

## Posudek na habilitační práci RNDr. Ivana Hirsche, CSc. „Virus restriction and adaptation during latent and chronic infection“

Ivan Hirsch pojal svou habilitační práci jako průřez svou vědeckou kariérou. První příspěvky v oblasti lidské virologie se týkají jeho působení v Ústavu sér a očkovacích látek pod vedením prof. Vladimíra Vonky. Ivan Hirsch se zapojil do studia lidských herpetických virů jako etiologických agens u rakoviny. Konkrétně se věnoval molekulárním mechanismům replikace viru Herpes simplex typ 1. Společně s prof. Vonkou prokázali přítomnost ribonukleotidových sekvencí ve virové DNA. Jejich publikace věnované replikaci herpesvirové DNA přispěly k návrhu mechanismu valivé kružnice (rolling circle) při replikaci virové DNA. Po postdoktorandském pobytu v Houstonu u legendy světové virologie prof. Melnicka se Ivan Hirsch v ÚSOL věnoval možné etiologické roli HSV-2 v karcinomu děložního čípku. Jeho hlavním úkolem byl vývoj serologického testu odlišujícího protilátky proti typům 1 a 2 herpetického viru. Výsledky rozsáhlé studie nepotvrdily souvislost mezi infekcí HSV-2 a karcinomem děložního čípku a vytvořily předpoklad pro pozdější objev lidského papilomaviru jako etiologického agens cervikální neoplasie.

Další oblastí výzkumu Ivana Hirsche byla úloha viru Epsteinova a Barrové ve vývoji orofaryngeálního karcinomu. Pomocí hybridizace *in situ* prokázal Ivan Hirsch se svým studentem Bedou Břicháčkem EB virovou DNA v bioptickém materiálu z nádoru tonzily a larynxu. Této problematice bylo věnováno 16 článků.

Hlavním předmětem výzkumu Ivana Hirsche během jeho působení v Inserm laboratorii v Marseille byla perzistence a latence HIV-1. Výzkum byl zaměřen zejména na ustavení a eradikaci virových buněčných rezervoárů v pacientech léčených antiretrovirovou terapií. Spolupracoval s řadou světových laboratoří, na příklad s další světovou veličinou Leonidem Margolisem z NIH v Bethesda. Ivan Hirsch dokázal, že transkripční suprese integrovaného HIV-1 proviru nekoreluje s jeho metylací (což se předpokládalo), ale že CpG metylace představuje dodatečný epigenetický restriční mechanismus, který řídí rezistenci latentního HIV-1 k reaktivačním signálům a tím určuje stabilitu latence. V rámci vývoje „kick and kill“ strategie tým Ivana Hirsche dokumentoval, že non-tumorigenní forbol ester prostratin snižuje citlivost klidových CD4+ T lymfocytů k HIV infekci a současně reaktivuje latentní virus v T lymfocytech.

V navazující studii Ivan Hirsch ukázal, že syncytiny, fusogenní glykoproteiny kódované retrovirem, jsou epigeneticky řízeny na úrovni transkripce a sestříhu.

33 publikací z laboratoře Ivana Hirsche v INSERM bylo věnováno patogenesi a tropismu HIV-1. Je zajímavé, že Hirschova laboratoř ukázala, že původní HIV-1 izolát byl v roce 1983 kontaminován jiným HIV-1 izolátem schopným růst v T buněčných liniích. Identifikace těchto izolátů sehrála významnou roli v mezinárodní debatě o prioritě objevu HIV.

Při výzkumu patogenese HIV-1 infekce Ivan Hirsch ukázal, že virus využívá flexibilní replikační strategie k infekci různých typů buněk. Na příklad typicky lymfotropní virus byl

kromě CD4+ T lymfocytů schopen infikovat makrofágy, trofoblast nebo buňky střeva mechanismem nezávislým na CD4 receptoru.

Posledních 10 let se Ivan Hirsch zabýval interakcí virů způsobujících chronické infekce vedoucí ke vzniku nádorů s mechanismy přirozené a adaptivní imunity hostitele. Hlavním subjektem jeho výzkumu se staly plasmacytoidní dendritické buňky známé vysokou produkcí interferonu.

PDCs rozpoznávají virovou RNA nebo DNA pomocí endosomálních receptorů TLR7 a TLR9. Odpovídavost na aktivaci těchto receptorů viry jako je HIV-1, HBV, HBC a lidský papilomavirus typ 16 je však oslabena. Totéž se týká nádorů bez virové etiologie. Ukazuje se, že výše uvedené viry nebo složky mikroprostředí nádoru interagují s regulačními receptory pDCs což vede k potlačení TLR7 a TLR9 signalizace a snížení exprese TLR9 genu.

Ivan Hirsch použil jako hlavní model virus hepatitidy C v interakci s pDCs. Ukázal, že internalizace virových částic vedla k málo účinné detekci virové RNA pomocí TLR7 což se projevilo sníženou produkcí IFN- $\alpha$ . Porovnáním aktivace transkripčních faktorů IRF7 a NF- $\kappa$ B volným HCV a virem vázaným na hepatomové buňky ukázal, že hepatomové buňky indukují vysokou produkci IFN- $\alpha$ , ale neaktivují NF- $\kappa$ B dráhu. To je nepochybně jeden z mechanismů, kterým HCV uniká imunitní kontrole. Ve své nejpůvodnější práci ukázal, že virový glykoprotein E2 funguje jako ligand lektinového imunoreceptoru BDCA-2 na pDCs čímž inhibuje produkci IFN- $\alpha$ . Zablokování tohoto receptoru Fab fragmentem protilátky uchovává schopnost pDCs produkovat interferon po interakci s HCV viriony.

Ve spolupráci s laboratoří Andrey De Maria z Janova studoval Ivan Hirsch vliv HCV infekce na odpověď lidských NK buněk. Ukázali, že úspěšnost léčby IFN- $\alpha$  a ribavirinem záleží na expresi aktivačních a inhibičních receptorů NK buněk v kontextu s HLA haplotypem.

Při výzkumu patogeneze infekce HIV-1 Hirsch a spol. zjistili, že virus indukuje v T buňkách expresi aktivačních znaků, které představují cíle pro další HIV infekci. Tím HIV vytváří destruktivní cyklus aktivace a infekce.

Poslední práce v habilitaci je věnována úloze inhibičních receptorů v lidské cytomegalovirové infekci. Studium exprese B a T lymfocytárního atenuátoru (BTLA) na lidských T lymfocytech ukázalo, že během primární CMV infekce je tento receptor vysoce exprimován na CMV specifických CD8+ T lymfocytech ihned po jejich diferenciaci z naivních buněk. Na paměťových CD8+ T buňkách je exprese BTLA snížena. Blokování BTLA receptoru protilátkou ukázalo, že je stejně účinný v inhibici cytotoxických T lymfocytů jako PD-1 receptor a proto představuje potenciální cílovou molekulu pro zvýšení funkční kapacity CTL u virových infekcí.

Vědecká produkce Ivana Hirsche je úctyhodná. Některé jeho výsledky ovlivnily další vývoj virologie jako oboru. Mám na mysli na příklad popření souvislosti mezi infekcí HSV-2 a karcinomem děložního čípku, což vedlo k hledání jiných etiologických agens a vyústilo v identifikaci lidského papilomaviru jako původce. Významným přínosem pro medicínskou virologii byl průkaz EB virového genomu v buňkách orofaryngeálního karcinomu.

Významné jsou i výsledky laboratoře vedené Ivanem Hirschem v souvislosti s výzkumem perzistence HIV-1. Tato perzistence totiž představuje základní problém účinné terapie AIDS, protože latentní virus je nedetekovatelný imunitním systémem a necitlivý k chemoterapii. Hirschova skupina ukázala, že CpG metylace není potřebná k ustavení perzistence, ale hraje důležitou roli v jejím udržení. Methylace podmiňuje rezistenci k reaktivačním signálům. Další významné výsledky Ivana Hirsche se týkají interakcí virů vyvolávajících perzistentní infekce s buňkami přirozené imunity, jmenovitě s plasmacytoidními DC. Ivan Hirsch ukázal, že tyto viry dokážou využít inhibiční receptory negativně regulující imunitní odpověď k potlačení produkce protivirového cytokinu, IFN- $\alpha$ .

Není pochyb o tom, že problematika studovaná Ivanem Hirschem byla aktuální v době, kdy byla studována a je aktuální doposud. Ivan Hirsch se vždy zabýval medicínsky velmi významnými viry, výsledky jeho práce přispěly k vývoji molekulární virologie a mají i silný aplikační potenciál v humánní medicíně. Rovněž metodické postupy použité k řešení problémů byly vždy na vysoké úrovni odpovídající době.

Závěrem bych chtěl zdůraznit, že vědecká produkce Ivana Hirsche je mimořádná (95 publikací, 1642 ohlasů, H-index 22) a velmi významná. Jsem přesvědčen, že habilitační práce Ivana Hirsche překračuje požadavky kladené na tento typ práce na Přírodovědecké fakultě UK a proto ji doporučuji k přijetí.

V Českých Budějovicích 23. 11. 2016

Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.