



Brno, 5.9. 2024

Posudek na disertační práci: "Studium funkce NAD-RNA v HIV infekci"**PhD kandidátka: Ing. Barbora Benoni**

Práce se zabývá aktuální tematikou vlivu RNA modifikací na HIV infekci lidských T lymfocytů a RNA procesování. PhD kandidátka se konkrétně věnovala chemické modifikaci 5' konce RNA NAD. Za pomoci "state-of-the-art" metodologií poznala, že virové RNA nejsou opatřené NAD čepičkami. Naopak, identifikovala velké spektrum lidských nekódujících RNA s NAD čepičkou. Samotný tento výsledek je velmi zajímavý a zaslouží si další stadium. V další části otestovala vliv lidského proteinu DXO, který je schopen tyto 5' modifikace odstraňovat. Dospěla k velmi zajímavým výsledkům ukazujícím, že snížení hladiny NAD čepiček, zřejmě zejména na U1 snRNA pomocí overexprese DXO vede k vyšší infektivitě HIV-1. Jinými slovy, tato modifikace má protektivní antivirový potenciál. PhD kandidátka tak splnila zadání tématu práce. Celkově se jedná o velmi atraktivní a kompetitivní PhD práci. Bohužel její kvalita je snížena finálním písemným zpracováním do podoby disertace.

Celkově práce obsahuje všechny požadované části. Ve zpracování práce ale postrádám vlastní přínos a kreativní myšlení v práci s daty a informacemi. Úvod příliš široce rozkročený a působí spíše jako encyklopedický seznam typů RNA a známých modifikací, drah, a úvodu do biologie HIV viru. Celkově autorka přebírá vyjádření z publikací bez kritického pohledu a jakékoliv snahy o vědeckou debatu. Vzhledem k omezenému prostoru pro zpracování je pak zákonitě popis velmi zkratkovitý a neúplný, což vede k chybným informacím. V tomto akademickém stadiu bych spíše očekávala lépe popsané propojení se samostatným tématem disertační práce. Dále by bývalo bylo přínosem více rozebrat a uvést metodiku NAD CaptureSeq, která není běžnou metodikou, a je jednou z velmi zajímavých a esenciálních částí samotné výzkumné práce. Krátkou stat' a srovnání s novějšími přístupy autorka věnuje této metodice až v samotné diskuzi.

Ing. Benoni splnila požadavky samotné vědecké práce. Zvládla zpracovat zadané téma za využití kombinace metodik virologie, buněčné biologie, bio-chemie, molekulární biologie a bioinformatiky. Samotná metodika NAD CapSeq je náročná na preciznost a Barbora získala významné výsledky za jejího využití. Je na škodu, že lépe a více do detailu nerozpracovala i další experimenty, jako je vliv HIV infekce na expresi DXO, samotný DXO knock-down či vliv NAD čepiček na mRNA procesování. Dále je škoda, že zřejmě vzhledem k požadavku na přijatý prvoautorský článek byly tyto výsledky publikovány v nižším vědeckém časopise, než by si zasloužily.

Závěrem, předložená disertační práce splňuje zadané parametry kladené na udělení doktorského titulu.

Otázky a komentáře:



1. Mezi NAD-RNA byla identifikována I U7 snRNA, která má významnou úlohu v procesování histonových mRNA. Dále je zřejmě zodpovědná za tšení lidských retrovirových element HERV. Můžete navrhnout experiment, jak dale studovat úlohu NAD čepičky na U7 snRNA?

2. Jsou některé ze snoRNA identifikovaných pomocí NAD CaptureSeq transkribované z vlastního promotoru?

3. Jak by bylo možné vylepšit analýzu sestřihu pre-mRNA oproti té uvedené v závěru práce?

4. Je koncepčně správné označovat stejným názvem „caps“ 5' konce modifikované posttranskripčně i konce, které vznikly zařazením již dané chemické struktury RNA polymerázou? Jsou caps vždy na 5' fosfátovém konci RNA?

5. V úvodu je uvedena řada nepřesností, či zavádějících informací:

Kapitola 1.1.4. popisující snRNA je nevybalancovaná. Zatímco větší pozornost je věnována U1 snRNA včetně její funkce v sestřihu pre-mRNA a genové expresi HIV viru, ostatní snRNA jsou popsané příliš stručně, většinou s ohledem na modifikace v nich identifikované. Minimálně samostatná kapitola tedy mohla být věnována U6 snRNA.

Kapitola 1.1.5 snoRNA: je pravda, že snoRNA jsou kódovány častěji v rámci intronových úseků pre-mRNA, ale několik snoRNA má samostatně přepisované vlastní geny a právě s ohledem na zaměření práce na čepičky bych očekávala, že je autorka zmíní.

Kapitola 1.2.5 nazvaná RNA degradation je ve skutečnosti fokusovaná na mechanismy degradace messengerové RNA. Ve světle toho, že autorka na začátku práce vyjmenovává a stručně popisuje řadu i jiných typů RNA, je to matoucí.

Obecně zvolené členění degradačních drah či mechanismů není šťastně zvolené. Vhodnější termíny pro jednotlivé podkapitolky by možná byly názvy dle enzymatických aktivit, např. Decapping, deadenylation, 5'to 3'decay, endonucleolytic cleavage, 3'to 5'decay, apod.

Deadenylation-independent degradation:

Nepovažuji za úplně přesné nazývat Nonsense mediated decay - NMD jako „deadenylation independent“, str. 24. Jak sama autorka uvádí, NMD zahrnuje v podstatě své funkce deadenylaci mRNA.

6. Str. 26. kapitola m6A

Co má autorka na mysli vyjádřením, že „m6A does not affect the coding capacity but can destabilize complexes with uracil“?

Nepravdivá informace: ALKBH5 demethylates m6Am present in 5'caps. Tuto aktivitu má protein FTO. Na straně 28 již to je uvedeno správně, ale věta „However, FTO prefferentially demethylates m6Am rather than m6A“ v daném kontextu nedává smysl.

7. Kapitola m1A má několik překlepů a zavádějících vyjádření: např. discoeved, cross-reactivity of detection antibodies, m1A modification is spread on tRNA... Vzhledem k tomu, že m1A byla



nejabundantnější modifikace detekovaná z virových částic by si tato modifikace zasloužila extenzivnější text.

8. Str. 28 „Nm at the first and second transcribed nucleotides prevents mRNA degradation by DXO“. Dostupné informace a publikace se úplně nesjednocují na úloze této metylové skupiny. Zejména úloha Nm na druhém nukleotidu zatím není zcela zřejmá.

9. Celá malá podkapitolka o m5C o dvou větách nedává moc smysl.

10. Kapitola 1.3.2 Non-canonical caps

„Traditionally, RNAs in eukaryotic cells possess m7G cap or TMG cap.“ Autorka má asi namysli RNA syntetizované RNA Polymerázou II.

Výsledková část:

11. Str. 62: „cell gradually infected with HIV-1“ má zřejmě být „gradually scaled up culture“

12. Kapitola 4.4. Autorka používá termín sRNA. Taková kategorie ale není ve výčtu v úvodní části. Až později v textu vyjde najevo, že se jedná o kratší nekódující RNA (ncRNA). Avšak ne pro všechny platí úvodní věta: „sRNAs are noncoding regulatory RNAs that bind to their targets and noncanonical cap might affect their efficiency“. Předpokládám, že prvotní otázkou zde bylo, jaké různé ncRNA mohou být modifikovány NAD čepičkou.

13. Strana 66: Věta: “The libraries were also mapped to the HIV-1 genome but any viral encoded RNAs were founds to bear NAD cap“ znamená, že všechny virové RNA měly NAD čepičku. Avšak obrázek 31B ukazuje opačný výsledek.

14. Str. 74. Obrázek 43. Testování vlivu infekce HIV na expresi DXO by si zasloužilo minimálně další a důkladnější analýzu. Z předložených western blot analýz lze těžko vyvozovat nějaké závěry. Vykazují MT-4 buňky výrazně vyšší, respektive nižší expresi DXO než jiné typy buněk?

14. Str. 75, Co je myšlenou větou: “VectorBuilder offers only one expression system“?

Stepanka Vanacova

Professor of Molecular Biology and Genetics
CEITEC, Masaryk University
Brno, Czech Republic