

**Posudek na disertační práci Ing. Barbory Benoni: "Studies of NAD-RNA and its function in HIV-1 infection".**

Disertační práce Barbory Benoni se zaměřuje na vliv infekce HIV-1 na hladinu NAD v hostitelských buňkách, přičemž hlavním cílem bylo prozkoumat vztah mezi virovou infekcí HIV-1 a NAD-RNA čepičkou. K dosažení tohoto cíle autorka stanovila 11 dílčích cílů, které zahrnovaly celou řadu metodicky velmi náročných a vysoce pokročilých technik molekulární biologie, včetně produkce HIV-1 virionů pro izolaci RNA, vytvoření experimentálních buněčných linií jak se sníženou, tak zvýšenou produkcí enzymu DXO, a aplikace metody NAD CaptureSeq k detekci NAD-RNA v kontrolních buňkách a buňkách infikovaných HIV-1. Dále autorka úspěšně kvantifikovala intracelulární NAD, analyzovala obsah RNA v částicích HIV-1 pomocí LC-MS a zkoumala stabilitu komplexu mezi HIV-1 RNA a U1 snRNA s NAD a TMG čepičkou. Tyto experimenty přinesly nové poznatky o interakcích mezi virovou RNA a hostitelskou snRNA. Studie rovněž odhalila význam NAD čepičky v průběhu HIV-1 infekce, kdy čepička ovlivňuje stabilitu komplexu mezi HIV-1 gRNA a NAD-U1 snRNA, což vede ke snížení infekivity HIV-1.

Práce je psána v angličtině a má standardní strukturu. Úvodní část disertační práce je velmi dobře zpracována a přehledně uspořádána. Autorka v ní podrobně popisuje různé typy buněčných RNA, jejich charakteristiky, funkce a posttranskripční modifikace, což poskytuje pevný základ pro pochopení následných experimentálních částí. Oceňuji rovněž podrobný popis retrovirového cyklu, zejména v souvislosti s HIV-1, včetně detailního vysvětlení mechanismů vedoucích ke snížení hladiny NAD během infekce. Tato část je dobře podložena literaturou a doplněna kvalitními ilustracemi. Nicméně v úvodu postrádám zmínku o tom, že snížení hladiny NAD není specifické pouze pro HIV-1, ale je častým jevem při různých virových infekcích. Například infekce způsobené virem jako SARS-CoV-2, Zika, chřipka, herpes simplex virus (HSV) a Coxsackievirus B3 (CVB3) jsou rovněž spojeny s deplecí NAD v infikovaných buňkách. Tento širší kontext by přispěl k lepšímu porozumění významu NAD v rámci antivirové obrany a mohl by obohatit úvodní část práce.

Kapitola Results obsahuje významné experimentální výsledky, které ukazují vliv HIV-1 infekce na hladiny NAD-RNA a popisují změny v modifikacích RNA. Autorka použila pokročilé metody, jako jsou LC-MS a NAD CaptureSeq, k identifikaci a kvantifikaci NAD-RNA v infikovaných buňkách. I když jsou prezentované výsledky vědecky zajímavé, v některých částech postrádají podpůrná experimentální data. Například, je poněkud nepřesné jednoznačně tvrdit, že hladina DXO není ovlivněna HIV-1 infekcí pouze "okometrickým" vyhodnocením imunoblotu (obr. 43). Na obr. 44, který dokumentuje knockdown DXO, chybí analýza endogenní hladiny DXO v kontrolních buňkách. Navíc, vzhledem k důležitosti tohoto experimentu, by snížení exprese DXO mělo být potvrzeno také pomocí qPCR, nejen imunochemickou analýzou. Dále se domnívám, že grafy na obrázcích 50, 51 a 52 by bylo vhodné doplnit imunochemickou analýzou potvrzující přítomnost/absenci DXO a virových proteinů.

Diskuze v disertační práci Barbory Benoni je dobře strukturovaná a nabízí interpretaci experimentálních výsledků v kontextu současné literatury. Autorka se zabývá mechanismy, jakými HIV-1 infekce ovlivňuje NAD capping u snRNA a snoRNA, a navrhuje relevantní hypotézy, které jsou podloženy experimentálními daty. Nicméně bych uvítala věnovat více prostoru diskusi o vlivu dalších virových infekcí na snížení hladin NAD, což v práci chybí. Zaměření na HIV-1 a jeho vliv na NAD capping je bezpochyby důležité, neboť je to náplň disertace, ale je dobře zdokumentováno, že i jiné viry, například SARS-CoV-2, mohou vést k významné depleci NAD v hostitelských buňkách prostřednictvím aktivace enzymů jako PARP, které spotřebovávají NAD při antivirové obraně. Tento fakt naznačuje, že pozorované změny v NAD cappingu nemusí být specifické pouze pro HIV-1, ale mohou být součástí obecnějšího antivirového



mechanismu. Absence této širší souvislost v diskuzi ochuzuje kontext výsledků, které by mohly být lépe interpretovány v rámci širšího spektra virových infekcí.

K práci mám následující dotazy:

1. Ve své disertační práci uvádíte, že U1 snRNA, spolu s dalšími snRNA a snoRNA, ztrácí NAD čepičku v buňkách infikovaných HIV-1. To naznačuje, že v neinfikovaných buňkách musí být určitá část U1 snRNA modifikována NAD čepičkou, protože k této ztrátě dochází až po infekci.
  - Co je známo o hladině NAD cappingu U1 snRNA v neinfikovaných buňkách? Jakou roli hraje tento capping v buněčných procesech?
  - Je známo, jaký je turnover U1 snRNA v buňce? Mohl by podle Vás nedostatek NAD čepiček na U1 snRNA, který jste pozorovala po 40 hodinové HIV-1 infekci MT-4 buněk, být spíše vedlejším efektem snížené hladiny NAD v infikovaných buňkách, než přímým specifickým důsledkem virové infekce?
  - Z Vašich dat (Fig. 49 a Fig. 57) vyplývá, že decapping NAD U1snRNA není zřejmě katalyzován enzymem DXO. Vzhledem k tomu, že HIV-1 je důkladně prozkoumán, není znám jiný buněčný decapping enzym, jehož exprese by mohla být regulována některým virovým proteinem (např. Tat)?
2. Vzhledem k tomu, že je známo, že i jiné virové infekce, například SARS-CoV-2, výrazně snižují hladiny NAD v hostitelských buňkách, je podle Vás možné, že pozorované snížení NAD cappingu snRNA a snoRNA během HIV-1 infekce by mohlo být součástí širší antivirové odpovědi než specifického procesu spojeného pouze s HIV-1?

Celkově hodnotím tuto práci pozitivně a věřím, že přináší cenné poznatky, které přispějí k dalšímu rozvoji výzkumu v oblasti RNA modifikací a virové patogeneze.

**Závěrem lze říci, že Disertační práce Barbory Benoni prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.**

V Praze dne 3. 9. 2024

  
Prof. Dr. Ing. Michaela Rumlová