

Praha, 24.11. 2023

## **Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Anny Šimonové: Methylace virových RNA.**

Disertační práce magistry Anny Šimonové, vypracovaná na Ústavu organické chemie a biochemie AVČR pod vedením ing. Hany Macíčkové Cahové, sestává z 108 stran textu, seznamu literatury, a příloh. Přiloženy jsou dvě publikace (Scientific Reports 2019, ChemBioChem 2022), v obou je Anna Šimonová první autorkou. Práce se zabývá modifikacemi RNA, zejména modifikací m<sup>1</sup>A (1-methyladenosin). Jako model používá virovou RNA z retroviru a několika zástupců pikornavirů. Tento přístup umožňuje přímější analýzu ve srovnání s mnoha komplexními typy RNA přítomnými v buňce. Metodický přístup je pomocí LC-MS a specializovaných sekvenačních technik. Překvapivě není detekováno významné množství modifikací ve virové genomové RNA, ale v přibalených buněčných tRNA. U retroviru HIV-1 toto umožnilo nový odhad počtu tRNA molekul ve virové partikuli. U pikornavirů je prioritní nález samotné přítomnosti tRNA v partikulích.

Hlavní text i přiložené publikace jsou napsány velmi kvalitně a podrobně. Text obsahuje vícero gramatických chyb a překlepů a pomohlo by mu ještě jedno závěrečné přečtení. Mám několik vesměs minoritních připomínek, které není třeba zodpovídat během obhajoby:

- V literárním úvodu práce jsou dvě kapitoly věnující se RNA modifikacím a jejich výskytu u virů. Zde mi chybí nejnovější práce, zvláště v tak dynamickém oboru jako virová epitranskriptomika. Nejnovější citovaná práce je zde z roku 2020. Zejména chybí nové práce týkající se vlivu m<sup>1</sup>A na virovou replikaci (např. PMID: 34642752), vlivu TMRT methyltransferáz na inkorporaci m<sup>1</sup>A atd.
- Obr. 14 – zde by byl potřebný lepší popis metody v legendě
- Obr. 15 - místo prezentace nezpracovaných amplifikačních křivek QPCR by bylo lepší zpracovat absolutní kvantifikaci virové DNA pomocí standardů.

### **Přímé dotazy k autorce mám následující:**

- 1. 5% limit detekce m<sup>1</sup>A methylace pomocí sekvenční analýzy.** Jedním z klíčových výsledků práce je absence m<sup>1</sup>A methylace v retrovirové RNA a přepoččet methylací pro zbývající tRNA přibalené ve virionech. Zde práce uvádí limit detekce sekvenační metodou pro méně než 5% modifikací v dané pozici RNA. Jak byl tento limit stanoven a je možné navrhnout modifikace analýzy umožňující sensitivnější detekci (např. zvětšení sekvenačního pokrytí)? Je možné, že je ve virové RNA methylováno mnoho míst, pouze nepřesahují limit 5%? Při velké délce virové RNA oproti tRNA by to mohlo významně změnit výsledky analýzy.

Některé buněčné modifikace jsou přítomné jen u malého procenta cílových molekul a přitom mají biologický dopad (například ISG15 modifikace proteinů).

2. **Metoda Oxford Nanopore sekvenace.** Tato metoda umožňuje přímou detekci některých DNA a RNA modifikací během čtení, bez amplifikace templátu. Metoda je v úvodu práce také zmiňována. Vývoj nových aplikací je u této metody sekvenace velmi rychlý. Došlo v poslední době k nějakým zlepšením vyhodnocovacích algoritimů nanopore čtení, které by umožnily použití k detekci m<sup>1</sup>A ve virové RNA?
3. **Heterogenita virových partikulí.** Existuje plynulý přechod mezi klasickými virovými partikulemi, defektními partikulemi, a extracelulárními váčky (přehledně popsáno např. v PMID: 27432966). V práci je zmiňováno, že rozdílné podíly přibalené tRNA mohou být způsobeny jinou přípravou virů a jinými produkčními buňkami. Jsou metody zde použité (oddělení virových částic na hustotním gradientu) dostatečné na oddělení virových částic od různých typů exosomů a extracelulárních váček? Dále, zde použité metody detekují tRNA obsah v celém vzorku, tedy v „průměrné“ virové partikuli. Šlo by navrhnout metodu která by obsah detekovala v jednotlivých partikulích a určovala by stupeň jejich heterogenity?
4. **Obr. 14B – kvalita získané RNA analyzovaná na HS RNA ScreenTape.** Zde mi není jasná interpretace obrázku, jaké délky RNA obsažené v HIV-1 partikulích mají být viditelné. V srovnatelném obr. 25 ukazujícím pikornavirovou RNA je viditelná cca 8-kilobázová genomová RNA. Na obr. 14B jsou vidět pouze malé molekuly odpovídající asi tRNA.

#### **Závěr:**

Rozsah i formální stránku hodnotím i přes výše zmíněné připomínky jako postačující. Dosažené vědecké poznatky jsou významné a publikované v dobrých mezinárodních časopisech. Mohu potvrdit že předložená práce prokazuje způsobilost Anny Šimonové k požadavkům kladeným na vypracování doktorské disertační práce. Proto doporučuji aby práce byla přijata jako základ pro řízení o udělení vědecké hodnosti PhD.

MUDr. Daniel Elleder, Ph.D.  
Ústav molekulární genetiky AVČR  
Vídeňská 1083  
14220 Praha  
e-mail: elleder@img.cas.cz  
tel.: 296443145