

Posudek oponenta habilitační práce

Uchazeč	RNDr. Luděk Eyer, Ph.D.
Habilitační práce	Inhibitory replikačního cyklu medicínsky významných virových patogenů
Oponent	RNDr. Boris Klempa, DrSc.
Pracoviště oponenta, instituce	Virologický ústav, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Bratislava

Predložená habilitačná práca predstavuje veľmi komplexný a vysoko kvalitný súbor odborných prác zameraných na vývoj a štúdium antivírusových látok zameraných voči pomerne širokému spektru medicínsky významných vírusov zahŕňajúcemu nielen významné flavivírusy ako je vírus kliešťovej encefalitidy, Zika vírus alebo West Nile vírus, ale aj herpesvírusy, či pandemický SARS-CoV-2.

Práca je postavená na súbore 23 vedeckých článkov publikovaných v rešpektovaných medzinárodných peer-review časopisoch. Práce veľmi dobre ilustrujú, že uchádzač je vyprofilovaná vedecká osobnosť s jasným zameraním na vývoj antivírusových látok. Rovnako ilustrujú jeho medzinárodnú reputáciu a intenzívnu medzinárodnú spoluprácu. V súbore je tiež dobre zachytený kariérny rast kandidáta, keď vo výraznej časti hlavne starších článkov pôsobil ako prvý autor, zatiaľ čo v tých novších článkoch je už často korešpondenčným autorom. O vedeckej úrovni prác Dr. Eyeru nie je možné pochybovať, keďže všetky práce sú publikované v kvalitných peer-review časopisoch, niektoré vo vysoko prestížnych časopisoch s impozantným impakt faktorom, ako napríklad Nucleic Acids Research (IF 19.16), Antiviral Research, Journal of Virology, alebo Journal of Infectious Diseases.

Práca je vhodne rozdelená do logických častí podľa typu článkov a podľa typu inhibítorov (nukleozidové analógy a od nukleozidov štruktúrne odlišné antivirotiká). Vzhľadom ku komplexnosti výskumu a prezentovaných prác je každá kapitola v úvode veľmi vhodne komentovaná a prevádza čitateľa prezentovanými publikáciami. Za mimoriadne prínosnú považujem najmä sériu prác zameraných na 2'-C-metylované a 4'-azidované nukleosidové analógy, ktorá od vírusu kliešťovej encefalitidy postupne ukázala významné účinky aj voči Zika či West Nile vírusu. Z poslednej kapitoly určite stojí za zmienku práca zameraná guanínové kvadruplexy ako úplne nové antivírusové ciele minimálne voči flavivírusovým infekciám.

Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

1. V rámci vašich štúdií inhibítorov TBEV ste vyselekovali zaujímavé NS5 mutanty vírusu. Zatiaľ čo S603T mutant rezistentný voči 2'-C metylovaným nukleozidom mal očividne znížené fitnes v in vitro aj in vivo podmienkach, tak mutant E460D selektovaný voči galidesiviru mal prekvapivé vlastnosti. Pri kultivácii v PS bunkách bol takmer rovnaký ako wild-type, zatiaľ čo in vivo kompletne stratil neuroinvazivitu a všetky infikované myši preživali a nevykazovali žiadne klinické príznaky. Vzhľadom k tomu, že ide o jedinou mutáciu vo vírusovej polymeráze je takáto dramatická zmena fenotypu v myšiach prekvapujúca. Máte hypotézu, aký je mechanizmus straty neuroinvazivity? Sledovali ste daný mutant aj na iných bunkových líniiach, či relatívne nezmenená replikačná schopnosť in vitro nie je len špecifický artefakt PS buniek?

2. Práca Eyer et al. *J Infect Dis* (2016) zameraná na nukleozidové inhibítory Zika vírusu mala v súvislosti s epidémiou v roku 2015 silný ohlas nielen vo vedeckej komunite. Zaujímá ma, či sa odvtedy nejaké 2'-C metylované nukleozidy dostali do fázy klinických skúšok, či už voči Zika vírusu alebo iným flavivírusom. Existuje pre-klinické štúdie, ktoré by sledovali aj reprodukčnú toxicitu a vplyv na vývoj plodu, keďže zrovna u Zika vírusu by zrejme jedna z možných aplikácií látok bola práve počas tehotenstva.

3. Práca Holoubek et al. *Nucleic Acids Research* (2022) o guanínových kvadruplexoch je naozaj mimoriadne prínosná, zaujímavá a hlavne veľmi precízne pripravená. Zaujali ma vlastnosti vytvorených mutantov vírusu. Konkrétne najmä to, že tzv. super-negative mutant veľmi rýchlo revertoval do wild-type genotypu. Ak to správne chápem, revertovali teda 4 mutácie, pričom tri z nich boli aj v tzv. negative mutante, kde boli stabilné. Analyzovali ste, či vznikali v procese reverzie aj intermediáty, ktoré by korešpondovali s negative mutantom? Ako si vysvetľujete tento fenomén, že jedna mutácia navyše viedla k reverzii aj tých mutácií, ktoré inak pretrvávali?

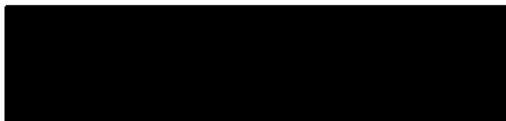
4. V súvislosti s tou istou prácou a mutantom mám ešte jednu otázku. V práci je uvedené, že super-negative mutant revertoval v priebehu 168h pri kultivácii v PS bunkách. Išlo o kultiváciu bez prítomnosti G4 ligandu? Porovnávali ste výskyt revertantov pri kultivácii s G4 ligandmi vs. bez prítomnosti ligandov?

5. Celkove ste v habilitačnej práci predložili vskutku obdivuhodný súbor prác zahŕňajúci rôzne skupiny antivírusových látok s rôznymi mechanizmami účinku a účinnými voči veľmi rôznym skupinám vírusov. Ktoré z týchto látok v tejto chvíli vnímate ako najperspektívnejšie z hľadiska reálneho využitia v terapii vírusových ochorení?

Záver

Habilitační práce RNDr. Ludka Eyera, Ph.D. „Inhibitory replikačného cyklu medicínsky významných virových patogenů“ **splňuje** požiadavky standardne kladené na habilitační práce v oboru Molekulární a buněčná biologie a genetika.

V Bratislave dne 25.4.2023



podpis oponenta

Posudek oponenta habilitační práce

Uchazeč	RNDr. Luděk Eyer, Ph.D.
Habilitační práce	Inhibitory replikačního cyklu medicínsky významných virových patogenů
Oponent	prof. MUDr. Ladislav Machala, Ph.D.
Pracoviště oponenta	Klinika infekčních nemocí 3. LF UK a FNB

Habilitační práce RNDr. Lud'ka Eyera, Ph.D. je souborem komentovaných vlastních publikací autora. Text práce sestává z 5 oddílů, které reprezentují pokroky ve vysoce aktuální problematice vývoje a praktického využití virostatik proti některým skupinám medicínsky významných virů, především pak čeledi *Flaviviridae* a *Coronaviridae*., které autor blíže představuje v úvodní části celé práce.

Vlastní práce, která je komentářem souboru autorových publikací, má 403 stran textu doplněného abecedně řazeným seznamem 104 publikací v textu citovaných. Formální členění práce – dělení na část obecnou a speciální – odpovídá požadavkům, které jsou kladeny na habilitační práci.

Soubor komentovaných prací zahrnuje celkem 23 publikací, z nichž u deseti je dr. Eyer prvním autorem, u ostatních pak spoluautorem. Všechny komentované publikace jsou v plném znění přílohou předkládané habilitační práce a u každé z těchto publikací je stručně uvedeno, jaký byl autorův podíl na její realizaci.

Celkem 21 z těchto článků bylo publikováno v časopisech s impakt faktorem, jeden článek vyšel v časopise excerpovaném v databázi Scopus a jeden text je kapitolou v zahraniční monografii. Původními pracemi je celkem 20 publikací, zbylé tři pak představují přehledové články.

Z komentářů a zvláště pak z vysoké kvality předkládaných publikací jsou zřejmé jak hluboká erudice, tak i rozsáhlé zkušenosti autora, kterých při své činnosti v této vysoce aktuální a potřebné oblasti nabyl.

Práce komentované v rámci předkládané habilitační práce byly publikovány v letech 2013 až 2022, přesto je u všech uváděn impakt faktor za rok 2021. U prací starších tří let bývá obvyklé uvádět impakt faktor, kterého časopis dosáhl v roce publikování práce, což poskytuje poněkud přesnější pohled na profily dotyčných časopisů.

V publikaci č. 23 (Štefánik et al., 2020) je referováno o potenciálním účinku inhibitoru NS5B polymerázy viru hepatitidy C dasabuviru na replikaci některých vektory přenášených flavivirů. Vzhledem k tomu, že virus hepatitidy C též patří do čeledi *Flaviviridae* (arci nikoliv do rodu *Flavivirus*, ale *Hepacivirus*), poněkud postrádám v teoretické pasáži věnované problematice virostatické léčby flavivirových infekcí alespoň stručnou zmínku o virostatické léčbě hepatitidy C, mimo jiné i proto, že tato skupina virostatik je v současné době jednou z nejdynamičtější se rozvíjející skupin protivirových léků.

Předkládaná habilitační práce je psána přehledně, moderním jazykem, stavba a logická skladba vět jsou dobře srozumitelné. V práci se vyskytuje minimum chyb a překlepů a několik drobných nepřesností (např. některá virostatika jsou běžně podávána i v rámci profylaktických indikací či je v textu chybně užíván termín úmrtnost místo správného termínu smrtnost). Závěrem je nutno konstatovat, že habilitační práce RNDr. Lud'ka Eyera, Ph.D. je vysoce kvalitní a svým obsahem, formou i rozsahem odpovídá požadavkům, které jsou kladeny na habilitační práci podle Zákona o vysokých školách č. 111/1998 Sb. i Metodického pokynu č. 2/2023 Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích a z tohoto důvodu také doporučuji její přijetí jako podklad pro habilitační řízení a pro udělení vědecko-pedagogického titulu docent v souladu s platným zákonem o vysokých školách.

Dotaz oponenta k obhajobě habilitační práce

V již zmíněné práci Štefánika et al. z roku 2020 o hledání kandidátů repurposingu již běžně užívaných virostatik je též zmíněn antiretrovirový lék efavirenz. Tento nenukleosidový inhibitor HIV-1 reverzní transkriptázy se však vyznačuje vysoce specifickou vazbou na alosterickou kapsu tohoto enzymu, dokonce tak specifickou, že neinhibuje funkci reverzní transkriptázy viru HIV-2. Mohl by se pan dr. Eyer pokusit zaskupulovat, jakým mechanismem by efavirenz mohl interferovat s replikačním cyklem flavivirů?

Závěr

Habilitační práce RNDr. Lud'ka Eyera, Ph.D. „**Inhibitory replikačního cyklu medicínsky významných virových patogenů**“ **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Molekulární a buněčná biologie a genetika.

V Praze dne 19.6.2023



podpis oponenta

Posudek oponenta habilitační práce

Uchazeč	RNDr. Luděk Eyer, Ph.D.
Habilitační práce	Inhibitory replikačního cyklu medicínsky významných virových patogenů
Oponent	RNDr. Jiří Černý, Ph.D.
Pracoviště oponenta, instituce	Fakulta tropického zemědělství, Česká zemědělská univerzita v Praze

Habilitační práce RNDr. Luděka Eyera, Ph.D. je velmi kvalitní a nejen splňuje, ale i s přehledem překonává všechny standardní požadavky kladené na habilitační práce. Toto ukazuje už jen samotný fakt, že práce je postavena na 23 článcích publikovaných v recenzovaných časopisech sledovaných v databázi Web of Science. Dr. Eyer je pak autorem celkem 35 publikací (dle Web of Science ke dni 28.4.2023) a jeho Hirschův index je 16, což ukazuje, že se jedná jak o plodného, tak i vysoce citovaného a tedy i uznávaného odborníka.

Práce je členěna do šesti hlavních kapitol (+přehled literatury). Kapitola 2 se věnuje přehledu studovaných patogenů. Nosné jsou pak kapitoly 3-5, které se věnují jednotlivým typům studovaných inhibitorů (nukleosidové analogy, nenukleosidové analogy, ostatní inhibitory). Tyto kapitoly na sebe logicky dobře navazují a poskytují tak ucelený přehled o předchozích znalostech ve studované problematice i o tom, jak výsledky Dr. Eyera přispěly k prohloubení našich znalostí ohledně inhibitorů významných virových skupin, především pak flavivirů a koronavirů.

Práce obsahuje i separáty jednotlivých článků, na kterých je postavena. I ty dosahují vysoké kvality, která se dá demonstrovat například jejich přijetím v renomovaných vědeckých časopisech (např. Nucleic Acids Research – IF 19,1, Antiviral Research – IF 10,1, Journal of Virology – IF 6,2, Antimicrobial Agents and Chemotherapy – IF 5,9, atd.). K samotným článkům pak zde není potřeba se blíže vyjadřovat i z toho důvodu, že již před svou publikací prošli klasickým recenzním řízením.

Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

K samotné práci nemám žádné doplňující otázky. Rád bych se ale Dr. Eyera zeptal na několik otázek ohledně současného stavu jeho výzkumu a jeho dalších plánů.

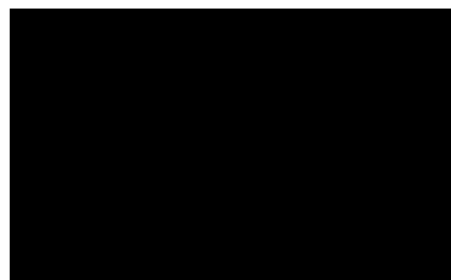
1) Vývoj a testování nových léčiv je samozřejmě velmi časově, finančně i technologicky náročná práce, která probíhá v mnoha krocích a je prováděna mnoha týmy. Víte ale i přes to, která z vámi testovaných látek je nejbližší skutečnému uvedení do praxe? Pokud ano, která? U které pak největší potenciál vidíte vy sám?

2) Z vaší práce je patrné, že vámi využívaná metodika pro testování potencionálních virových inhibitorů v podmínkách tkáňových kultur (in vitro) i na modelu laboratorních myší (in vivo) je ve vaší laboratoři velmi dobře zavedena. Plánuje v brzké době rozšířit portfolio testovaných virů o zástupce některých dalších skupin? Pokud ano, tak o jaké a proč?

Závěr

Habilitační práce RNDr. Ludka Eyera, Ph.D. „Inhibitory replikačního cyklu medicínsky významných virových patogenů“ **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Molekulární a buněčná biologie a genetika.

V Praze dne 28. 4. 2023

A large black rectangular box redacting the signature of the reviewer.

.....
podpis oponenta