, P. Forterre and T. Basta (2013). "Functional assignment of KEOPS/EKC complex subunits in the biosynthesis of the universal t⁶A tRNA modification." *Nucleic acids research* **41**(20): 9484-9499.

Peterson, C. W. and H.-P. Kiem (2019). "Lessons from London and Berlin: designing a scalable gene therapy approach for HIV cure." *Cell Stem Cell* **24**(5): 685-687.

Peterson, C. W., J. Wang, C. Deleage, S. Reddy, J. Kaur, P. Polacino, A. Reik, M.-L. Huang, K. R. Jerome and S.-L. Hu (2018). "Differential impact of transplantation on peripheral and tissue-associated viral reservoirs: Implications for HIV gene therapy." *PLoS pathogens* **14**(4): e1006956.

Picard-Jean, F., C. Brand, M. Tremblay-Létourneau, A. Allaire, M. C. Beaudoin, S. Boudreault, C. Duval, J. Rainville-Sirois, F. Robert and J. Pelletier (2018). "2'-O-methylation of the mRNA cap protects RNAs from decapping and degradation by DXO." *PLoS One* **13**(3): e0193804.

Ping, X.-L., B.-F. Sun, L. Wang, W. Xiao, X. Yang, W.-J. Wang, S. Adhikari, Y. Shi, Y. Lv and Y.-S. Chen (2014). "Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase." *Cell research* **24**(2): 177-189.

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).

Powell, M. K., K. Benková, P. Selinger, M. Dogoši, I. Kinkorová Luňáčková, H. Koutníková, J. Laštková, A. Roubíčková, Z. Špůrková and L. Laclová (2016). "Opportunistic infections in HIV-infected patients differ strongly in frequencies and spectra between patients with low CD4+ cell counts examined postmortem and compensated patients examined antemortem irrespective of the HAART era." *PLoS One* **11**(9): e0162704.

Procházková, M., T. Füzik, K. Škubník, J. Moravcová, Z. Ubiparip, A. Přidal and P. Plevka (2018). "Virion structure and genome delivery mechanism of sacbrood honeybee virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**(30): 7759-7764.

Proudfoot, N. J., A. Furger and M. J. Dye (2002). "Integrating mRNA processing with transcription." *Cell* **108**(4): 501-512.

Rafels-Ybern, À., A. G. Torres, N. Camacho, A. Herencia-Roperó, H. Roura Frigolé, T. F. Wulff, M. Raboteg, A. Bordons, X. Grau-Bove and I. Ruiz-Trillo (2019). "The expansion of inosine at the wobble position of tRNAs, and its role in the evolution of proteomes." *Molecular biology and evolution* **36**(4): 650-662.

Ramanathan, A., G. B. Robb and S.-H. Chan (2016). "mRNA capping: biological functions and applications." *Nucleic acids research* **44**(16): 7511-7526.

Ringear, M., V. Marchand, E. Decroly, Y. Motorin and Y. Bennasser (2019). "FTSJ3 is an RNA 2'-O-methyltransferase recruited by HIV to avoid innate immune sensing." *Nature* **565**(7740): 500-504.

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.

Rybicki, E. P. (2023). *Cann's Principles of Molecular Virology*, Academic Press.

Safra, M., A. Sas-Chen, R. Nir, R. Winkler, A. Nachshon, D. Bar-Yaacov, M. Erlacher, W. Rossmann, N. Stern-Ginossar and S. Schwartz (2017). "The m¹A landscape on cytosolic and mitochondrial mRNA at single-base resolution." *Nature* **551**(7679): 251-255.

Sakurai, M., T. Yano, H. Kawabata, H. Ueda and T. Suzuki (2010). "Inosine cyanoethylation identifies A-to-I RNA editing sites in the human transcriptome." *Nature chemical biology* **6**(10): 733-740.

Salamango, D. J. and R. S. Harris (2021). "Dual functionality of HIV-1 Vif in APOBEC3 counteraction and cell cycle arrest." *Frontiers in Microbiology* **11**: 622012.

Saletore, Y., K. Meyer, J. Korlach, I. D. Vilfan, S. Jaffrey and C. E. Mason (2012). "The birth of the Epitranscriptome: deciphering the function of RNA modifications." *Genome biology* **13**(10): 1-12.

Sanger, F., G. G. Brownlee and B. G. Barrell (1965). "A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides." *Journal of molecular biology* **13**(2): 373-374.

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.

Schwartz, S., D. A. Bernstein, M. R. Mumbach, M. Jovanovic, R. H. Herbst, B. X. León-Ricardo, J. M. Engreitz, M. Guttman, R. Satija and E. S. Lander (2014). "Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA." *Cell* **159**(1): 148-162.

Schwarz, T. S., S. J. Berkemer, S. H. Bernhart, M. Weiß, S. Ferreira-Cerca, P. F. Stadler and A. Marchfelder (2020). "Splicing endonuclease is an important player in rRNA and tRNA maturation in archaea." *Frontiers in microbiology* **11**: 594838.

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.

Sharp, P. M. and B. H. Hahn (2011). "Origins of HIV and the AIDS pandemic." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*: **1**(1).

Shi, H., X. Wang, Z. Lu, B. S. Zhao, H. Ma, P. J. Hsu, C. Liu and C. He (2017). "YTHDF3 facilitates translation and decay of N 6-methyladenosine-modified RNA." *Cell research* **27**(3): 315-328.

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.

Singh, A. K. and K. Das (2022). "Insights into HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) Inhibition and Drug Resistance from Thirty Years of Structural Studies." *Viruses* **14**(5): 1027.

Škubník, K., J. Nováček, T. Füzik, A. Přidal, R. J. Paxton and P. Plevka (2017). "Structure of deformed wing virus, a major honey bee pathogen." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**(12): 3210-3215.

Škubník, K., L. Sukeník, D. Buchta, T. Füzik, M. Procházková, J. Moravcová, L. Šmerdová, A. Přidal, R. Vácha and P. Plevka (2021). "Capsid opening enables genome release of iflaviruses." *Science Advances* **7**(1): eabd7130.

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.

Smietanski, M., M. Werner, E. Purta, K. H. Kaminska, J. Stepinski, E. Darzynkiewicz, M. Nowotny and J. M. Bujnicki (2014). "Structural analysis of human 2'-O-ribose methyltransferases involved in mRNA cap structure formation." *Nature communications* **5**(1): 1-10.

Sneller, M. C., J. Blazkova, J. S. Justement, V. Shi, B. D. Kennedy, K. Gittens, J. Tolstenko, G. McCormack, E. J. Whitehead and R. F. Schneck (2022). "Combination anti-HIV antibodies provide sustained virological suppression." *Nature* **606**(7913): 375-381.

Sood, A. J., C. Viner and M. M. Hoffman (2019). "DNAMod: the DNA modification database." *Journal of cheminformatics* **11**(1): 1-10.

Spector, C., A. R. Mele, B. Wigdahl and M. R. Nonnemacher (2019). "Genetic variation and function of the HIV-1 Tat protein." *Medical Microbiology and Immunology* **208**: 131-169.

Srinivasan, S., A. G. Torres and L. Ribas de Pouplana (2021). "Inosine in biology and disease." *Genes* **12**(4): 600.

Steege, D. A. (2000). "Emerging features of mRNA decay in bacteria." *Rna* **6**(8): 1079-1090.

Stobart, C. C., J. M. Nosek and M. L. Moore (2017). "Rhinovirus biology, antigenic diversity, and advancements in the design of a human rhinovirus vaccine." *Frontiers in microbiology* **8**: 2412.

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.

Sun, Y., Z. Miao, J. Yan, L. Gong, Y. Chen, Y. Chen, H. Mao and Y. Zhang (2019). "Sero-molecular epidemiology of enterovirus-associated encephalitis in Zhejiang Province, China, from 2014 to 2017." *International Journal of Infectious Diseases* **79**: 58-64.

Suresh, S., S. Forgie and J. Robinson (2018). "Non-polio Enterovirus detection with acute flaccid paralysis: A systematic review." *Journal of medical virology* **90**(1): 3-7.

Suresh, S., W. D. Rawlinson, P. I. Andrews and S. Stelzer-Braid (2020). "Global epidemiology of nonpolio enteroviruses causing severe neurological complications: A systematic review and meta-analysis." Reviews in medical virology **30**(1): e2082.

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

Suzuki, T., H. Ueda, S. Okada and M. Sakurai (2015). "Transcriptome-wide identification of adenosine-to-inosine editing using the ICE-seq method." Nature protocols **10**(5): 715-732.

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.

Thumbs, P., T. T. Ensfelder, M. Hillmeier, M. Wagner, M. Heiss, C. Scheel, A. Schön, M. Müller, S. Michalakakis and S. Kellner (2020). "Synthesis of galactosyl-queuosine and distribution of hypermodified Q-nucleosides in mouse tissues." Angewandte Chemie International Edition **59**(30): 12352-12356.

Tirumuru, N., B. S. Zhao, W. Lu, Z. Lu, C. He and L. Wu (2016). "N6-methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression." Elife **5**: e15528.

Toivonen, L., L. Schuez-Havupalo, S. Karppinen, T. Teros-Jaakkola, M. Rulli, J. Mertsola, M. Waris and V. Peltola (2016). "Rhinovirus infections in the first 2 years of life." Pediatrics **138**(3).

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.

Vandini, S., C. Biagi, M. Fischer and M. Lanari (2019). "Impact of rhinovirus infections in children." Viruses **11**(6): 521.

Verbeke, R., I. Lentacker, S. C. De Smedt and H. Dewitte (2021). "The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case." Journal of Controlled Release **333**: 511-520.

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

Voet, D. and J. G. Voet (1995). Biochemistry, Wiley, New York.

Wang, J., B. L. Alvin Chew, Y. Lai, H. Dong, L. Xu, S. Balamkundu, W. M. Cai, L. Cui, C. F. Liu and X.-Y. Fu (2019). "Quantifying the RNA cap epitranscriptome reveals novel caps in cellular and viral RNA." Nucleic acids research **47**(20): e130-e130.

Wang, X., Z. Lu, A. Gomez, G. C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai and G. Jia (2014). "N 6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability." Nature **505**(7481): 117-120.

Wang, X., B. S. Zhao, I. A. Roundtree, Z. Lu, D. Han, H. Ma, X. Weng, K. Chen, H. Shi and C. He (2015). "N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency." Cell **161**(6): 1388-1399.

Wang, Y., S. Zhang, W. Jia, P. Fan, L. Wang, X. Li, J. Chen, Z. Cao, X. Du and Y. Liu (2022). "Identification of nucleoside monophosphates and their epigenetic modifications using an engineered nanopore." Nature Nanotechnology **17**(9): 976-983.

Wen, J., R. Lv, H. Ma, H. Shen, C. He, J. Wang, F. Jiao, H. Liu, P. Yang and L. Tan (2018). "Zc3h13 regulates nuclear RNA m6A methylation and mouse embryonic stem cell self-renewal." Molecular cell **69**(6): 1028-1038. e1026.

Wilkinson, M. E., C. Charenton and K. Nagai (2020). "RNA splicing by the spliceosome." Annual review of biochemistry **89**: 359-388.

Williams, G. D., N. S. Gokhale and S. M. Horner (2019). "Regulation of viral infection by the RNA modification N6-methyladenosine." *Annual review of virology* **6**: 235-253.

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.

Wolf, J., A. P. Gerber and W. Keller (2002). "tadA, an essential tRNA-specific adenosine deaminase from *Escherichia coli*." *The EMBO journal* **21**(14): 3841-3851.

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.

Xiong, Y. and T. A. Steitz (2004). "Mechanism of transfer RNA maturation by CCA-adding enzyme without using an oligonucleotide template." *Nature* **430**(7000): 640-645.

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.

Yue, Y., J. Liu, X. Cui, J. Cao, G. Luo, Z. Zhang, T. Cheng, M. Gao, X. Shu and H. Ma (2018). "VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3' UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation." *Cell discovery* **4**(1): 1-17.

Yue, Y., J. Liu and C. He (2015). "RNA N6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation." *Genes & development* **29**(13): 1343-1355.

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

Zhang, H., Y. Zhao, H. Liu, H. Sun, X. Huang, Z. Yang and S. Ma (2017). "Molecular characterization of two novel echovirus 18 recombinants associated with hand-foot-mouth disease." *Scientific reports* **7**(1): 1-10.

Zhang, H., H. Zhong, X. Wang, S. Zhang, X. Shao, H. Hu, Z. Yu, Z. Cai, X. Chen and Y. Xia (2021). "Use of NAD tagSeq II to identify growth phase-dependent alterations in *E. coli* RNA NAD+ capping." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**(14).

Zhang, H., H. Zhong, S. Zhang, X. Shao, M. Ni, Z. Cai, X. Chen and Y. Xia (2019). "NAD tagSeq reveals that NAD+ capped RNAs are mostly produced from a large number of protein-coding genes in *Arabidopsis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**(24): 12072-12077.

Zhang, Y., Y. Wei, X. Zhang, H. Cai, S. Niewiesk and J. Li (2014). "Rational design of human metapneumovirus live attenuated vaccine candidates by inhibiting viral mRNA cap methyltransferase." *Journal of virology* **88**(19): 11411-11429.

Zhao, B. S., I. A. Roundtree and C. He (2017). "Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications." *Nature reviews Molecular cell biology* **18**(1): 31-42.

Zheng, G., J. A. Dahl, Y. Niu, P. Fedorcsak, C.-M. Huang, C. J. Li, C. B. Vågbo, Y. Shi, W.-L. Wang and S.-H. Song (2013). "ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility." *Molecular cell* **49**(1): 18-29.

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.

Zhu, Y., S. P. Pirnie and G. G. Carmichael (2017). "High-throughput and site-specific identification of 2'-O-methylation sites using ribose oxidation sequencing (RibOxi-seq)." *RNA* **23**(8): 1303-1314.

Zinshteyn, B. and K. Nishikura (2009). "Adenosine-to-inosine RNA editing." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **1**(2): 202-209.

PŘÍLOHY

Příloha 1:

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.

IF(2019) = 3,99

Příloha 2:

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.

IF(2022) = 3,2

Příloha 3:

Cena za nejlepší orální prezentaci Ph.D. studenta.