Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicíně

Biochemie a patobiochemie

UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Klára Chmelová

Vybrané genetické faktory ovlivňující průběh virových infekcí

v souvislosti s orgánovými transplantacemi

Selected genetic factors modifying the natural course of viral infections

in organ transplant settings

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: Doc. MUDr. Jan Šperl, CSc.

Praha 2022

Prohlášení:
Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.
Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.
V Praze, 14.09.2022

Klára Chmelová

Identifikační záznam:

CHMELOVÁ, Klára. Vybrané genetické faktory ovlivňující průběh virových infekcí v souvislosti s orgánovými transplantacemi. *[Selected genetic factors modifying the natural course of viral infections in organ transplant settings].* Praha, 2022. 86 s., 2 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Institut klinické a experimentální medicíny, Klinika hepatogastroenterologie. Vedoucí práce Šperl, Jan.

Poděkování

Především děkuji svému školiteli doc. MUDr. Janu Šperlovi, CSc. za dlouhodobé odborné vedení v průběhu Ph.D. studia, za pomoc s přípravou závěrečné práce, ale také za trvalou klinickou edukaci. Děkuji prof. Juliu Špičákovi, CSc. za laskavé poskytnutí podmínek k mému postgraduálnímu studiu. Velice děkuji prof. Milanu Jirsovi, CSc. za umožnění laboratorní části mého studia a vynikající edukaci v oblasti biochemie. V neposlední řadě patří velké poděkování MUDr. Soně Fraňkové, Ph.D. za mimořádnou ochotu a pomoc s přípravou publikací a klinickou edukaci. Dále děkuji MUDr. Mgr. Dušanu Mertovi za statistické zpracování dat, a zejména celé své skvělé rodině a Miroslavu Noskovi za podporu v průběhu studia. Velké poděkování patří i pacientům, kteří poskytli svůj biologický materiál k vyšetření.

Obsah

Seznam zkratek 8
Souhrn 10
Abstract 11
1. Úvod 12
1.1 Cytomegalovirus 14
Taxonomie, struktura a replikace viru CMV 14
Imunita proti CMV 17
Vrozená imunita 18
Obranné mechanismy viru proti vrozené imunitě 19
Adaptivní imunita 20
CMV u pacientů po SOT či HSCT 21
1.2 Virus hepatitidy B 23
Taxonomie, struktura a replikace viru HBV 24
Imunita proti HBV 30
Vrozená imunita 30
Adaptivní imunita 31
Operační tolerance a imunotolerance 34
1.3 Virus hepatitidy C 37
Taxonomie, struktura a replikace viru HCV 38
HCC a přežití po transplantaci 41
HCC a *PNPLA3* 42
2. Cíle práce 44
3. Metody 45
3.1 Stanovení replikace CMV 45
3.2 Stanovení HCV RNA a genotypu HCV 45
3.3 Genotypizace *IL28B* a *PNPLA3* 45
3.4 Genové exprese 46
3.5 Statistická analýza 46
4. Výsledky a komentáře 48
4.1 Alela T v rs12979860 v genu *IL28B* chrání před pozdním nástupem CMV nemoci u pacientů po transplantaci jater 48
Charakteristika souboru a metody 50
Manifestace CMV nemoci 52
Asociace mezi výskytem CMV nemoci a genotypem *IL28B*. 53
Evaluace protektivních faktorů 53

4.2 Nosiči alely G varianty rs738409 *PNPLA3* u pacientů s cirhózou C a genotypem viru 1b mají nižší virémii HCV a selhání jater v nižším věku 55
Charakteristika souboru a metody 55
Asociace genotypu *PNPLA3* s průběhem jaterního onemocnění 56
Rizikové faktory nutnosti LTx 58
HCV RNA před transplantací 59
4.3 Exprese transkriptů asociovaných s operační tolerancí u pacientů s HBV po transplantaci ledviny (dosud nepublikovaná data). 59
Charakteristika souboru a metody 60
Příjemci RTx s HBV mají vyšší expresi *GATA3*, *TCL1A, IL-10* a *TNF- α* 61
Efekt protivirové léčby na expresi genů asociovaných s operační tolerancí 62
Efekt dlouhodobé imunosupresivní léčby na expresi transkriptů spojených s OT 62
5. Obecná diskuze 63
6. Souhrn výsledků 67
7. Seznam vybraných prezentací a publikací 68
Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace 68
Publikace *in* extenso, bez vztahu k tématu disertace 68
Prezentace související přímo s Ph.D. 68
Ústní sdělení 68
Postery 69
Prezentace nesouvisející přímo s Ph.D. 69
Ústní sdělení 69
Postery 70
Kapitoly v monografiích 70
8. Seznam použité literatury 72

Seznam zkratek

AMK	Aminokyseliny
APC	Antigen prezentující buňky
cccDNA	Cirkulární kovalentně uzavřená DNA
cGAS	Cyclic guanosin monophosphate-adenosine monophosphate
CGI-58	Comparative gene identification-58
CMV	Cytomegalovirus
CLF	Chronické jaterní selhání
DC	Dendritické buňky
dsDNA	Dvouřetězcová DNA
E	Časné CMV geny
ER	Endoplazmatické retikulum
GATA3	GATA binding protein 3
HBV	Virus hepatitidy B
HCC	Hepatocelulární karcinom
HCV	Virus hepatitidy C
HHV	Lidský herpesvirus
HLA	Lidský hlavní histokompatibilní komplex
HSCT	Transplantace hematopoetických kmenových buněk
IE	Bezprostřední časné geny CMV
IFI16	Interferon inducible protein 16
IFN	Interferon
IL28B	Interleukin 28B
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	Interferonem stimulované geny
ISGF	Interferon stimulated genes factor
ISRE	IFN stimulated responsive elements
JAK	Janusova kináza
KIR	Killer immunoglobulin-like receptory
L	Pozdní CMV geny
LTx	Transplantace jater
MAPK	Mitogen-activated protein kináza

NF-κB	Nukleární faktor κB
NK	Natural killers
NLR	NOD-like receptory
NLS	Nukleární lokalizační signál
NTCP	Sodium taurocholate cotransporting polypeptide
OPD CMV	CMV při prolomení profylaxe
ORF	Otevřený čtecí rámec
OT	Operační tolerance
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PD1	Programmed death-1 receptor
pgRNA	progenitorová RNA
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domein-containing protein 3
PPD CMV	CMV nemoc po ukončení profylaxe
PRR	Pattern recognition receptor
rcDNA	Relaxovaná cirkulární DNA
RTx	Transplantace ledviny
SENP6	SUMO specific peptidase 6
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
SOT	Transplantace solidního orgánu
STAT	Přenašeč signálu a aktivátor transdukce
STING	Adaptorové proteiny stimulující interferonové geny
SVR	Setrvalá virologická odpověď
TBK1	TANK-binding kinase 1
TCL1A	T-cell leukemia/lymphoma protein 1A
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor α
TYK	Tyrosin-kináza
US	Unikátní krátká sekvence CMV
UL	Unikátní dlouhá sekvence CMV

Souhrn

Transplantace solidního orgánu představuje pro nemocné s orgánovým selháním naději na prodloužení života či jeho bezprostřední záchranu. Nese však s sebou zvýšené riziko řady infekčních i jiných komplikací a nutnost celoživotního užívání imunosupresivní léčby. Přežití transplantovaného orgánu a přežití příjemce ovlivňuje řada faktorů, mezi které patří celkový stav a věk v době transplantace, diagnóza, pro kterou byl nemocný transplantovaný, rozvoj rejekce štěpu, rozvoj metabolického syndromu i závažné infekční komplikace, včetně virových onemocnění. Virové infekce mohou mít u imunosuprimovaných jedinců velmi různorodý klinický průběh, některé díky imunoaktivaci mohou způsobovat rejekci štěpu, jiné naopak mohou být naopak asociované s imunotolerancí. Naším cílem bylo identifikovat vliv variant vybraných genů na průběh některých virových onemocnění u příjemců orgánů a tím i na jejich potransplantační průběh, morbiditu a přežití štěpu.

Cytomegalovirová (CMV) infekce je nejčastější virovou infekcí u příjemců transplantovaných orgánů. Zabývali jsme vlivem genotypu lokusu rs12979860 (C/T) genu *IL28B* na riziko rozvoje CMV nemoci. Prokázali jsme, že alela T je asociovaná s častějším výskytem CMV nemoci u pacientů po transplantaci jater (LTx), kteří ukončili profylaktickou protivirovou léčbu. Dále jsme u pacientů s jaterní cirhózou C infikovaných genotypem HCV 1b analyzovali vliv polymorfismu lokusu *PNPLA3* rs738409 (C/G) na virémii (HCV RNA) před transplantací jater a na incidenci hepatocelulárního karcinomu (HCC) v cirhotických játrech. Zjistili jsme, že pacienti transplantovaní pro chronické jaterní selhání (CLF) byli významně mladší a měli těžší dysfunkci jater než pacienti transplantovaní pro HCC. Nosičství alely G zvyšovalo riziko LTx pro CLF v recesivním i alelickém modelu i v multivariantní analýze. Homozygoti GG měli i přes rychleji progredující chorobu jater významně nižší virémii HCV před transplantací ve srovnání s nosiči nejméně jedné alely C. Nakonec jsme hodnotili expresi transkriptů asociovaných s operační tolerancí (OT) u pacientů bez a s chronickou HBV infekcí po transplantaci ledviny. Pacienti s HBV infekcí měli vyšší expresi genů *GATA3, TCL1A, IL-10* a *TNF-α*, které jsou asociované s OT, a nižší expresi *SENP-6*. Popsaný transkripční profil je kompatibilní s OT a vysvětluje vynikající přežití příjemců s léčenou HBV infekcí i jejich štěpů ledviny.

Klíčová slova: CMV, HCV, HBV, virové infekce, genové varianty, orgánové transplantace.

Abstract

Solid organ transplantation (SOT) represents a life-saving procedure and a future perspective for patients suffering from organ failure. On the other hand, SOT recipients are burdened with numerous complications, including infections or lifelong administration of immunosuppressive medication. There are several well-known factors related to graft and patient survival, including general health status, age at the time of SOT, diagnosis leading to SOT, acute or antibody-mediated rejection, development of the metabolic syndrome and complications including viral diseases. Viral infections in SOT recipients may present with a very distinct natural history compared with the healthy population. Several can cause immune activation leading to graft rejection; others can be associated more likely with immune tolerance. We aimed to identify the impact of variants of selected genes on the natural history of various viral diseases in SOT recipients and thus their overall outcome, morbidity and graft survival.

Cytomegalovirus (CMV) infection is the most common viral infection in SOT recipients. We focused on the role of the *IL28B* rs12979860 locus genotype in the risk of CMV disease occurrence. We proved the T allele is associated with a more frequent occurrence of CMV disease in liver transplant (LTx) recipients after cessation of antiviral prophylaxis. Subsequently, we analysed the impact of SNP rs738409 C/G (I148M) in *PNPLA3* on the viral load before LTx and hepatocellular carcinoma (HCC) incidence in patients with liver cirrhosis caused by genotype 1b HCV infection. We demonstrated that patients transplanted for chronic liver failure (CLF) were significantly younger and had more severe dysfunction than patients transplanted for HCC. Allele G increased the risk of LTx for CLF in both the allelic and the recessive models. Genotype GG carriers had lower HCV viral load than those carrying at least one allele C. Ultimately, we evaluated expression of transcripts associated with operational tolerance (OT) in kidney transplant recipients with or without HBV infection. Patients with HBV infection had higher expression of *GATA3, TCL1A, IL-10* and *TNF-α* and lower expression of *SENP-6*. The above-described transcription profile was compatible with OT and concordant with excellent survival of kidney recipients with HBV infection and renal grafts in these recipients.

Keywords: CMV, HCV, HBV, viral infections, gene variants, organ transplantations.

1. Úvod

Každý rok je celosvětově provedeno asi 130 tisíc transplantací solidních orgánů (SOT), dvě třetiny přitom připadají na Evropu a USA (Statista 2022). V průběhu poslední dekády došlo k výraznému zlepšení přežití štěpů i příjemců díky vysoce účinné imunosupresivní léčbě (Jain et al. 2000).

Vliv na potransplantační průběh má však řada faktorů. V první řadě hraje roli celkový zdravotní stav jedince v době transplantace, původní diagnóza, která vedla k nutnosti transplantace, v případě transplantace jater přítomnost hepatocelulárního karcinomu (HCC), rozvoj akutní celulární nebo protilátkami zprostředkované rejekce štěpu, přítomnost závažných infekčních onemocnění či rozvoj metabolického syndromu a kardiovaskulárních chorob (Kobashigawa et al. 2019; Mazzaferro et al. 2009; Choudhary et al. 2017).

Virové infekce mají vliv jak na předtransplantační průběh a komplikace (např. chronická HBV a HCV infekce), tak na potransplantační průběh (CMV a další oportunní infekce) a jejich úspěšné zvládnutí je nezbytným předpokladem dlouhodobé a stabilní funkce štěpu (Kusne and Blair 2006).

V současnosti je k dispozici velmi účinná protivirová léčba, která umožňuje nemocným s HBV i HCV infekcí podstoupit SOT. V případě jater jsou tyto infekce samy o sobě příčinou transplantace, ať už z důvodu dysfunkce cirhotických jater či rozvoje HCC, který ovšem může (zejména jedná-li se o předem neznámý, tzv. incidentální HCC) zhoršit naději na dlouhodobé přežití (Senkerikova et al. 2014). V případě transplantace ostatních orgánů je zcela nezbytné dosáhnout před výkonem negativní virémie, v případě HCV pacienta vyléčit (dosáhnout setrvalé virologické odpovědi, tj. negativní virémie 12 či 24 týdnů od ukončení léčby znamená eliminaci viru).

V minulosti neléčená chronická HBV infekce významně zhoršovala přežití štěpu ledviny i příjemců štěpu (Mathurin et al. 1999). Nepříznivý efekt HBV infekce byl zcela eliminován díky vysoce účinné protivirové léčbě. Co však stojí za pozornost je skutečnost, že pacienti s léčbou suprimovanou HBV infekcí nejen že nemají horší přežití, ale ukazuje se, že jejich 10leté přežití významně převyšuje pacienty bez HBV infekce (Cosconea et al. 2012; Sperl et al. 2013).

Imunosupresivní léčba zásadním způsobem ovlivňuje průběh virových onemocnění u oportunních infekcí, jako je cytomegalovirová (CMV) nemoc, a je nejdůležitějším předpokladem k jejich rozvoji. Průběh CMV nemoci může být zcela asymptomatický, může mít příznaky podobné infekční mononukleóze, ale může také způsobit závažné orgánové postižení či rozvoj akutní rejekci štěpu (Razonable 2005). V časném potransplantačním období je obvyklé podávání profylaktické protivirové léčby, které je však nutno ukončit nejpozději po 6 měsících. Poté však hrozí rozvoj tzv. pozdní CMV (PPD, **p**ost-**p**rofylaxis **d**isease) nemoci se stejnými možnými následky.

Průběh před i po SOT je do značné míry ovlivněn nosičstvím variant některých genů, které označujeme jako geny modifikující vývoj chronických chorob jater. Prvním známým modifikujícím genem byl gen *IL28B* kódující interferon lambda 3 (IFNL3), konkrétně jeho varianta rs12979860 T (Ge et al. 2009). Nosičství alely T asociované se schopností exprimovat interferon lambda 4 (IFNL4) (Prokunina-Olsson, 2013) snižovalo šanci na vyléčení chronické HCV infekce před i po transplantaci jater interferonem α (IFN-α). Nevyléčení jedinci měli vysoké riziko rozvoje chronického selhání jater s nutností transplantace jater i výrazně horší dlouhodobé přežití po transplantaci. Význam genu *IL28B* upadl se zavedením přímo působících antivirotik (DAA) do léčby, jejichž efekt není na variantách *IL28B* závislý.

Za vůbec nejsilnější modifikující gen v hepatologii je považovaný gen *PNPLA3*, jehož variantní alela rs738409 G podmiňující aminokyselinovou záměnu I148M predisponuje ke steatóze jater (Romeo et al. 2008). Desítky dalších studií potvrdily asociaci variantní alely G s non-alkoholickou steatohepatitidou (NASH), jaterní cirhózou i její vliv na progresi jaterních chorob jiné etiologie a vysvětlily molekulární mechanismus, kterým dochází ke zvýšené akumulaci tuků v játrech.

V posledních 3 letech je pozornost věnována genu *SERPINA1*. Nosiči obou mutovaných alel polymerující varianty Z odpovědné za poškození jaterních buněk (homozygoti ZZ) mohou mít jak jaterní lézi, tak plicní příznaky plazmatického deficitu α-1-antitrypsinu. Heterozygoti pro alelu Z tyto projevy nemají, ale rychleji se u nich vyvíjí jaterní cirhóza, trpí-li NASH nebo alkoholovou chorobou jater (Strnad et al. 2019).

1.1 Cytomegalovirus

Infekce lidským CMV představuje nejčastější oportunní virovou infekci u imunokompromitovaných jedinců. Zvyšuje morbiditu a mortalitu pacientů po SOT, nejčastěji v časném pooperačním období, kdy také při probíhající infekci hrozí častěji akutní celulární rejekce štěpu. Strategie univerzální profylaxe protivirovou léčbou časně po transplantaci toto riziko významně snižuje, nicméně po ukončení profylaxe nastupuje riziko rozvoje pozdní CMV infekce (EASL 2016).

Taxonomie, struktura a replikace viru CMV

Lidský CMV je ubikviterní herpesvirus, který má po primoinfekci schopnost perzistovat v organismu v latentní formě. Séroprevalence CMV se celosvětově významně liší, negativně koreluje se socioekonomickým statusem a pohybuje se od 40 % v západní Evropě až po více než 90 % v rozvojových zemích. Séroprevalence se také zvyšuje s věkem (Cannon, Schmid, and Hyde 2010). Replikace CMV probíhá v řadě epiteloidních buněk, v myeloidních buňkách kostní dřeně pak virus udržuje latentní infekci (Sinzger, Digel, and Jahn 2008). Mezilidský přenos je zajištěn tělními tekutinami, pohlavním stykem či transplantovaným orgánem (Evans 1978). V případě intrauterinní infekce může nést plod závažné následky, jako je hluchota či mentální retardace (Kenneson and Cannon 2007). Primoinfekce i reaktivace mohou mít u imunosuprimovaných nemocných různě těžký průběh, od asymptomatických infekcí až po život ohrožující onemocnění. Profylaxe i léčba CMV infekce jsou proto důležitými body v péči o pacienty po SOT, po transplantaci krvetvorných kmenových buněk (HSCT) či o HIV pozitivní pacienty.

CMV je dle Baltimorovy klasifikace v I. třídě. Je to dsDNA virus patřící do čeledi *Herpesviridae*, která má 3 podčeledi (Baltimore 1971; Koonin, Krupovic, and Agol 2021). Jejich základní charakteristikou je velký genom a schopnost navodit perzistující (latentní) infekci. CMV patří do podčeledi betaherpesvirinae, je pro něj typický dlouhý životní cyklus, malá škála hostitelů a latentní cyklus v mononukleárních leukocytech, v myeloidních buňkách i v buňkách vývodů žláz (Mocarski 2013). Typické je nápadné zvětšení infikovaných buněk (cytomegalia).

Maturovaný virion je poměrně velký (200–300 nm) a sestává z jedné kopie dsDNA a jeho nukleokapsidy, amorfní hmoty zvané tegument a obalu viru. Genom

obsahuje více než 165 známých genů, které jsou označované dle pozice v genomu a pořadovými čísly.

Kapsida viru má rozměr 135 nm a ikosahedrální symetrii s triangulačním číslem T=16, značícím vysokou komplikovanost struktury kapsidy (Yu et al. 2017). Ta je tvořena 5 integrálními proteiny: majoritním proteinem MCP (UL86), minoritním kapsidovým proteinem (UL85), minoritním vazebným proteinem (UL46), malým kapsidovým proteinem SCP (UL48/49) a portálním PORT proteinem (UL104). Tyto proteiny tvoří 162 kapsomer, z toho 150 hexamerů tvořících triangulární plochu a 12 pentamerů tvořících vrcholy ikosaedru (Borst et al. 2001).

Tegument je prostor mezi nukleokapsidou a lipidovým obalem. V elektronovém mikroskopu má amorfní strukturu, byť jakási architektonika proteinů v blízkosti kapsidy byla popsána (Butcher et al. 1998). Tegument obsahuje desítky virových proteinů, které jsou obvykle fosforylované, a proto často označované jako pp. Po fúzi virionu s buněčnou membránou některé proteiny zůstávají v cytoplazmě, zatímco jiné směřují rychle do buněčného jádra (např. pp65 a pp71). Proteiny, které jsou vázané ke kapsidě, umožňují její migraci k jádru podél mikrotubulů (Kalejta 2008). Nejznámějším proteinem je pp65, který je důležitým cílem humorální i buněčné imunity. Na druhé straně však zprostředkovává fosforylaci virových proteinů ze skupiny bezprostředních časných a znemožňuje tak jejich prezentaci molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (HLA) I. třídy. Průkaz pp65 byl v minulosti široce využíván k diagnostice CMV infekce.

Obal viru je tvořený lipidovou dvojvrstvou, která obsahuje několik povrchových glykoproteinů, označovaných jako gB, gM, gN, gH, gL a gO, které mají zásadní úlohu při vstupu virionu do buněk. CMV dokáže infikovat celou řadu buněk, jako fibroblasty, buňky epitelu, lymfocyty, monocyty či makrofágy. Právě proteiny obalu viru hrají důležitou roli v tropismu viru (Wang and Zhao 2020).

Lineární dsDNA (Obr. 1) se skládá z přibližně 230 kbp a zhruba 165 genů, což představuje největší genom ze všech lidských herpesvirů. Obsahuje 2 unikátní oblasti - dlouhou (unique long, UL) oblast na 5´ konci a krátkou (unique short, US) oblast na 3´ konci. Oba tyto úseky jsou potom ohraničené párem repetitivních sekvencí, které jsou označované jako *a, b* a *c* (označení *a´, b´* a *c´* odpovídá invertní sekvenci). UL je ohraničen sekvencemi *ab* a *b´a´*, proto jsou označované jako terminální a invertovaná

repetice dlouhého úseku (TRL/IRL), zatímco US je ohraničen sekvencemi *a´c´* a *ca* (IRS/TRS) (Marti-Carreras and Maes 2019).

Obrázek 1. Schéma uspořádání genomu CMV, převzato z (Balazs et al. 2017)

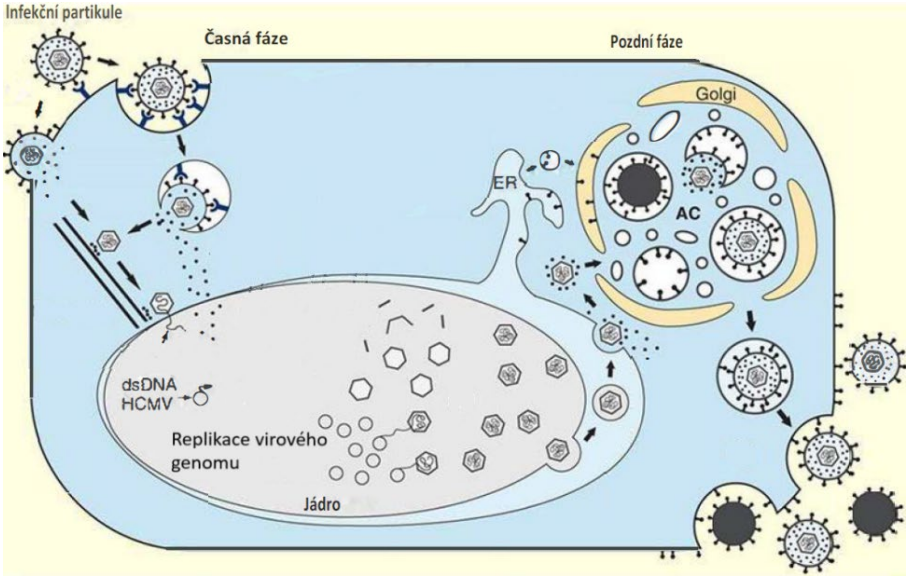
Genom je tvořen třemi skupinami genů, které jsou označené jako bezprostřední časné (IE), časné (E) a pozdní (L). Produkty exprese IE genů slouží především k úpravě vnitřního prostření intracelulárně, k regulaci a navození lytické fáze replikace viru. Část těchto produktů je také obsažena již v tegumentu. Geny skupiny E slouží k vlastní replikaci viru a L geny tvoří strukturální proteiny.

Po fúzi virového obalu dochází k transportu kapsidy k buněčnému jádru pomocí mikrotubulů (Obr. 2). CMV zahajuje svoji replikaci nejprve transkripcí IE genů, poté E a nakonec L genů. Jedním z nejdůležitějších aktivátorů exprese E genů je IE2, který působí zároveň inhibičně na expresi ostatních IE genů. Jeho transkripce je transaktivovaná proteiny tegumentu (např. pp71). Primární role IE genů spočívá v transaktivaci replikačních (tedy E) genů. Samotná amplifikace virové DNA se odehrává mezi expresí E a L genů. Replikace viru je relativně pomalá, dochází k ní zhruba 24-72 hodin po infekci buňky (Wang and Zhao 2020). Přibližně ve středu UL oblasti se nachází iniciální místo replikace, označené jako *ori*Lyt (Anders et al. 1992). Nejprve se přepisuje 6 genů nezbytných pro samotnou replikaci: *UL54* (DNA polymeráza), *UL44* (faktor zajišťující procesivitu DNA polymerázy), *UL57* (SSB, single-stranded DNA binding protein), *UL70* (primáza), *UL102* (faktor asociovaný s primázou) a *UL105* (helikáza) (Zarrouk, Piret, and Boivin 2017; Alvisi et al. 2011). V úvodu dochází k cirkularizaci virové DNA, která směruje transaktivátory k místu počátku replikace a dochází k její inicializaci. Replikace probíhá nejprve théta mechanizmem, až později mechanizmem valivé kružnice. K dokončení syntézy a „odštípnutí“ virové DNA je nezbytný produkt genu *UL77*, ke sbalení a formaci DNA do nukleokapsidy je potom nezbytná účast PORT proteinu pUL104 (Borst et al.

2016; Koppen-Rung, Dittmer, and Bogner 2016). K přenosu nově vzniklé kapsidy je přes jadernou membránu je nutná tvorba heterodimeru NEC (nuclear egress complex), který ve spolupráci s pUL97 (proteinkináza) zajišťuje disrupci laminu A/C nukleární membrány a umožňuje tak průnik kapsidy zpět do cytoplazmy. Ke sbalení viru je potom zapotřebí tvorba tzv. VAC (viral assembly complex), kde probíhá tvorba tegumentu a obalu.

Virus dále ustanovuje latentní fázi v hematopoetických progenitorových buňkách kostní dřeně (CD34+), v monocytech (CD14+), v dendritických buňkách a megakaryocytech. V těchto buňkách nedochází k aktivní replikaci viru, ale slouží spíše jako rezervoáry. Mechanizmus navození latentní fáze infekce nebyl doposud spolehlivě popsán. V této fázi se virová DNA replikuje společně s hostitelskou DNA (Goodrum 2016). Spouštěčem lytického cyklu může být zánět či imunokompromitace nemocného. Nezbytnou úlohu zde pravděpodobně má TNF-α, který zřejmě cestou proteikinázy C a nukleárního faktoru κB (NF-κB) způsobuje opětovnou aktivaci a transkripci IE genů.

Obrázek 2. Schéma životního cyklu CMV, upraveno dle (Jean Beltran and Cristea 2014)



AC- assembly complex (místo tvorby tegumentu a obalu viru)

Imunita proti CMV

Imunita proti CMV infekci je podmíněna několika typy životního cyklu viru a dlouhodobým „tvarováním“ v interakci s hostitelem. Primární infekce je u CMV naivních a zdravých jedinců ve velké většině případů zcela asymptomatická, proto jsou i studie

imunitních dějů velmi vzácné, v mnoha ohledech je proto zapotřebí se opírat o animální a *in vitro* modely (Picarda and Benedict 2018). Dalšími fázemi jsou latentní infekce a případně také reinfekce při setkání s novým řetězcem viru. Klinicky významné je onemocnění zejména u těhotných žen, neboť CMV je nejčastější příčinou vrozených infekcí, a u imunokompromitovaných jedinců (Rawlinson et al. 2017). Po vstupu viru do buňky dojde hostitelskou buňkou k rozpoznání virionu a aktivaci několika mechanizmů a buněčných drah vrozené imunitní odpovědi (Navarro 2016). Ty především zahrnují zánětlivé cytokiny, interferony I. typu (IFN-I) a up-regulaci kostimulačních molekul, které jsou klíčové ke zpomalení patogenu a připravení dokonalejší adaptivní imunity.

Vrozená imunita

Infikované buňky detekují přítomnost cizorodé DNA velmi časně a již asi 4–8 hodin po infekci dokáží produkovat IFN-I a aktivovat složku intrinzické intracelulární imunity, tzv. restrikční faktory (RF, např. IFI16) (Unterholzner et al. 2010; Biolatti, Gugliesi, et al. 2018; Dell'Oste et al. 2014). Ty zajišťují první obrannou linii tím, že jsou trvale přítomné a aktivované v buňce již před vstupem viru do buňky a váží se na řadu molekul, včetně signalizačních a regulačních (Orzalli and Knipe 2014). Detekce patogenů je v dikci různorodých molekul, tzv. PRRs (pattern recognition receptors). Mezi ně patří mj. TLR (Toll-like receptory), jenž umí rozeznat celou škálu patogenních struktur včetně virů (Brubaker et al. 2015). V případě CMV se jedná o TLR2, který rozeznává glykoproteiny gH a gB na jejich povrchu. Jejich adaptorovým proteinem je MyD88. Výsledkem je aktivace NF-κB a poté produkce řady cytokinů (např. IFN-β, IL-6, IL-8, TNF-α) (Oliveira-Nascimento, Massari, and Wetzler 2012; Barbalat et al. 2009). Některé varianty typu SNP v genu pro TLR2 byly popsané v asociaci s častějšími klinicky významnými infekcemi u imunokompromitovaných osob, např. právě u CMV.

Dalšími PRR jsou CD14 receptory, NLR (NOD-like receptory), většina receptorů pro DNA fragmenty, jako TLR3, TLR9 či cytosolové cGAS (cyclic guanosin monophosphate-adenosine monophosphate). cGAS jsou relativně recentně popsané PRR, které dokáží indukovat expresi IFN-I. Po detekci virové DNA produkují druhé posly, jejichž klíčovými partnery jsou adaptorové proteiny stimulující interferonové geny, tzv. STING, na endoplazmatickém retikulu (ER) (Bhat and Fitzgerald 2014; Burdette and

Vance 2013; Dobbs et al. 2015). Následně cestou fosforylace TBK1 (TANK-binding kinase 1) a v dalším kroku fosforylace a nukleární translokace fosforylovaného IRF-3 (interferon regulatory factor 3) dojde ke zvýšené expresi IFN-I, především IFN-β, a k uvolnění proinflamatorních cytokinů a chemokinů (Dell'Oste et al. 2020).

Obranné mechanismy viru proti vrozené imunitě

CMV si v průběhu evoluce vytvořil řadu možností manipulace a únikových dovedností proti interferonové odpovědi. Jeden z těchto mechanismů představuje tegumentový protein pp65 (neboli UL83), který se váže na cGAS a zřejmě zabraňuje jeho interakci se svým adaptorem STING. Výsledkem je nedostatečný efekt NF-κB na protivirovou odpověď (Biolatti, Dell'Oste, et al. 2018). Podobnou úlohu má další tegumentový protein pp71 (UL82), který inhibuje nezbytnou translokaci STING z ER do perinukleárních mikrosomů či US9 bránící jeho dimerizaci a následné aktivaci IRF-3 (Choi et al. 2018; Abate, Watanabe, and Mocarski 2004). Aktivaci interferonové odpovědi však účinně brání i produkty IE genů CMV. Jedním z nich je IE86, který na jedné straně brání NF-κB v jeho vazbě na promotor IFN-β, na druhé straně zvyšuje degradaci STING v proteazomech. Je tedy zřejmé, že virus evolučně vyvinul velmi účinné mechanismy obrany proti vrozené imunitě.

Aktivace vrozeného imunitního systému zahrnuje také zapojení APC (antigen prezentujících buněk) a NK (natural killer) buněk. První jmenované, tedy monocyto-makrofágový systém a dendritické buňky (DC), hrají důležitou roli v aktivaci T-buněčné odpovědi (La Rosa and Diamond 2012). Na druhé straně jsou to právě tyto buňky, které vytvářejí prostředí pro iniciální replikaci viru v organismu a zároveň jsou vhodné k navození latentní fáze replikačního cyklu (Sinzger, Digel, and Jahn 2008). Oproti tomu lymfoidní komponenty, tedy NK buňky a pDC (plazmocytoidní DC), jsou vůči CMV infekci rezistentní a dále podporují imunitní odpověď.

Také NK buňky jsou považovány za pojítko mezi vrozenou a získanou imunitou pro jejich dovednost rychlé cytotoxické reakce (podobně jako makrofágy), ale zároveň také schopnosti produkce IFN-γ, granzymů či perforinů (podobně jako T-lymfocyty) (Romagnani et al. 2005). Je pravděpodobné, že spektrum jimi produkovaných cytokinů má za následek maturaci adaptivní imunity, a to zejména T buněk.

Adaptivní imunita

Po navození primární CMV infekce jsou virové částice zpracovány APC buňkami, které stimulují antigen-specifickou obrannou odpověď. U zdravých jedinců je adaptivní imunitní reakce jedna z nejpotentnějších známých u lidí a zahrnuje jak humorální, tak celulární složku (La Rosa and Diamond 2012; van de Berg et al. 2008). Rozvoj adaptivní imunity je nezbytný k potlačení a kontrole primární infekce, po které virus přechází do fáze latentní. Sledování adaptivní odpovědi u zdravých jedinců je poměrně náročné vzhledem k obvykle asymptomatickému průběhu. Většinou je tak sledování pacientů dokumentováno u CMV-naivních příjemců štěpů ledviny od séropozitivních dárců. Udržení dlouho trvající adaptivní imunity je klíčem k udržení viru v latentní fázi a prevenci reaktivace, tedy obnovení lytické fáze cyklu. T-lymfocyty jsou však cílem většiny základních imunosupresivních léků, což často vede k nekontrolované replikaci CMV a mnohdy klinicky významné morbiditě a vyšší mortalitě nemocných (Limaye et al. 2006; Griffiths et al. 2008). Během primární infekce dochází k produkci celé řady protilátek proti specifickým antigenním strukturám viru. Mezi ně patří strukturální tegumentové proteiny (zejména pp65), glykoproteiny obalu viru (gH, gB a další) i nestrukturální proteiny (např. IE1) (Gerna et al. 2008; Macagno et al. 2010). Cílem neutralizačních protilátek je zabránit zejména diseminaci viru a rozvoji klinických projevů. Asi nejúčinnějším aspektem úspěšné obrany je ale CMV-specifická T buněčná odpověď. Četnost specifických T-buněk je enormní, CD4+ a CD8+ buňky představují asi 10–20 % celkového počtu cirkulujících T-buněk u CMV séropozitivních jedinců, což je násobně více než u jiných virových onemocnění (Sylwester et al. 2005). V podobné míře je můžeme vidět prakticky jen u aktivní infekce virem HIV. Ani takto masivní odpověď však nedokáže virus eliminovat či zabránit přenosu viru. Buněčná odpověď se mezi jednotlivci do značné míry liší. Podle nejrozsáhlejší studie dokázaly T-buňky u některých jedinců rozeznávat jediný otevřený čtecí rámec (ORF) CMV, zatímco u jiných jedinců jich bylo až 39 (Sylwester et al. 2005). Většina studií však zahrnuje především ORF UL83 (pp65) a UL123 (IE) specifické T-buňky, které jsou přítomny u více než 50 % CMV séropozitivních osob (Wang et al. 2008). Asi 7 dnů po vrcholu replikace CMV začínají CD4+ T-buňky produkovat Th1 cytokiny, zejména TNF-α a IFN-γ, následně jsou v periferní krvi detekovatelné CD8+ T-buňky (van Leeuwen, ten Berge, and van Lier 2007). Velká část

těchto virus-specifických lymfocytů nese znaky recentně aktivovaných naivních T-buněk (CD45RA, CD45R0, nukleární marker Ki67). Tyto prvotní T-buňky produkují granzym B a perforiny, díky kterým jsou schopny způsobit lýzu cílových buněk (Hertoghs et al. 2010).

CMV u pacientů po SOT či HSCT

CMV patří mezi nejčastější oportunní patogeny u pacientů po SOT i HSCT díky oslabené imunitní odpovědi a snížené schopnosti potlačit virovou replikaci. Většina imunosupresivních režimů je založena především na oblenění T-buňkami zprostředkované odpovědi ve snaze zabránění rejekce štěpů. Tato imunosupresiva oslabují jak CD8+, tak CD4+ lymfocytární reakci, resp. v již v časném potransplantačním období dochází ke snížení jejich počtu. Jedním z prokázaných jevů symptomatické CMV infekce u imunokompromitovaných jedinců je významně opožděný nástup specifických CD4+ lymfocytů (Gamadia et al. 2003). V případě snížení počtu CD4+ T buněk dochází k omezení kontroly replikace viru těmito buňkami (Sester et al. 2001). Dalším faktorem oslabujícím imunitní odpověď je také zvýšená exprese protizánětlivého cytokinu IL-10 a upregulace inhibičního receptoru PD-1 (programmed death-1 receptor) (Krishnan et al. 2010). Právě takový efekt může způsobit nekontrolovanou replikaci CMV, jejímž následkem může být až život ohrožující orgánové poškození. V časném potransplantačním období jsou pacienti často monitorováni a v mnoha případech užívají protivirovou profylaxi, která nese riziko nežádoucích účinků (především myelosuprese). Protivirové léky sice mohou zajistit účinnou prevenci CMV infekce časně po transplantaci, nicméně zvyšuje se riziko pozdní CMV infekce po ukončení profylaxe. Jeden z nejvíce rozhodujících faktorů je zde předtransplantační sérostatus dárce a příjemce, kde právě pozdní infekce je nejčastěji problémem séronegativních příjemců štěpu od séropozitivních dárců (celkem asi 30 % případů).

Do popředí se tak do značné míry může dostávat imunita vrozená, včetně aktivity interferonů a následné exprese interferonem stimulovaných genů (ISG). IFN-I zajišťují intracelulární obranu proti všem typům herpesvirů ve fibroblastech, buňkách endotelu i epitelového původu, konkrétně cestou svých receptorů IFNAR1/2, které jsou asociované s tyrosinkinázou TYK2 a Janusovou kinázou JAK1. Vznikem receptorového dimeru dochází k autofosforylaci JAK1, která fosforyluje a aktivuje přenašeče signálu a aktivátory transdukce STAT1 a STAT2. Ty potom společně s IRF-9 tvoří transkripční komplex ISGF-3

(IFN-stimulated gene factor 3), který se přesouvá do buněčného jádra na odpovídající oblasti ISRE (IFN-stimulated responsive elements) v promoterech pro ISG (Mazewski et al. 2020; Lukhele, Boukhaled, and Brooks 2019). Tato JAK/STAT dependentní dráha je označovaná tradičně jako kanonická nebo klasická. Další možností jsou potom tzv. nekanonické dráhy, které využívají signalizaci prostřednictvím MAPkináz anebo PI3K/mTOR (fosfatidylinositol-3-kináza/mammalian target of rapamycin, PI3K je serin/threoninová kináza). I nekanonické dráhy mají efekt na transkripci ISG (Saleiro and Platanias 2019).

V rámci své aktivity se spektrum působení IFN-λ (tedy IFN-III) do určité míry překrývá s IFN-α. Mají podobnou protivirovou, ale menší proinflamatorní odpověď. Mezi jejich zástupce tradičně patřily IFNL1 (IL29), IFNL2 (IL28A) a IFNL3 (IL28B). Jejich signál je však přenášen odlišnými receptory než u IFN-I a II, a to heterodimerním receptorem tvořeným IFNLR1 a IL10R2 (Kotenko et al. 2003). Vysokoafinitní podjednotka IFNLR1 je zodpovědná za kanonickou dráhu transdukce a je exprimována prakticky výhradně v epiteloidních buňkách, včetně hepatocytů (Donnelly and Kotenko 2010). INF-III mají podobnou efektivitu v indukci ISG a na rozdíl od INF-I a II zde žádná nekanonická dráha nebyla dosud popsána a dle dostupných dat je její existence nepravděpodobná (Lunova et al. 2021).

IFN-λ jsou dobře známé zejména v souvislosti s hepatitidou C. Cluster několika SNP, jako například rs12979860, rs8099917 a dalších, byl popsán v nekódující oblasti v blízkosti genu *IFNL3* v souvislosti s vyšší spontánní eliminací viru či úspěšnější léčbou pegylovaným interferonem α a ribavirinem (Ge et al. 2009; Suppiah et al. 2009). Prokunina-Olsson potom ve své práci poprvé popsala varianty ΔG/TT dinukleotidového polymorfismu rs368234815 (Prokunina-Olsson et al. 2013). Zjistila, že je v silné genové vazbě s výše zmíněným rs12979860 (varianty C/T), a tvoří jiný otevřený čtecí rámec (ORF) pro nově objevený gen *IFNL4*. Ten ve své variantě ΔG tvoří funkční protein, zatímco ve variantě TT dochází k posunu ORF, vzniku předčasného stop kodonu a expresi nefunkčního proteinu. Dále bylo popsáno, že přítomnost alely T v SNP rs12979860 je spojena s vyšší bazální expresí ISG, ale při stimulaci exogenním IFN-α již nedochází k dalšímu zvýšení, a to jak u pacientů, tak *in vitro* v případě varianty ΔG v genu pro INFL4 (Noureddin et al. 2015; Terczynska-Dyla et al. 2014). Jejich asociace s průběhem dalších virových onemocnění je předmětem debaty.

1.2 Virus hepatitidy B

Virus hepatitidy B byl objevený v roce 1965 Baruchem Blumbergem, který poprvé popsal jeho povrchový antigen (HBsAg) v séru australského Aboriginee (odtud označení Australský antigen) (Blumberg, Alter, and Visnich 1965). Virové částice byly poprvé zobrazeny v elektronovém mikroskopu v roce 1970 (Dane, Cameron, and Briggs 1970). Virem hepatitidy B je celosvětově infikováno asi 290 milionů osob (HBsAg pozitivních), prevalence infekce se však významně liší, v řadě endemických oblastí dochází postupně k jejímu snižování díky dostupnosti vysoce účinné virostatické léčby i vakcín. Na druhou stranu se nedaří ani ve vyspělých státech onemocnění zcela eliminovat (WHO ; Mahoney 1999). Největší problém představuje HBV infekce pro Jihovýchodní Asii, Jižní Pacifik, Subsaharskou Afriku a Střední východ. V ČR jsou poslední data dokumentovaná z roku 2001, kdy byla séroprevalence HBsAg 0,5 %, anti-HBc je však desetinásobná (Nemecek et al. 2003). Pacient nakažený v dětském či mladém věku má oproti dospělému velmi vysoké riziko přechodu infekce do chronicity. Virus sám o sobě není cytopatogenní, infekce HBV je proces dynamický a odráží interakci mezi replikací viru a imunitní odpovědí hostitele. Ne všichni pacienti s chronickou infekcí HBV tedy mají hepatitidu (Ganem and Prince 2004). Přirozený průběh byl rozdělen do 5 fází (Tab. 1), které se určují dle přítomnosti HBsAg, HBeAg, HBV DNA, aktivity alaninaminotransferázy a dle stupně nekroinflamatorní aktivity v játrech. Fáze na sebe nemusí zcela navazovat a mají velmi variabilní délku trvání (EASL 2017). Z pohledu klinika je nezbytné identifikovat pacienty se známkami chronické hepatitidy (HBeAg pozitivní i negativní) a takové pacienty léčit, neboť právě tyto fáze představují největší riziko progrese onemocnění do jaterní cirhózy či rozvoje HCC. Mimo to může HBV také způsobovat extrahepatální manifestace zprostředkované vznikem cirkulujících imunokomplexů s celou škálou klinických projevů, od glomerulonefritidy, přes vaskulitidu, kožní purpuru, artralgie, periferní neuropatii až po polyarteritis nodosa.

Tabulka 1. Fáze chronické HBV infekce dle staré a nové nomenklatury, převzato z (EASL 2017)

	HBeAg pozitivní		HBeAg negativní		
	Fáze 1	**Fáze 2**	**Fáze 3**	**Fáze 4**	**Fáze 5**
	Chronická HBV infekce	**Chronická hepatitida B**	**Chronická HBV infekce**	**Chronická hepatitida B**	**Vyléčená HBV infekce**
HBsAg	Vysoká	Vysoká/střední	Nízká	Střední	Negativní
HBeAg	Pozitivní	Pozitivní	Negativní	Negativní	Negativní
HBV DNA	>10^7 IU/ml	10^4–10^7 IU/ml	<2000 IU/ml*	>2000 IU/ml	<10 IU/ml‡
ALT	Normální	Zvýšená	Normální	Zvýšená†	Normální
Hepatitida	Žádná/mírná	Střední/těžká	Žádná	Střední/těžká	Žádná§
Předchozí názvy	Imutolerance	Imunoreaktivita HBeAg pozitivní	Inaktivní nosič	HBeAg negativní chronická hepatitida	HBsAg negativní /anti-HBc pozitivní

Taxonomie, struktura a replikace viru HBV

Virus hepatitidy B patří dle Baltimorovy klasifikace do VII. třídy, tedy dsDNA virů s reverzní transkriptázou (Baltimore 1971). Náleží do čeledi *Hepadnaviridae*, která zahrnuje rody Avihepadnaviry, která je geneticky starší a patří pod ni řada virů napadajících ptáky, Herpetohepadnaviry, Metahepadnaviry, Parahepadnaviry a Orthohepadnaviry. Mezi poslední jmenované se řadí viry napadající savce, a to zejména hlodavce, primáty a člověka, včetně lidského HBV. Pro všechny zástupce čeledi je typický poměrně malý kompaktní genom s překrývajícími se ORF. *Hepadnaviridae* mají následující společné rysy:

- parciálně dvouvláknovou DNA tvořenou kompletním kódujícím (negativním) vláknem, které je na svém 5´ konci kovalentně spojeno s reverzní transkriptázou, a nekódujícím nekompletním (pozitivním) vláknem, na svém 5´ konci má připojený RNA oligomer odvozený od 5´ konce pregenomické RNA (pgRNA), který slouží jako primer pro syntézu plus vlákna
- RNA dependentní DNA polymerázu (reverzní transkriptázu)
- replikaci s využitím templátu pgRNA
- vysoký stupeň druhové a tkáňové specificity

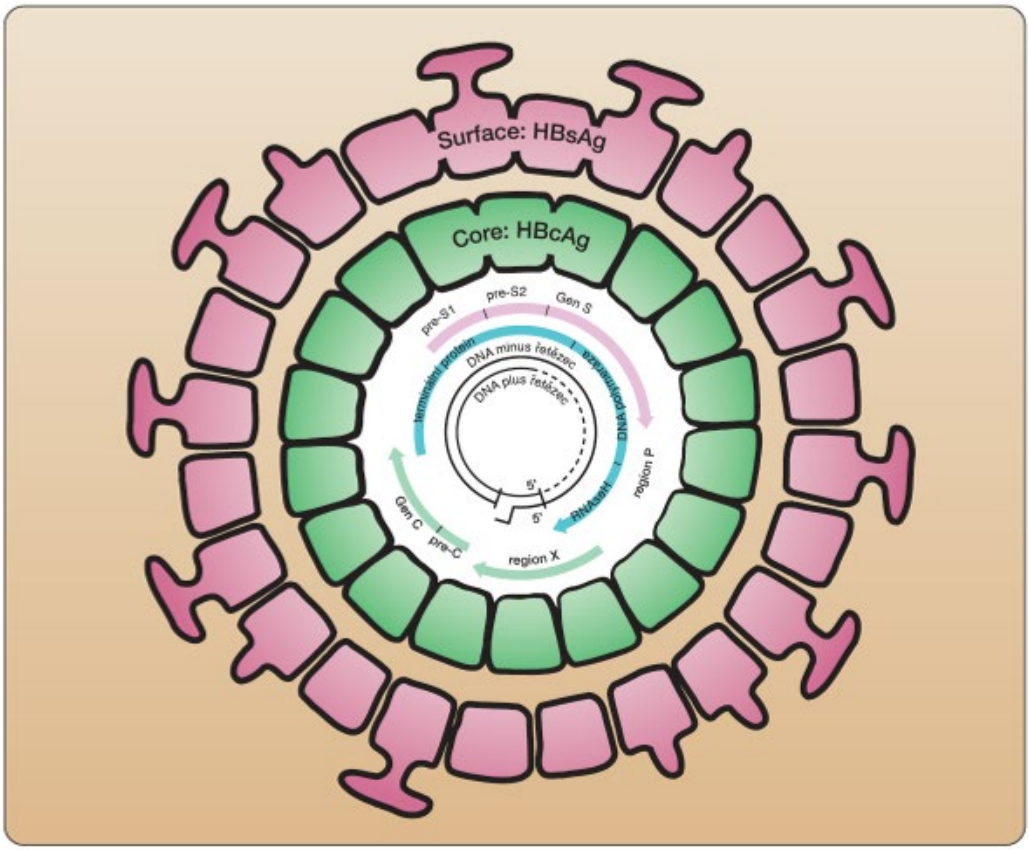
HBV má celkem 10 genotypů (A-J), které se mezi sebou liší o více než 8 %. Zároveň bylo popsáno již více než 40 subgenotypů. Různé genotypy mají odlišnou geografickou distribuci (Kramvis 2014).

Existují 3 typy virových částic (Dane, Cameron, and Briggs 1970). Dvě z nich jsou menší sférické a filamentární struktury o rozměru 20–22 nm. Na povrchu mají HBsAg, ale neobsahují nukleovou kyselinu, proto nejsou infekční. Infekční virion, neboli Daneova částice, je také poměrně malý, měří 42 nm (Obr. 3). Je tvořen lipidovým obalem, na jehož povrchu se nachází HBsAg, a který uvnitř obsahuje ikosahedrální nukleokapsidu. Formace kapsidy, která je tvořena zejména HBc proteiny, začíná tvorbou dimerů zesíťovaných pomocí disulfidových můstků. Shlukování těchto dimerických struktur probíhá dvěma způsoby, a to spojením 90 HBc dimerů za tvorby symetrie kapsidy s triangulačním číslem T=3 nebo spojením 120 dimerů za tvorby složitější kapsidy s triangulačním číslem T=4 (Crowther et al. 1994). Infekční viriony mají častěji symetrii s T=4 (asi 90 % případů). HBc proteiny v tvořící se kapsidě nakonec inkorporují pgRNA s navázanou virovou polymerázou.

Nukleová kyselina viru (Obr. 3) je cirkulární, parciálně dvojitá DNA o velikosti 3,2 kb. V infikovaných hepatocytech se dostává do jádra, kde je později hostitelskými enzymy spojena do cirkulární kovalentně uzavřené DNA (cccDNA). Kóduje celkem čtyři překrývající se ORF (*S, C, P* a *X*). ORF *S* (surface) kóduje obalový HBsAg, který může být strukturálně a funkčně rozdělen na PreS1, PreS2 a S oblasti. *C* gen má potom oblasti precore a core a dává vzniknout buď kapsidovému HBc proteinu nebo HBe proteinu, podle toho, zda začíná transkripce v precore či core oblasti (Miller et al. 1989). Core protein má schopnost se sám sbalit do kapsidě podobné struktury a na C-terminálním konci obsahuje skupinu vysoce zásaditých aminokyselin se schopností vázat RNA. ORF pro precore kóduje signální peptid, který směruje translační produkt do ER, kde je protein dále zpracován za vzniku sekrečního HBeAg. Jeho funkce není doposud rozklíčována, nicméně je silně asociován s replikací viru, infekciozitou, zánětlivou aktivitou a závažností jaterního poškození. Zároveň působí také jako tolerogen (Milich 2019). ORF *P* kóduje virovou polymerázu. Jedná se o poměrně velký protein o velikosti asi 800 aminokyselin (AMK). Poslední ORF *X* kóduje tzv. HBx protein, malý 16,5 kDa protein, který zajišťuje signální transdukci, aktivaci transkripce, opravu DNA a inhibuje degradaci proteinů. Pro replikaci viru má HBxAg nezbytnou úlohu, byť nebyla zatím popsána dokonale (Zoulim, Saputelli, and Seeger 1994; Lucifora et al. 2011). Všechny 4 ORF se nacházejí na kompletním (-) DNA vlákně. Virová polymeráza má celkem 4 domény se třemi enzymatickými funkcemi. První doména je tzv. terminální protein,

který je zásadní pro vazbu pgRNA a slouží jako proteinový primer k zahájení syntézy minus vlákna. Druhou je tzv. spacer doména, jejíž funkce není zatím podrobně objasněna, nicméně má úlohu ve vazbě RNA a směrování proteinu (Pley et al. 2022). Třetí doménou je reverzní transkriptáza, která má schopnost DNA syntézy jak dle RNA, tak dle DNA templátu a poslední doménou je ribonukleáza H, která štěpí pgRNA po reverzní transkripci (Radziwill, Tucker, and Schaller 1990).

Obrázek 3. Struktura virionu hepatitidy B. Převzato z: Šperl J. Léčba chronické hepatitidy B. Remedia. 15:1; 2005



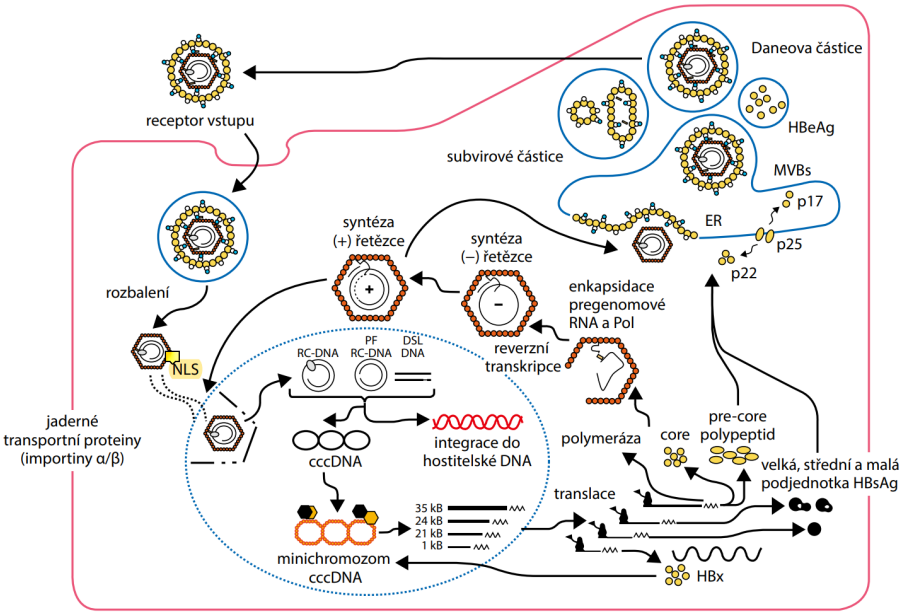
Virion interaguje s heparansulfátovými proteoglykany (zejména glypican 5) na povrchu hepatocytů. Toto prvotní spojení je podmíněné elektrostatickými silami mezi negativně nabitým heparansulfátem a pozitivně nabitými aminokyselinovými zbytky na antigenní smyčce S domény (Schulze, Gripon, and Urban 2007). Tato vazba má nízkou afinitu a je reverzibilní. Virion je pak posunut ke specifičtějšímu receptoru NTCP (sodium taurocholate cotransporting polypeptide), což je transportér žlučových kyselin nacházející se na sinusoidální membráně, který slouží také pro vstup viru HDV (Hayes et

al. 2016; Yan et al. 2012). V této interakci hraje nejdůležitější úlohu PreS1 doména velkého S proteinu. Virus vstupuje do hepatocytu clathrinem mediovanou endocytózou, nicméně přesný mechanizmus, který je nepochybně vícestupňový a svou nezbytnou úlohu v něm hrají také E-cadherin, caveolin-1, dynamin-2 a receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), nebyl doposud objasněn (McMahon and Boucrot 2011). Vzniklý časný endozom (bohatý na GTPázu Rab5A) se následně mění na pozdní endozom (obsahující Rab7A), fúzí membrán se uvolňuje nukleokapsida do cytoplasmy (Obr. 4) a pomocí mikrotubulů je směrována k nukleárnímu pórovému komplexu (Macovei et al. 2013). Proteiny kapsidy obsahují na svém C-terminálním konci nukleární lokalizační signál (NLS), který interaguje s pórovým komplexem jádra (Rabe et al. 2003). Po transportu virové DNA do jádra se odštěpí virová polymeráza a pomocí hostitelského reparačního mechanizmu (DNA polymeráza κ a α, DNA ligáza 1 a 3, topoizomeráza I a II) se nukleová kyselina opraví na kompletní dva řetězce a uzavře se do velmi stabilní cccDNA, která následně slouží jako templát k transkripci virové RNA.

Samotná transkripce probíhá z cccDNA (Obr. 4) a je regulovaná 4 promotorovými oblastmi (pro PreS1, PreS2, core a X) a 2 enhancery (Enhancer I a Enhancer II). Samotné provedení zajišťuje hostitelská RNA polymeráza II (Rall et al. 1983). Regulace transkripce probíhá na řadě úrovní. Jeden z regulačních mechanizmů je na úrovni epigenetické, kdy se cccDNA spojí s některými proteiny viru i hostitelské buňky. Skládá se spolu s histony do formy minichromozomu. Potranslační modifikace histonů tak mohou ovlivňovat transkripční aktivitu cccDNA (např. vysoká acetylace a trimethylace lyzinu histonu 3 jsou markerem aktivní transkripce). Mezi regulátory tak patří řada enzymů zajišťující potranslační modifikaci těchto proteinů, jako jsou acetyltransferázy, deacetylázy, methyltransferázy, demethylázy (Ren et al. 2018; Xing et al. 2019). Právě tyto s cccDNA asociované histony jsou cílem protivirové aktivity IFN-α, který indukuje hypoacetylaci histonů a zajišťuje dostupnost transkripčních korepresorů, což bylo prokázáno jak ve tkáňových kulturách, tak na myších modelech. Promotory i enhancery obsahují vazebná místa pro řadu transkripčních faktorů, včetně nukleárních receptorů. Patří mezi ně retinoid X receptor α (RXRα), hepatocytové nukleární faktory 3 a 4, receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem α (PPARα) či farnesoid X receptor (FXR) (Huan, Kosovsky, and Siddiqui 1995; Ori and Shaul 1995; Guidotti et al. 1999). Dalšími faktory zajišťujícími zvýšenou transkripci pgRNA je nukleární faktor 1 (NF1) a vazebný protein pro cAMP

responsivní element (CREB). Represi transkripce naopak zajišťují hepatální nukleární faktor 6 (HNF6), p53 a další (Hao et al. 2015; Uchida et al. 1996). Svou nezbytnou roli v transkripci hraje výše zmíněný multifunkční HBx protein, který se asociuje s minichromozomy cccDNA a má souvislost s acetylací histonu H3, tedy s epigenetickými mechanizmy regulace transkripce (Alarcon et al. 2016). V experimentálních modelech na HepG2 buňkách byla také prokázaná souvislost se zvýšenou methylací a fosforylací histonů. Při absenci HBx docházelo ke kondenzaci chromatinu, při zvýšené expresi docházelo naopak k jeho rozvolňování (Tsukuda and Watashi 2020; Luo et al. 2013). Výsledkem transkripční aktivity je vznik subgenomových RNA sloužících k translaci proteinů na ER a pgRNA, která je delší než vlastní genom viru a která poté slouží jako templát pro reverzní transkriptázu.

Obrázek 4. Životní cyklus HBV, převzato z: Urbánek P, Hepatologie, 4. vydání, Grada, 2022



Proces enkapsidace viru zahrnuje pgRNA, HBc a polymerázu. Nejprve dochází k dimerizaci HBc, které se potom asociují (90 nebo 120 dimerů) za tvorby ikosahedrální kapsidy. Ve stejné chvíli polymeráza interaguje přes tzv. epsilon kličku na 5' konci pgRNA, která má jednak funkci stabilizace RNA a jednak slouží jako „navigátor“ při tvorbě ribonukleoproteinového komplexu, který inkorporuje do vznikající kapsidy (Bartenschlager and Schaller 1992). Celý proces je usnadněn hostitelskými chaperony

(heat shock proteiny 40 a 90), které pomáhají optimalizovat konformaci polymerázy (Beck and Nassal 2003; Stahl, Beck, and Nassal 2007). Epsilon klička obsahuje sekvenci 5'-UUC-3', která slouží jako templát pro primer pro reverzní transkripci za tvorby (–) vlákna DNA a následnou syntézu (+) vlákna. RNA je po tomto procesu degradována RNázou H.

HBV povrchové S proteiny jsou integrální membránové proteiny kódované jedním ORF, a to C-terminální S doménu o 226 AMK, která je shodná pro všechny tři následující typy S proteinu. Je jedinou součástí malého povrchového proteinu (SHBs), který je základním stavebním proteinem obalu virionu (Jiang and Hildt 2020). Střední povrchový protein (MHBs) obsahuje navíc PreS1 doménu o 55 AMK a velký povrchový protein (LHBs) obsahuje všechny domény, tzn. také PreS2 doménu, která má dle genotypu viru 108, 118 nebo 119 AMK. S doména SHBs a MHBs má shodnou topologii, dělí se na několik transmembránových oblastí na membráně ER. První z nich (TM1) se nachází mezi AMK 8–22, na které navazuje cytozolová klička 23–79 AMK. Druhá oblast (TM2) se nachází v oblasti AMK 80–98 směřuje vně (tedy do ER) s navazujícím hlavním konformačním epitopem HBsAg a N-glykosylačním místem (Eble et al. 1987). Detaily C-terminální sekvence nebyly podrobně popsány a obsahují jednu až dvě další transmembránové domény (TM3/4). Konformace LHBs je poněkud odlišná, S doména nemá úlohu signální sekvence a PreS1-PreS2 s částí S domény až do AMK 79 zůstávají na cytosolové straně. Asi 50 % u LHBs dochází k potranslační translokaci. Výsledkem je pak duální topologie LHBs proteinu, kdy polovina proteinů integruje TM1 do membrány ER a PreS1-PreS2 směřují do lumen ER, zatímco u druhé topologie naopak do cytosolu. Kontrolu nad rovnováhou obou forem mají nejspíše chaperony (Prange and Streeck 1995). PreS2 doména je myristylovaná a hraje klíčovou úlohu v infekciozitě HBV (Bruss et al. 1996; Gripon et al. 1995). S proteiny viru nemusí být nutně pouze součástí Daneovy virové částice. Předpokládá se, že také pučí z membrány post-ER a pre-Golgi, aniž by se staly součástí virionu a vezikulárními strukturami jsou uvolňované sekrecí (Patient et al. 2007; Patient, Hourioux, and Roingeard 2009). Tyto nevirové částice jsou oproti virionům v obrovské nadprodukci (asi 10 000krát). Jejich úloha není doposud dokonale objasněna, ale předpokládá se role návnady pro hostitelský imunitní systém, která má snížit riziko neutralizace Daneových částic protilátkami. Všechny tři typy S proteinu jsou integrální, ukotvené S doménou do membrány. S proteiny jsou následně transportovány

cestou ERGIC (ER-Golgi-intermediate complex), odkud jsou sférické partikule segregovány extracelulárně. Nukleokapsidy mohou mít různý osud. Jsou buď v menší míře secernovány bez obalu nebo se v endozomech obalují S proteiny a jako maturovaný virion se dostávají do oběhu exocytózou zprostředkovanou α-taxilinem podobně jako samostatné filamentové částice (Hoffmann et al. 2013). Některé nukleokapsidy jsou opětovně transportovány zpět do jádra k další amplifikaci cccDNA.

Imunita proti HBV

Ve všeobecné rovině lze říci, že vrozená imunita je zásadní pro boj s akutními virovými infekcemi a udržuje infekci pod kontrolou do doby rozvoje cílené adaptivní odpovědi. V obvyklých případech virová infekce aktivuje vrozenou imunitu pomocí PRR receptorů. Ty rozpoznávají specifické struktury patogenů, tzv. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), jako jsou komponenty bakteriální stěny, dsDNA apod. Mezi nejdůležitější PRR patří skupina receptorů TLR, RNA helikázy, jako jsou RIG-I (retinoic acid inducible gene I) a MDA-5 (melanoma differentiation associated gene 5) či PKR (dsRNA-dependentní proteinkináza). Smyslem aktivace PRR je zapojení adaptorových proteinů (TRIF, MyD88) a následná exprese protivirových cytokinů, především cestou IFN-I (IFN-α/β) a aktivace NK buněk. Zdrojem INF-I jsou především samotné napadené buňky a pDC, zatímco INF-II (tedy IFN-γ) jsou produkované NK a NKT buňkami (Busca and Kumar 2014; Thompson and Locarnini 2007; Katze, He, and Gale 2002).

Vrozená imunita

Virus HBV má však jisté netypické vlastnosti v rámci interakce s vrozenou složkou imunitního systému hostitele. Aby mohlo dojít k navození chronické infekce, je třeba, aby virus narušil výše zmíněné mechanismy, ať už na úrovni down-regulace exprese PRR, případně zabránil jejich interakci s PAMPs či narušil následnou intracelulární signalizační kaskádu (Bowie and Unterholzner 2008). Data na lidských i zvířecích modelech prokazují, že v případě akvizice infekce v dospělém věku nastává několikatýdenní okno, než začne exponenciální replikační aktivita, a pro imunitní systém se zdá virus takřka neviditelný. Role intracelulární intrinzické a vrozené imunity je poměrně nejasná, nicméně se zdá, že HBV vyvinul vlastní specifickou strategii k překonání vrozených imunitních mechanismů.

Přispívají k tomu stabilní, v jádru sekvestrovaná cccDNA a produkty transkripce s polyadenylovým koncem připomínající strukturu vlastní mRNA. HBV navíc účinně inhibuje aktivitu interferonové signalizační kaskády, a to zejména IFN-I. HBe proteiny jako další efekt obrany proti hostitelské imunitě down-regulují expresi TLR receptorů a dále tak oslabují iniciální vrozenou imunitní odpověď (to se týká zejména perinatálního přenosu) (Milich and Liang 2003). Přesto je však již dostatečně dokumentováno, že HBV je přeci jen rozpoznáván i vrozenou imunitou, byť indukce inflamatorních cytokinů je poměrně slabá. Některé recentní studie ukazují pravděpodobnou aktivaci TLR2 core proteinem a zároveň intracelulární aktivaci RIG-1 receptoru, který se váže epsilon kličku pgRNA (Sato et al. 2015). Indukce IFN-I je však jen slabá, jednak pro již zmíněnou částečnou skrytost viru, jednak pro aktivní supresi imunitní odpovědi. *In vitro* modely naznačují možnost aktivní represe signalizace cestou TLR3, RIG-1/MDA-5 kaskády, v *in vivo* myších modelech pak při expozici IFN-α nedošlo k nukleární translokaci STAT-1 a tedy k expresi ISG (Lutgehetmann et al. 2011). Zároveň se ale prokázalo, že IFN-I i II deficitní myši měly významně vyšší iniciální replikaci ve srovnání s kontrolami (McClary et al. 2000). Je zajímavé, že IFN-I jsou pravděpodobně významněji indukované v pozdějších fázích infekce, a to cestou pDC, které jsou stimulované k jejich produkci. HBV tak zřejmě přeci jen způsobuje expresi těchto inflamatorních cytokinů, ovšem v jiných buňkách než hepatocytech samých. Dalším z faktů podporujících teorii aktivace vrozené imunity je průkaz CD8+ T lymfocytů indukovaných cestou IFN-γ. K vrozené imunitě patří samozřejmě také DC, které mají nezastupitelnou roli v prezentaci antigenů efektorovým buňkám. Lze tedy říci, že navzdory původním předpokladům má vrozená imunita větší význam v iniciální kontrole replikace, než se v dřívějších letech předpokládalo (Maini and Gehring 2016).

Adaptivní imunita

Zatímco vrozená imunita má úlohu zejména v iniciální replikaci viru, adaptivní větev imunitního systému, tedy produkce HBV specifických protilátek B lymfocyty a odpověď zprostředkovaná cytotoxickými a pomocnými T lymfocyty nakonec u většiny pacientů vyústí v úspěšné potlačení infekce. Protilátky produkované B lymfocyty mají za úkol se navázat na proteiny samotného patogenu, jeho produktů či na proteiny exprimované na povrchu infikovaných buněk (Chisari and Ferrari 1995). Cílem TCR receptorů T lymfocytů je potom rozpoznání proteinových fragmentů patogenu, tzv.

epitopů, exprimovaných na povrchu buněk spolu s molekulami HLA I. nebo II. třídy (Oldstone MBA 2001). Epitopy syntetizované v napadených buňkách se předkládají ve spojení s molekulami HLA I. třídy TCR receptorům CD8+ T lymfocytů (Rock and Goldberg 1999). Epitopy, které vzniknou internalizací patogenů buňkami APC, jsou potom prezentované HLA II. třídy CD4+ pomocným T lymfocytům (Roche and Furuta 2015). Existují sice výjimky z tohoto pravidla, ale právě tato dvojí prezentace umožňuje CD8+ buňkám rozeznat infikované buňky od buněk, které pouze internalizovaly proteiny patogenů (Chisari and Ferrari 1995). Protilátková odpověď B lymfocytů při HBV infekci zůstávala dlouho nedoceněna a přehlížena. B lymfocyty dokáží vytvářet protilátky proti různým proteinům viru, tedy proti core, e, proteinům obalu, x i virové polymeráze. Protilátky proti jednotlivým proteinům viru byly spíše využívány v rámci diagnostiky a určení fáze infekce (Gerlich 2013). Pouze anti-HBs jsou spojeny s imunitní kontrolou nad virem a imunitní protekcí, zatímco anti-HBc je pouze známkou probíhající či prodělané infekce. Protektivní úloha anti-HBV protilátek všeobecně nebyla dobře popsaná do objevení receptoru NTCP spolu s jednoduše infikovatelnými buněčnými liniemi, kdy bylo umožněno lepší mapování a identifikace esenciální oblasti HBs proteinu pro infekčnost viru, kterými jsou PreS1 a antigenní klička. PreS1 doména je oblast, která přímo interaguje s NTCP, zatímco antigenní klička HBs proteinu lokalizovaná mezi transmembránovými oblastmi TM1 a TM2 interaguje s povrchovými heparansulfátovými proteoglykany hepatocytů, zvyšuje tak koncentraci HBV virionů na povrchu těchto buněk a usnadňuje interakci právě s NTCP receptorem (Urban et al. 2014; Jaoude and Sureau 2005). Protilátky právě proti těmto dvěma oblastem jsou efektivní v obraně proti vzniku infekce, zatímco jiné specifické protilátky, např. proti PreS2, nemají žádnou neutralizační schopnost (Glebe et al. 2003; Le Seyec et al. 1998). Zajímavé je, že vakcíny proti hepatitidě B neobsahují PreS1 oblast, což zároveň s faktem, že je v některých endemických oblastech detekováno více mutací v oblasti antigenní smyčky, může vysvětlit příčinu, proč v některých epidemiologických studiích byla reálná účinnost vakcín nižší, než se očekávalo (Werner et al. 2013). Situace je také odlišná dle fáze HBV infekce. U pacientů s akutní hepatitidou B bylo v periferní krvi detekováno více anti-HBs produkujících B lymfocytů než u pacientů s chronickou HBV (Dusheiko et al. 1983). To však nemusí nutně znamenat jejich absenci, neboť paměťové B lymfocyty a paměťové buňky dále migrují, zejména do jaterního parenchymu, kde mohou tvořit ektopickou

lymfoidní tkáň, a do kostní dřeně (Bertoletti and Ferrari 2016; Mohamadkhani et al. 2014). Do budoucna je jisté, že bude třeba věnovat pozornost konkrétnímu efektu neutralizačních protilátek, tedy do jaké míry se jedná o zabránění dalšího šíření, ale také zda nemají schopnost rozlišit infikované hepatocyty a buď indukovat protilátkami zprostředkovanou cytotoxicitu, nebo zprostředkovat cytolýzu pomocí aktivace komplementu, což bylo zatím dokumentováno pouze na myších modelech (Zhang et al. 2016). Jedním z důležitých momentů by také mohla být úloha paměťových buněk, protože při sérokonverzi na anti-HBs dochází postupně ke snížení počtu CD8+ T lymfocytů u části pacientů a je známé, že ke zpětné sérokonverzi a reaktivaci HBV infekce nejčastěji dochází právě při depleční léčbě B lymfocytů (rituximab) (Dervite, Hober, and Morel 2001). V neposlední řadě je třeba zmínit, že B lymfocyty vystupují také jako silné APC buňky pro pomocné T lymfocyty a mají regulační aktivitu. To je nejlépe vidět v případě vzplanutí chronické hepatitidy B, kdy dokáží produkcí IL-10 regulovat aktivitu HBV specifických T-buněk a zánětlivou odpověď jako takovou (Das et al. 2012).

HBV specifické T-lymfocyty zůstávají hlavním efektorem eliminace viru a jaterního zánětu. CD8+ T-buňky se ve zvýšené míře vyskytují v jaterním parenchymu, způsobují lýzu infikovaných hepatocytů a secernují cytokiny (zejména IFN-γ), které zajišťují necytolytickou eliminaci viru a zvýšení počtu imunitních buněk v místě zánětu (Moriyama et al. 1990; Maini et al. 2000). Dalšími účastníky jsou CD4+ T-buňky, které mají regulační aktivitu, a jejich četnost negativně koreluje s eliminací viru (Yang et al. 2010). Na rozdíl od ostatních virových onemocnění (např. CMV), kdy k možnosti detekce CD8+ buněk dochází po 1–2 týdnech, HBV specifické CD8+ buňky jsou detekovatelné 6–8 týdnů po začátku infekce (Webster et al. 2000). Vrchol v jejich počtu obvykle koreluje s maximem jaterního poškození, přesto je jejich celková kvantita poměrně nízká s frekvencemi zastoupení proti jednotlivým epitopům kolem 1-3 % CD8+ T-buněk (Boettler et al. 2006). I v případě T-lymfocytů platí, že se tvoří specificky proti proteinům nukleokapsidy, obalu, proteinu x a virové polymeráze. Účinek CD8+ T-buněk spočívá ve schopnosti přímo indukovat buněčnou smrt (nekróza či apoptóza) působením perforinů a granzymů A a B nebo cestou interakce Fas ligandu a Fas receptoru s následným spuštěním kaspázové kaskády a indukce apoptózy (Balkow et al. 2001). Buněčná smrt HBV infikovaných hepatocytů je nejvíce patrná u pacientů se symptomatickou akutní hepatitidou. K této interakci je nezbytný přímý kontakt infikovaného hepatocytu s CD8+

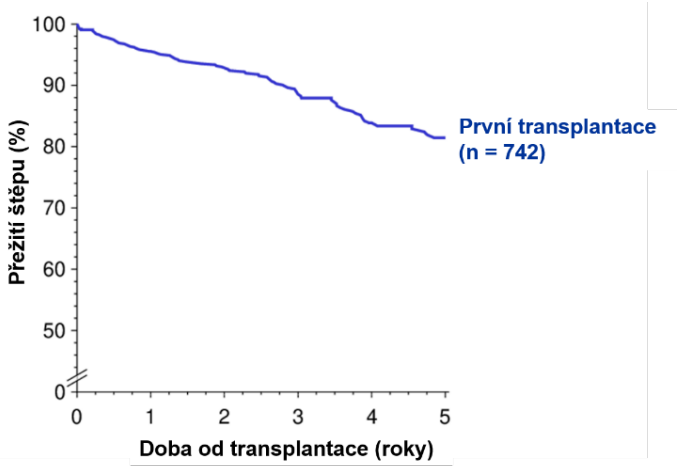
T-lymfocytem, ke kterému dochází díky fenestrovaným sinusoidám (Guidotti et al. 2015). Migrace těchto lymfocytů do jaterního parenchymu je podmíněna expresí CD161 a CXCR6 receptoru a také přítomnosti funkčních krevních destiček (Billerbeck et al. 2010). Tento druhý jmenovaný mechanizmus nebyl doposud dobře objasněn, nicméně *in vitro* a na myších modelech byla prokázaná snížená migrace specifických CD8+ T-buněk do jater při nedostatečném počtu destiček, při léčbě kyselinou acetylsalicylovou či clopidogrelem. Jednou z molekul, která se nabízí jako účastník této interakce mezi krevními destičkami a lymfocytem je CD44 (Inverso and Iannacone 2016). Aby při akutní fázi infekce nedošlo ke kompletní destrukci parenchymu životně důležitého orgánu, využívá imunitní systém jak vrozenou imunitu, tak schopnost CD8+ buněk navodit také necytolytickou eliminaci viru, a to především cestou IFN-γ a TNF-α. Oproti akutní hepatitidě je v chronické fázi zánětu obtížnější pro lymfocyty dosáhnout přímé interakce s infikovanými hepatocyty, zároveň se také u pacientů s chronickou hepatitidou B prokázal větší inhibiční efekt cytokinové odpovědi, pravděpodobně díky supresoru cytokinové signalizace SOCS-3, který je upregulovaný u jedinců s chronickou HBV infekcí (Koeberlein et al. 2010). U těchto nemocných je pravděpodobné, že setrvalá expozice HBV antigenů vede k vyčerpání CD8+ T-buněk a k postupné ztrátě jejich funkce, zejména ke snížení schopnosti cytotoxicity, produkce IL-2, následně ke snížené produkci IFN-γ a TNF-α a nakonec k jejich vymizení. Jednou z výhod protivirové léčby je na druhou stranu jejich částečné obnovení. V průběhu HBV infekce dochází k expresi inhibičních molekul na povrchu vyčerpaných CD8+, mezi které patří PD-1, 2B4, lymfocyty aktivující gen 3 (LAG-3), CD160 a další. Zároveň potom up-regulují TRAIL-death receptor, který umožní NK buňkám tyto lymfocyty usmrtit (Wherry et al. 2007; Boni et al. 2015; Schurich et al. 2011). Cílem těchto mechanizmů je především snížit následky cytotoxicity T lymfocytů na hepatocyty, ale ve svém důsledku mohou pomoci k navození chronické hepatitidy.

Operační tolerance a imunotolerance

SOT znamená pro nemocné život zachraňující výkony a naději na delší přežití s lepší kvalitou života. V posledních 30 letech došlo k velkým pokrokům v prevenci odhojení (rejekce) štěpů za cenu celoživotního užívání imunosupresiv. Tato léčba je však zatížena vysokou toxicitou a zvýšeným rizikem kardiovaskulárních a infekčních onemocnění, zvýšeným výskytem hypertenze, diabetu, chronických onemocnění ledvin

či nádorových onemocnění. Přes veškerou snahu však obvykle v průběhu dekád dochází ke zhoršení funkce a nakonec ke ztrátě štěpu u velké části pacientů. Důvodem je zejména chronická rejekce podmíněná HLA systémem. Nejpalčivější je tento problém zejména u pacientů po transplantaci ledviny, neboť játra mají dvojí cévní zásobení a Kupfferovy buňky, které toto riziko snižují. Pětileté přežití štěpu ledviny v našem institutu lehce převyšuje 80 % (Graf 1). Desetileté přežití štěpu ledviny se přesto za poslední 2 dekády zlepšilo na cca 75 % (nepublikovaná data, laskavě poskytla MUDr. Slatinská, Ph.D.). Navození imunotolerance je jedním z klíčových cílů a v animálních modelech byl zaznamenán slibný vývoj, který má bohužel zatím poměrně daleko k efektivitě v klinické praxi. OT je poměrně raritní stav, kdy imunita příjemce akceptuje allogenní štěp i po vysazení imunosupresivní medikace. Takovou terapeutickou možností by v budoucnu mohly být sekvenční transplantace HSCT a SOT od HLA-kompatibilního dárce.

Graf 1. Přežití štěpů ledviny od zemřelých dárců v IKEM 2015–2020



Nejdůležitější roli mají T-lymfocyty, které se označují jako regulační (Tregs), které exprimují na povrchu CD4+ a CD25+, kontrolují toleranci k vlastním buňkám. Jejich aktivita je určující v alergických odpovědích nebo naopak ve stupni tolerance a tedy délce přežití allogenních štěpů (Yoshizawa et al. 2005). U lidí tato skupina lymfocytů představuje 2–10 % periferních CD4+ T-buněk. Stimulace pomocí TNF-α vede k up-regulaci a aktivaci Tregs. CD25 představuje α podjednotku IL-2 receptoru, která se však výjimečně může vyskytovat i u efektorových T lymfocytů, proto je nezbytné k přesnější

identifikaci fenotypu těchto buněk využít i další povrchové markery. IL-2 uvolněný z efektorových T-buněk je také zcela nezbytný k diferenciaci CD4+ T-lymfocytů v Tregs. Významným regulátorem diferenciace Tregs je také FOXP3 (forkhead box P3), ztráta jeho funkce vede k závažným život ohrožujícím imunitním dysregulacím (Li et al. 2004). Mechanizmus suprese je zajištěn pomocí IL-10 a TGF-β, přičemž IL-10 vytváří pozitivní zpětnou vazbu ke své další sekreci (Newell et al. 2010). Dalšími účastníky imunosupresivního účinku Tregs jsou CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) a granzym B, jehož cytolytický efekt snižuje množství dendritických buněk (pomocí CD80/86) a makrofágů a dopomáhají velmi efektivně k navození tolerance allograftu (VanBuskirk et al. 2000). V budoucnu lze očekávat vývoj v dokonalejší identifikaci subtypů Tregs, které jsou spojené s vyšší OT transplantovaných orgánů, což by mohlo vést k nálezu relativně snadno dostupných markerů tolerance. Nutno dodat, že Tregs nejsou jediným hráčem v imunitní reakci na allograft. Humorální složka je zajišťovaná pomocí regulačních B lymfocytů, přestože jejich úloze rozumíme méně než u Tregs. I pro tyto buňky platí, že dokáží produkovat IL-10 a TGF-β, čímž omezují diferenciaci cytotoxických T-lymfocytů, zároveň disponují granzymy a FAS ligandy k regulaci T a NK buněk (Stolp, Turka, and Wood 2014).

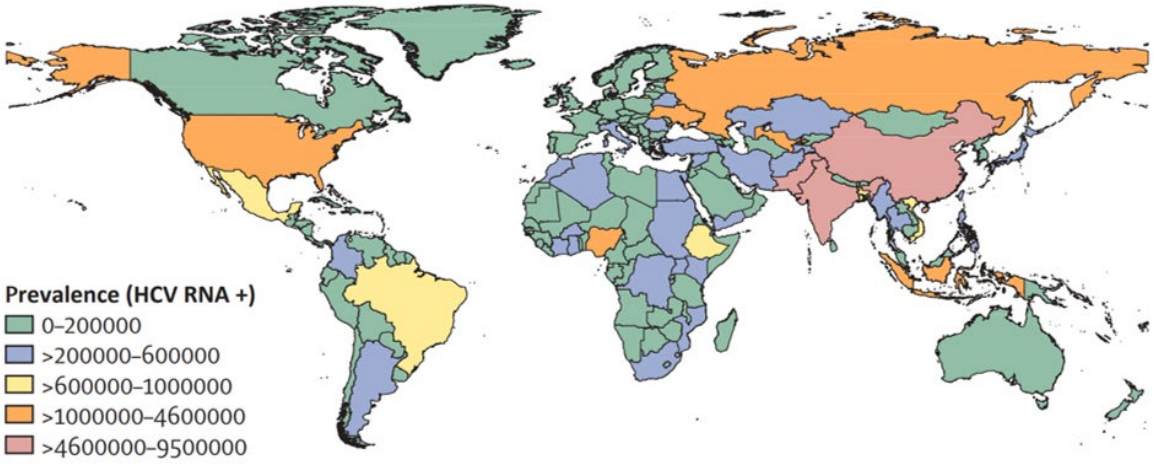
Paradoxně podobný pojem, tedy imunotolerance, je historicky dobře známý jako jedna z fází hepatitidy B (byť v nedávné době došlo ke změně v názvosloví, viz tab. 1). Jedná se o fázi pozorovanou především u osob, které akvírovaly HBV perinatálně či v dětském nebo mladém věku a trvala zpravidla desítky let. Typickým znakem je vysoká replikace viru, pozitivita e antigenu, ale zároveň normální aktivita ALT a nízká nekroinflamatorní aktivita v histologickém obrazu. Předpokladem je nevyzrálost imunitního systému, neboť imunitní odpověď se v průběhu života mění, dokumentovaná je například vysoká produkce tolerogenního IL-10 u předčasně narozených dětí nebo naopak setrvalý vzestup proinflamatorních cytokinů, jako IL-1β nebo TNF-α v průběhu dospívání (Kollmann et al. 2012). Dochází také k posunu z Th2 (Tregs) v novorozeneckém věku na Th1 v dospívání a dospělém věku (Levy 2007). Z výše zmíněného byla vyvozena teorie, že dětský organizmus není schopen vytvořit adekvátní specifickou imunitní odpověď proti viru. V poslední dekádě byl však tento předpoklad zpochybněn, protože se prokázalo, že již novorozenci mají schopnost virus-specifické odpovědi. Je pravděpodobné, že u nich také dochází k eliminaci HBV-infikovaných hepatocytů,

nicméně se zdá, že nenásleduje nespecifická zánětlivá odpověď (Bertoletti and Hong 2014).

1.3 Virus hepatitidy C

Hepatitida C patří k nejčastějším příčinám chronického onemocnění jater jak v západních zemích, tak v Jihovýchodní Asii i v Africe. Virus hepatitidy C byl poprvé popsán v roce 1989, do té doby byl označován jako virus non-A, non-B hepatitidy. Celosvětově je virem hepatitidy C (HCV) infikováno asi 71 milionů jedinců (Polaris Observatory 2022) (Obr. 5). Průběh onemocnění se může velmi lišit od zcela asymptomatické infekce přes chronickou hepatitidu s různou aktivitou zánětu až po cirhózu jater, jaterní selhání a rozvoj HCC (EASL 2020). Cílem léčby je zamezit rozvoji komplikací spojených s infekcí včetně extrahepatálních manifestací. Úspěšná léčba znamená kompletní eradikaci viru z organizmu a je definovaná jako negativní virémie 12 či 24 týdnů po ukončení léčby (setrvalá virologická odpověď, SVR). V případě již přítomné jaterní cirhózy i po dosažení SVR trvá zvýšené riziko rozvoje HCC a pacienty je nutné nadále sledovat. Světová zdravotnická organizace (WHO) si v současnosti vytyčila ambiciózní cíl eliminovat virus v různých zemích do roku 2030–2050 (tedy snížit o 65 procent počet úmrtí spojených s HCV a snížit počet nově nakažených o více než 90 %) (Pedrana et al. 2021).

Obrázek 5. Prevalence HCV infekce ve světě v roce 2020. Převzato z (Polaris Observatory 2022)



Taxonomie, struktura a replikace viru HCV

Virus hepatitidy C patří do čeledi *Flaviviridae* a rodu hepacivirus. Samotný HCV má značně variabilní genom, vytváří 7 genotypů (1–7), které se liší až ve 30 % sekvence nukleotidů, a více než 90 subtypů lišících se ve 25 % sekvence. Genotypy HCV mají různou geografickou distribuci (Zhang et al. 2020). V naší oblasti jsou nejvíce zastoupené genotypy 1a, 1b a 3.

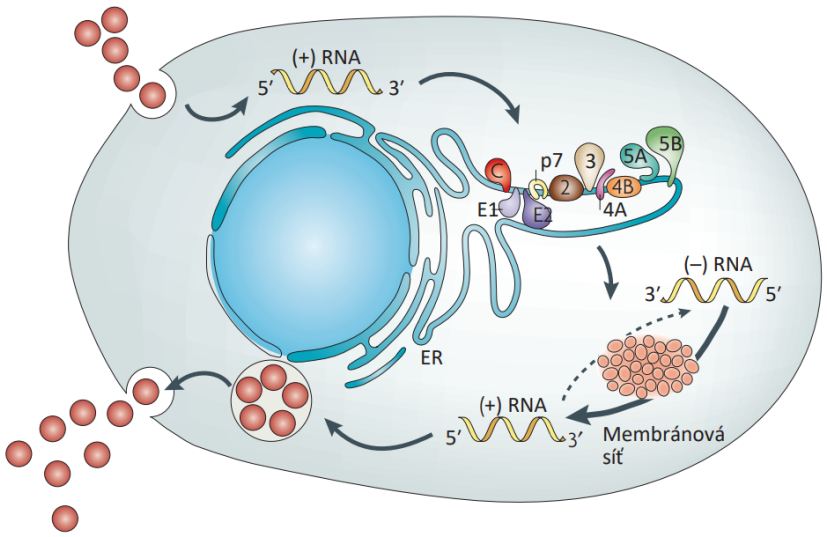
HCV je malý obalený virus (55–65 nm v průměru) obsahující jedno pozitivní RNA vlákno (Catanese et al. 2013). Dle Baltimorovy klasifikace tedy spadá do IV. třídy ssRNA virů (Baltimore 1971). Virus má lipidový obal obsahující dva glykoproteiny E1 a E2. Uvnitř obalu se nachází ikosahedrální kapsida složená z mnoha kopií core (C) proteinu. Vlákno RNA má potom délku 9,6–12,3 kbp s jedním ORF kódujícím jeden prekurzorový polyprotein o více než 3 000 AMK (Obr. 6).

***Obrázek 6*.** Uspořádání genomu HCV, upraveno dle (Bartenschlager, Lohmann, and Penin 2013)

Obal viru je tvořen lipidovou dvouvrstvou se dvěma typy ukotvených glykoproteinů E1 a E2, které mají roli jak v uchycení viru a vstupu viru do buňky, tak v kompletaci virionu. Na povrchu obalu jsou detekovatelné také některé apo-lipoproteiny a estery cholesterolu, které představují téměř polovinu všech lipidů virového obalu (Andre et al. 2002; Chang et al. 2007). Apo-lipoproteiny asociované s HCV také přispívají k usnadnění vstupu virionu do buněk. Povrchové glykoproteiny zajišťují interakci s hostitelskými receptorovými komplexy a fúzi virového obalu s endozomálními membránami napadených buněk. Glykoproteiny E1 a E2 jsou transmembránové proteiny, které vytvářejí heterodimer spojený nekovalentními vazbami uvnitř napadených buněk. Dokáží vytvořit i rozsáhlý komplex stabilizovaný kovalentně za pomoci disulfidových můstků na povrchu virové částice (Vieyres, Dubuisson, and Pietschmann 2014). V rámci heterodimeru E1E2 je to E2, který umožňuje interakci s povrchovými buněčnými receptory a koreceptory, zatímco E1 zajišťuje právě fúzi membrány (Pileri et al. 1998; Scarselli et al. 2002). Virus HCV napadá zejména

hepatocyty, B-lymfocyty a dendritické buňky, ke kterým se dostává krevním řečištěm. V něm potom cirkuluje ve vazbě na lipoproteiny s nízkou (LDL) či velmi nízkou denzitou (VLDL), dále ve vazbě na imunoglobuliny či samostatně. V Disseho prostoru mají viriony možnost přímého kontaktu s hepatocyty, využívají k tomu heparansulfátové proteoglykany syndekan-1 a syndekan-4 či scavengerový receptor B1 (SRB1) (Lefevre et al. 2014; Dao Thi et al. 2012). Zde pravděpodobně dochází k interakci nikoli pouze cestou vlastních virových glykoproteinů, ale také pomocí lipoproteinu ApoE. Samotný vstup se zdá být závislý na koordinaci nejméně 4 faktorů hostitelské buňky. Patří sem SRB1, CD81 (neboli tetraspanin), klaudin-1 a okludin (Evans et al. 2007; Ploss et al. 2009). Nejdůležitějším momentem je vznik komplexu CD81/klaudin-1. HCV vstupuje do buněk pomocí klathrinem zprostředkované endocytózy. V dalším průběhu se virion transportuje do časných endozomů obsahujících Rab5a pomocí aktinových vláken, kde dochází k fúzi membrán. Genom HCV je pak uvolněn do cytozolu, kde dochází k translaci a vzniku polyproteinu (Obr. 7) (Moradpour, Penin, and Rice 2007).

Obrázek 7. Životní cyklus viru HCV, adaptace dle (Moradpour, Penin, and Rice 2007)



Navzdory poměrně velké variabilitě mezi jednotlivými genotypy mají všechny *Flaviviridae* vysoce konzervované oblasti kódující helikázu a RNA dependentní RNA polymerázu (RdRp) (Miller and Purcell 1990). Polyprotein vzniklý translací virové RNA obsahuje na N-konci strukturální a na C-konci nestrukturální proteiny. Celý ORF je na 5´ i

na 3´ konci ohraničen nepřekládanými úseky (UTR), které jsou nezbytné k translaci a replikaci viru (Thurner et al. 2004). Translace genomu probíhá v cytoplazmě hostitelské buňky a vzniklý polyprotein je pak štěpen na jednotlivé proteiny za účasti hostitelské i virové proteázy. Replikace RNA je potom uskutečněna pomocí virového replikačního komplexu asociovaného s buněčnými membránami. Na rozdíl od některých jiných zástupců čeledi *Flaviviridae* nemá HCV RNA na 5´ UTR čepičku, ta místo toho tvoří komplexní sekundární strukturu, tzv. IRES (internal ribosome entry site), který umožňuje přímou vazbu na 40S ribozomální podjednotku a následnou translaci (Honda et al. 1996). 3´ UTR úsek je kratší, méně strukturovaný a obsahuje poly-uridylový konec. ORF kóduje strukturální proteiny core, E1, E2, polypeptid p7 a nestrukturální proteiny NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B. Core protein je vysoce zásaditý se schopností vázat RNA a je základní strukturou virové kapsidy. E1 a E2 jsou transmembránové povrchové glykoproteiny, funkčně významné domény těchto proteinů jsou orientovány do lumen ER (tedy později do extracelulárního prostoru) (Obr. 7). Protein p7 (neboli viroporin) je integrální membránový protein sloužící jako transportér pro kalciové kationty (Carrere-Kremer et al. 2002; Bartosch, Dubuisson, and Cosset 2003). Tyto proteiny jsou z polyproteinu odštěpeny hostitelskými proteázami. NS2-3 je autoproteáza, která štěpí zbylý polyprotein v místě mezi NS2 a NS3 (Grakoui et al. 1993). NS2 má velmi krátkou životnost a je rychle degradován, přesto je nezbytný k sestavení core proteinu a povrchových glykoproteinů (Ma et al. 2011). NS3 je multifunkční protein, který ve své N-terminální třetině zajišťuje funkci serinové proteázy a zbylé dvě třetiny obstarávají funkci helikázy a NTPázy. NS4A slouží jako kofaktor zmíněné serinové proteázy, která katalyzuje štěpení zbylých částí polyproteinu. Další významnou úlohou proteázy NS3 a jejího kofaktoru NS4A je obrana proti vrozené imunitě hostitele tím, že blokuje intracelulární PRR RIG-I a antagonizuje IRF-3 signalizační dráhu, jejímž cílem je zvýšená exprese ISG (Bartenschlager et al. 1993; Foy et al. 2003). NS4B je integrální membránový protein, který tvoří kotvu pro replikační komplex na ER (Elazar et al. 2004). NS5A je fosforylovaný metaloprotein, který je nezbytný ke správnému sbalení viru (Elazar et al. 2003). Udržuje replikační komplex ve vazbě na lipidové rafty intracelulárních membrán a mírou své forforylace ovlivňuje intenzitu replikace a zahájení kompletace virionu. NS5B je RdRp zodpovědná za samotnou replikaci viru, která se odehrává na membránové síti odvozené z ER ve dvou krocích. Nejprve dojde k syntéze kompletního negativního RNA vlákna,

které následně slouží jako templát pro pozitivní vlákno. To potom slouží k translaci dalšího polyproteinu, k dalšímu cyklu replikace nebo k formování vlastních virionů. Nově vznikající viriony jsou kompletně sestaveny pučením přes intracelulární membrány a extracelulárně jsou transportované exocytózou (Ago et al. 1999; Bressanelli et al. 1999).

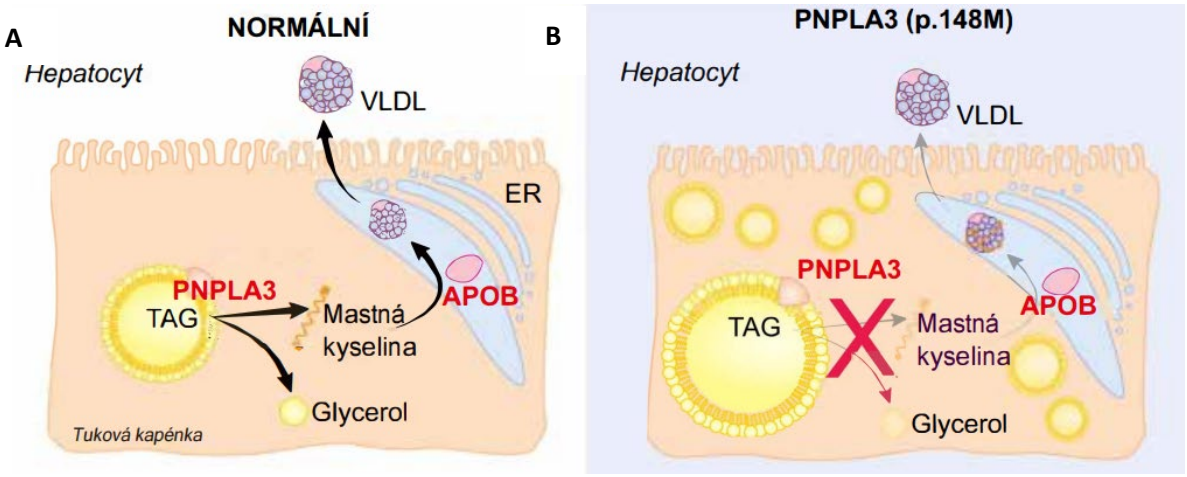
HCC a přežití po transplantaci

HCC je nejčastější primární malignitou jater a také závažnou komplikací jaterní cirhózy i u pacientů s kompenzovanou cirhózou s ročním rizikem incidence 1,5–6 % (Frenette et al. 2019; Bruix, Sherman, and American Association for the Study of Liver 2011). Přítomnost jaterní cirhózy je tak nejvýznamnějším rizikovým faktorem rozvoje HCC. Přesto se u některých chronických chorob jater (HBV, NASH) může objevit již v necirhotickém parenchymu (Crissien and Frenette 2014; Balogh et al. 2016). Riziko HCC není vyvážené napříč všemi typy jaterních onemocnění, nejčastěji se vyskytuje v terénu chronických hepatitid B a C, dále u alkoholové choroby jater (ALD) a u NASH (Lok et al. 2009; Wong, Cheung, and Ahmed 2014). V případě virových hepatitid je rizikovým faktorem vysoká virémie, v případě ALD potom množství vypitého alkoholu. Mezi další faktory potom patří věk, mužské pohlaví či genetické faktory (Falleti et al. 2011). Pokud je HCC zachycen v časném stadiu a je možné chirurgické řešení (resekce či transplantace jater), jsou výsledky přežití velmi dobré. V ostatních případech je možné využít lokoregionální (transarteriální chemoembolizace, radiofrekvenční či mikrovlnná ablace) či systémovou onkologickou léčbu. V případě závažných komorbidit, včetně dekompenzované cirhózy, jsou však léčebné možnosti minimální a dlouhodobé přežití je velmi nízké. Chirurgická resekce má oproti transplantaci nevýhodu ve vysoké rekurenci onemocnění z důvodu ponechání zbytku fibrotických/cirhotických jater. Pětileté přežití se pohybuje mezi 41–74 % a rekurence v průběhu 5 let po resekci je 70 % (Allemann et al. 2013). Naproti tomu správně indikovaná transplantace jater se splněním Milánských či rozšířených velikostních kritérií má v řadě publikovaných souborů srovnatelné přežití jako transplantace pro jinou diagnózu, které v jednom roce po transplantaci odpovídá 90 % a 5 let po transplantaci 75 % (Mazzaferro et al. 1996). Přesto HCC zhoršuje potransplantační průběh, a to zejména pokud se jedná o incidentalom, tedy HCC objevený až v explantátu (Senkerikova et al. 2014).

HCC a *PNPLA3*

Varianta rs738409 C>G (I148M) v genu fosfolipázy *PNPLA3* (patatin-like phospholipase domain-containig protein 3) byla poprvé popsaná v roce 2008 v souvislosti se zvýšeným obsahem tuku v játrech (Romeo et al. 2008). V dalších letech byla popsána i její asociace s rizikem rozvoje steatohepatitidy, pokročilé fibrózy, cirhózy jater i HCC u NASH i ALD. V případě NASH je to i v současnosti nejsilnější známý nezávislý genetický prediktor spojený s progresí tohoto onemocnění (Speliotes et al. 2010). PNPLA3 je protein exprimovaný nejvíce v játrech a retině, mRNA *PNPLA3* je potom více než v hepatocytech exprimovaná v jaterních stellátních buňkách. Tento gen je významně regulován nutričním stavem jedince a je na transkripční úrovni regulován inzulinem cestou indukce SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein-1c) a ChREBP (carbohydrate response element binding protein) (Ferre and Foufelle 2007; Shimomura, Bashmakov, and Horton 1999; Ishii et al. 2004). Protein PNPLA3 je intracelulárně lokalizován na membránách lipidových kapének (Obr. 8).

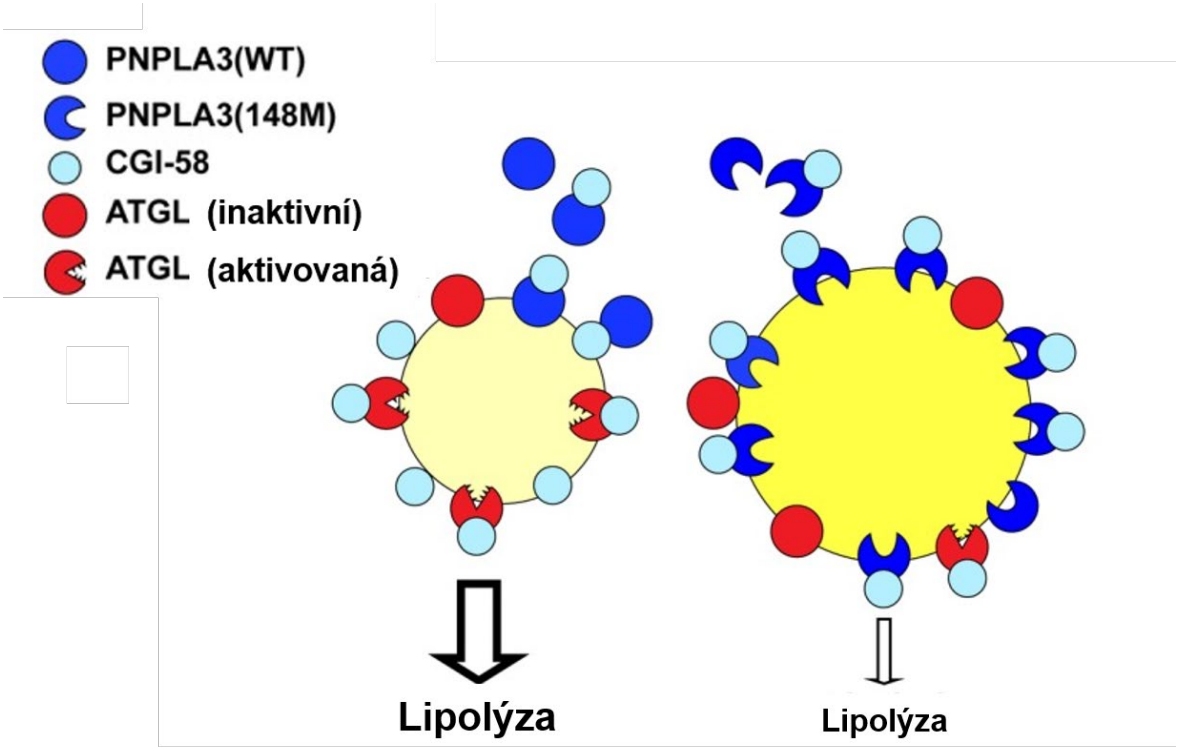
Obrázek 8. Metabolismus tuku v hepatocytech při v normálním stavu (A) a při nosičství variantní alely G *PNPLA3* (B). Upraveno dle (Trepo et al. 2016)



Proti původní domněnce, že I148M substituce vede ke snížení fosfolipázové aktivity o 80 %, existují nyní důkazy o zcela odlišném mechanizmu vzniku steatózy, který nikterak nesouvisí s enzymovou aktivitou PNPLA3 (Huang, Cohen, and Hobbs 2011). Ukázalo se totiž, že myši vystavené jak zvýšené expresi, tak naprosté inaktivaci nemutované PNPLA3 (wild type, WT) neměly steatózu (Wang et al. 2019). Hlavní lipázou

triacylglycerolů v hepatocytech je enzym PNPLA2 (jinak také ATGL, adipose triglyceride lipase), která ke svému působení využívá kofaktoru CGI-58 (comparative gene identification-58). PNPLA3 potřebuje CGI-58 ke své stabilizaci na lipidových kapénkách, ale následně je rychle degradovaná. Variantní PNPLA3 (I148M) se naproti tomu akumuluje na povrchu lipidových kapének, kde sekvestruje CGI-58 a znemožňuje jeho dostupnost pro ATGL jako kofaktoru nezbytného k hydrolýze triacylglycerolů (Obr. 9) (Wang et al. 2019). Fyziologická funkce PNPLA3 zřejmě spočívá ve směně nenasycených mastných kyselin v triacylglycerolech za nasycené mastné kyseliny vázané ve fosfolipidech tvořících povrch tukových kapének. Tato „záchranná dráha“ nenasycených mastných kyselin je pro buňky nepochybně užitečná, avšak bez problémů postradatelná.

Obrázek 9. Akumulace variantního proteinu PNPLA3 na povrchu tukových kapének v hepatocytech a následná sekvestrace CGI-58 pro ATGL. Převzato z (Wang et al. 2019)



2. Cíle práce

Cílem práce bylo zjistit vliv vybraných genetických faktorů na průběh virových onemocnění u nemocných léčených transplantací jater či ledvin:

1. Určit vztah mezi genotypem rs12979860 *IL28B* a rozvojem CMV nemoci po transplantaci jater a identifikovat rizikové faktory pro vznik CMV nemoci po transplantaci jater.

2. Určit vztah mezi genotypem rs738409 *PNPLA3*, progresí jaterní choroby a rozvojem HCC v cirhóze typu C.

3. Identifikovat geny spojené s operační tolerancí u pacientů s chronickou hepatitidou B po transplantaci ledviny a zjistit vliv protivirové léčby a imunosuprese na operační toleranci u těchto pacientů.

3. Metody

3.1 Stanovení replikace CMV

CMV antigen pp65 byl stanovován za použití monoklonálních protilátek v nepřímé imunofluorescenci (CMV-vue Kit, Incstar Corp., Stillwater, MN). CMV DNA byla stanovena z plazmy a kvantifikována systémem artus® CMV RG PCR (Quiagen, GmbH, Hilden, SRN) s limitem detekce 57 kopií/ml. Orgánové postižení bylo potvrzeno histologicky identifikací charakteristických intracelulárních inkluzí v barvení hematoxylinem-eosinem nebo imunohistochemicky určením CMV-specifických antigenů (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ).

3.2 Stanovení HCV RNA a genotypu HCV

HCV RNA byla hodnocena ze vzorků odebraných 24 hodin před transplantací jater. Sérová kvantita HCV RNA byla stanovena dle aktuálně dostupných laboratorních metod, tedy Roche COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test v1.0 nebo v2.0 (Roche Molecular Systems Inc., South Branchburg, NJ). Genotyp HCV byl určován pomocí SIEMENS Versant® HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA) (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY).

3.3 Genotypizace *IL28B* a *PNPLA3*

DNA byla izolovaná z periferní krve pacientů za užití kitu Qiagen QIAamp kit (Qiagen, Hilden, SRN).

V případě varianty rs12979860 C/T genu *IL28B* byl genotyp stanovený polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a restrikční analýzou (RFLP) pomocí primerů 5´-GCTTATCGCATACGGCTAGG-3´(Fw) and 5´-AGGCTCAGGGTCAATCACAG-3´ (Rev)(Fabris et al. 2011). Produkt o velikosti 242 bp byl následně štěpen enzymem *Bsh*1236I. Délka vzniklých fragmentů byla dále hodnocena elektroforézou s použitím agarózového gelu.

Ke zjištění varianty rs738409 c.444C>G v genu *PNPLA3* byla využita TaqMan assay No. C_7241_10 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Genotypizace byla prováděna dle protokolu výrobce metodou real-time PCR za využití Applied Biosystems ABI 7300 Real-Time PCR instrument (Thermo Fisher Scientific).

3.4 Genové exprese

Pro analýzu genové exprese byla izolována RNA z periferní krve pomocí kitu PAXgene Blood RNA (Qiagen, Hilden, SRN) dle návodu výrobce. RNA byla kvantifikována měřením absorbance při 260 nm na přístroji ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) a poté byla provedena reverzní transkripce pomocí enzymu Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Získaná cDNA byla analyzována RT-qPCR za užití Taqman-low density array (Applied Biosystems) s rychlým protokolem. Takto bylo zhodnoceno 31 kandidátních genů (BNC2-Hs00417700_m1, CD79B-Hs00236881_m1, CD247-Hs00167901_m1, CYP1B1-Hs00164383_m1, ERBB2-Hs99999005_mH , FCRL1-Hs00364705_m1, FCRL2-Hs00229156_m1, FEM1C-Hs00363479_m1, FOXP3-Hs00203958_m1, GATA3-Hs00231122_m1, GZMB-Hs01554355_m1, IFNGR1-Hs00166223_m1, IL6-Hs00985639_m1, IL10-Hs00961622_m1, KLF6-Hs00810569_m1, KLRF1-Hs00212979_m1, MAN1A1-Hs00195458_m1, MS4A1-Hs00174849_m1, NKG7-Hs01120688_g1, PRF1-Hs00169473_m1, SENP6-Hs00210213_m1, SH2D1B-Hs01592483_m1, SLAMF7-Hs00900280_m1, TCAIM-Hs00603313_m1, TCL1A-Hs00951350_m1, TLR2-Hs01014511_m1, TLR5-Hs00152825_m1, TNF-Hs99999043_m1, GAPDH-Hs99999905_m1, HPRT1-Hs01003267_m1, PGK1-Hs99999906_m1, 18S-Hs99999901_s1). Získaná data byla kvantifikována softwarem SDS 2.4 (Applied Biosystems) a relativní genové exprese byly určené komparativní $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodou Relative Quantification (RQ) Manager Software v 1.2.1 (Applied Biosystems). Jako endogenní kontrola byly použity geny PGK1-Hs99999906_m1, HPRT1-Hs01003267_m1, GAPDH-Hs99999905_m1 and 18S-Hs99999901_s1.

3.5 Statistická analýza

Spojité proměnné byly hodnoceny jako průměry a směrodatné odchylky za použití t-testu, neparametrických testů (Mannův-Whitneyův test a Kruskalův-Wallisův test), zatímco kategoriální proměnné byly hodnoceny jako četnosti pomocí χ^2 testu. Frekvence genotypů byly kontrolovány Hardy-Weinbergovou rovnováhou.

K určení signifikantních prediktorů výskytu CMV infekce byl použitý Fineův-Grayův model proporcionálních rizik se dvěma kompetujícími událostmi. Potransplantační přežití bylo stanoveno Kaplan-Meierovou analýzou, rizikové faktory

byly určeny multivariantním logistickým regresním modelem či Coxovým modelem ke srovnání kumulativních incidencí mezi jednotlivými skupinami. Ověření, zda výběr pochází z normálního rozdělení, bylo provedeno pomocí Kolmogorovova-Smirnovova testu.

Jako statisticky signifikantní byly označeny hodnoty p <0,05.

Statistická analýza byla provedena programem R programming language v. 3.2.0 (www.r-project.org), a dále SPSS v.20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) a GraphPad InStat v. 3. 05 pro Windows (GraphPad software, San Diego, CA).

4. Výsledky a komentáře

Virová onemocnění zásadním způsobem ovlivňují funkci a přežití pacientů a štěpů po SOT. Virové hepatitidy B a C jsou často samy o sobě příčinou základního onemocnění jater a indikací LTx, ať už pro chronické selhání jater či pro vznik HCC v cirhotických játrech, který je závažnou komplikací jaterní cirhózy či pokročilé fibrózy jater. Díky možnosti léčby hepatitidy B nukleos(t)idovými analogy (NUC) a hepatitidy C pomocí DAA je v současnosti riziko rekurence virové hepatitidy ve štěpu a rychlá progrese fibrózy štěpu jater výjimečná. Zároveň je však možné provádět transplantaci i ostatních parenchymových orgánů u pacientů s chronickými virovými hepatitidami, je však nejprve nutné dosáhnout protivirovou léčbou negativní virémie. Zejména u pacientů po transplantaci ledviny s chronickou hepatitidou B byl prokázán vynikající efekt dlouhodobé léčby NUC, kdy reaktivace hepatitidy B a riziko progrese jaterní choroby je minimální, zatímco přežití příjemců i štěpů je excelentní. V potransplantačním období jsou pak pacienti ohroženi rozvojem oportunních infekcí, nejčastější z nich je CMV infekce.

V době léčby hepatitidy C pegylovaným interferonem a ribavirinem byl popsaný silný genetický prediktor spontánní i léčbou navozené eliminace viru (rs12979860) v blízkosti genu *IL28B*. V současnosti díky DAA ztratil tento marker v léčbě HCV klinický význam. V roce 2008 byla popsaná další klinicky významná varianta genu *PNPLA3 (*rs738409). Nosičství variantní alely G je asociováno s obsahem tuku v játrech, s progresí fibrózy jak u NAFLD a ALD, ale i u HCV, ale také s rozvojem HCC u NASH cirhózy. Asociace s HCC u cirhóz jiné etiologie než NASH ale není jednoznačně prokázána.

4.1 Alela T v rs12979860 v genu *IL28B* chrání před pozdním nástupem CMV nemoci u pacientů po transplantaci jater

CMV představuje nejčastější oportunní virovou infekci u pacientů po SOT a zejména u pacientů bez preexistující CMV-specifické imunity zvyšuje jejich morbiditu i mortalitu (Razonable 2005). U těchto pacientů se jedná o primární infekci. U séropozitivních příjemců, u kterých se onemocnění projeví po zahájení imunosupresivní léčby, hovoříme o reaktivaci CMV. Nejčastěji je výskyt CMV nemoci pozorován 2–3 měsíce po SOT, nicméně její nástup může být oddálen podáváním profylaktické

protivirové léčby. V tomto případě jde nejčastěji o séronegativní příjemce, kteří dostali štěp od séropozitivního dárce (Paya et al. 2004). V potransplantačním sledování existují dva různé přístupy ke snížení rizika rozvoje CMV infekce. V prvním případě se jedná o preemptivní strategii, kdy musí být pravidelně sledována CMV virémie v intervalu 1–2 týdnů a léčba se zahajuje v případě pozitivního nálezu i bez přítomnosti symptomů CMV nemoci. Druhou možností je univerzální podávání CMV profylaxe po dobu 3–6 měsíců po transplantaci. Tento přístup je velice efektivní ke snížení rizika CMV nemoci v časném potransplantačním období, i když prolomení profylaxe je možné (**o**n-**p**rophylaxis **d**isease - OPD CMV), ale oddaluje nástup CMV infekce do doby po jejím ukončení (**p**ost-**p**rophylaxis **d**isease - PPD CMV) (Bodro et al. 2012).

Rizikové faktory, které zvyšují náchylnost k CMV infekci, jsou sérostatus dárce a příjemce, typ a dávka imunosuprese, přítomnost akutní celulární rejekce či koinfekce jinými imunomodulačními viry. Někteří pacienti onemocní navzdory absenci těchto faktorů (Humar, Snydman, and Practice 2009).

Imunosupresivní medikace má významný vliv na buňky adaptivního imunitního systému a signifikantně zhoršuje schopnost vytvořit CMV-specifickou T-buněčnou odpověď. Do popředí protivirové imunitní odpovědi se tak dostává imunita vrozená, přičemž již byla popsána řada genetických faktorů ovlivňující riziko CMV infekce (Egli, Humar, and Kumar 2012). IFN-III (IFN-λ), které jsou produkované nejvíce dendritickými buňkami a makrofágy, mají podobně jako IFN-I významnou protivirovou úlohu díky aktivaci JAK/STAT signalizační dráhy a následné indukci exprese ISG. Celogenomové asociační studie identifikovaly nekódující variantu rs12979860 (C/T) v promotoru genu *IL28B* v asociaci se spontánní i léčbou navozenou eliminací HCV (Ge et al. 2009; Suppiah et al. 2009). Tato varianta je v silné genové vazbě s další později popsanou variantou genu *IFNL4* ss469415590 (TT/ΔG) a velmi dobře koreluje zejména u Evropanů a Asiatů. Varianta ΔG posouvá ORF tak, že nový ORF kóduje protein IFNL4. U homozygotů pro alelu TT se žádný IFNL4 netvoří (Prokunina-Olsson et al. 2013).

Vliv výše uvedených variant u jiných virových nemocí jater, jako například HBV, zatím nebyl pozorován. Dosud bylo publikováno několik studií, které popsaly asociaci variant *IL28B* resp. *IFNL4* s rizikem CMV infekce u pacientů po SOT a HSCT, nicméně výsledky byly protichůdné (Bibert et al. 2014; Manuel et al. 2015). Cílem naší studie bylo validovat asociaci varianty rs12979860 *IL28B* s rizikem CMV infekce u pacientů po LTx.

Charakteristika souboru a metody

Retrospektivně jsme vyhledali 743 dospělých pacientů, kteří podstoupili LTx, v období 1996–2015 pro jaterní cirhózu různé etiologie s nebo bez malého HCC. Pacienti indikovaní k LTx pro jiné choroby než jaterní cirhózu nebyli do hodnocení zahrnuti. Ve druhém kroku jsme identifikovali pacienty, kteří měli typické příznaky CMV nemoci a měli pozitivitu pp65 antigenu nebo CMV DNA nad limitem detekce nebo histologicky prokázané orgánové postižení (např. CMV hepatitidu, kolitidu a pod). Separátně jsme hodnotili pacienty s časným a pozdním nástupem CMV nemoci. Podrobnější popis souboru je uveden v tabulce 2.

Základem imunosupresivní léčby po LTx byly kalcineurinové inhibitory, ať už cyklosporin A (CyA) či takrolimus (TAK), obvykle v kombinaci s mykofenolát mofetilem (MMF) či azathioprinem (AZA), případně prednisolonem (KS). Protivirová léčba k zabránění rozvoje CMV nemoci byla podávána univerzálně všem transplantovaným pacientům po dobu 6 měsíců od LTx, a to na podkladě předtransplantačního sérostatusu příjemce a dárce. Séronegativní příjemci (R–), kteří dostali štěp od séropozitivního dárce (D+) patřili mezi nejrizikovější skupinu, proto jim byl podáván valganciklovir (VGC). Ostatní pacienti dostávali profylakticky valacyklovir či acyklovir (VAL). V případě rozvoje CMV nemoci byl po dobu 2 týdnů podáván ganciklovir, valganciklovir či foscarnet v dávce upravené dle hmotnosti a renálních funkcí.

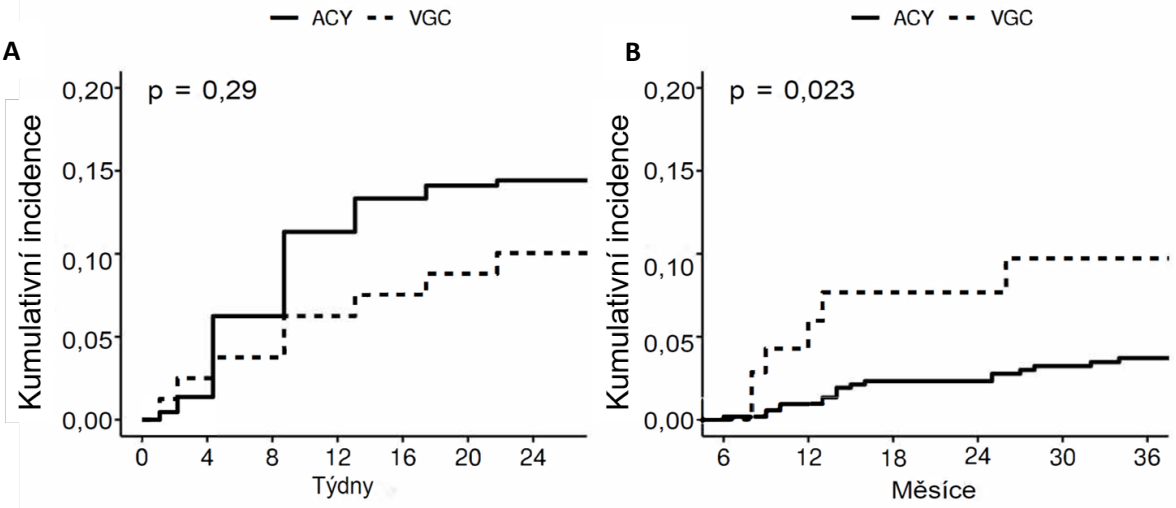
	Celkem (n = 743)	Bez CMV (n = 599)	OPD CMV (n = 102)	PPD CMV (n = 36)	OPD+PPD CMV (n = 6)	p
Pohlaví, muži (%)	477 (64,2)	382 (63,8)	72 (70,6)	18 (50)	5 (83,3)	0,11
Věk (roky), medián (rozptyl)	55 (19–74)	56 (19–74)	52 (19–69)	50 (21–62)	43 (25–64)	**< 0,001**
CPT skóre v době LTx, medián (rozptyl)	9 (6–15)	9 (6–15)	9 (5–14)	9 (5–13)	11 (6–13)	0,45
MELD skóre v době LTx, medián (rozptyl)	15 (6–42)	15 (6–42)	15 (9–33)	15 (8–25)	14 (9–21)	0,52
Indikace k LTx: alkoholová nemoc jater (%)	237 (35,0)	198 (36,6)	29 (31,2)	9 (25,0)	1 (16,7)	0,2
virová hepatitida (%)	159 (23,6)	128 (23,7)	24 (25,8)	5 (13,9)	2 (33,3)	
cholestatická nemoc jater (%)	157 (23,3)	114 (21,1)	25 (26,9)	16 (44,4)	2 (33,3)	
NASH a metabolické choroby (%)	25 (3,7)	23 (4,3)	2 (2,1)	0 (0)	0 (0)	
ostatní (%)	97 (14,4)	77 (14,3)	13 (14,0)	6 (16,7)	1 (16,7)	
Imunosupresivní léčba: takrolimus (%)	625 (84,1)	511 (85,3)	79 (77,4)	29 (80,5)	6 (100)	0,17
cyklosporin (%)	97 (13,1)	69 (11,5)	22 (21,6)	6 (16,7)	0 (0)	
sirolimus (%)	21 (2,8)	19 (3,2)	1 (1,0)	1 (2,8)	0 (0)	
CMV sérostatus D+/R+	476 (64,1)	384 (64,1)	63 (61,8)	24 (66,7)	5 (83,3)	**0,04**
D+/R–	96 (12,9)	64 (10,7)	24 (23,5)	7 (19,4)	1 (16,7)	
D–/R+	138 (18,6)	123 (20,5)	11 (10,8)	4 (11,1)	0 (0)	
D–/R–	33 (4,4)	28 (4,7)	4 (3,9)	1 (2,8)	0 (0)	
CMV profylaxe: valacyklovir nebo acyklovir (%)	655 (88,2)	529 (88,3)	92 (90,2)	29 (80,6)	5 (83,3)	0,30
valganciklovir nebo ganciklovir (%)	88 (11,8)	70 (11,7)	10 (9,8)	7 (19,4)	1 (16,7)	
CMV nemoc: virový syndrom	89 (12,0)	0 (0)	65 (63,7)	21 (58,3)	3 (50,0)	0,69
tkáňové postižení	55 (7,4)	0 (0)	37 (36,3)	15 (41,7)	3 (50,0)	
Epizoda akutní celulární rejekce (%)	87 (11,7)	72 (12,0)	12 (9,8)	2 (5,6)	1 (16,7)	0,67

Tabulka 2. Demografická charakteristika souboru pacientů
Hodnoty p vyjadřují statistickou významnost rozdílů mezi skupinami s CMV a bez CMV.
CPT- Child-Pugh-Turcotte; MELD-Model for End-Stage Liver Disease

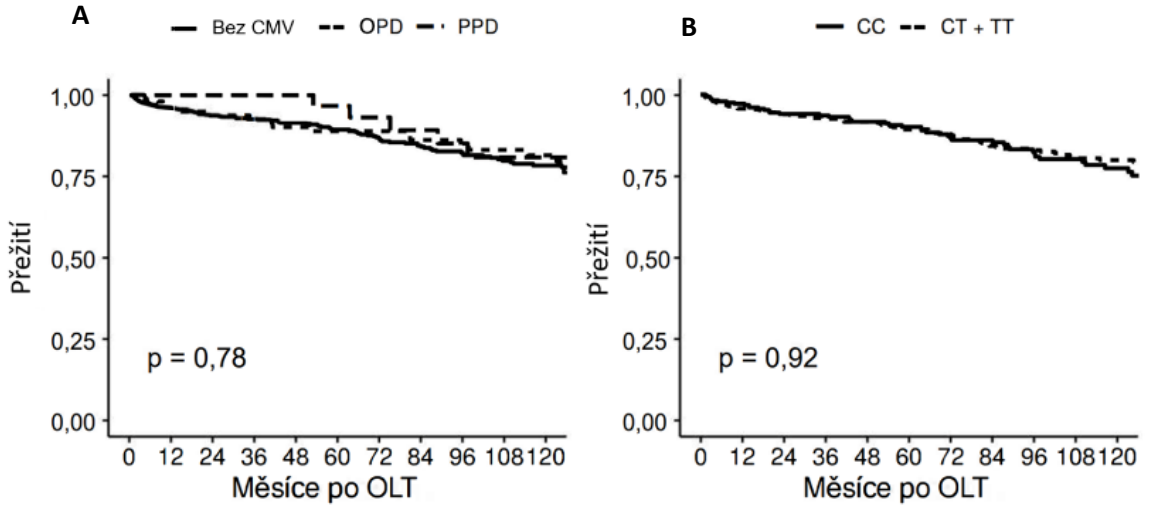
Manifestace CMV nemoci

Celkově onemocnělo alespoň jednou epizodou CMV nemoci 144/743 (19,4 %) transplantovaných pacientů. Nejméně jednu epizodu OPD mělo 102/144 (70,8 %) jedinců, alespoň jedenkrát mělo PPD 36/144 (25 %) jedinců. Obě epizody prodělalo 6/144 (4,2 %) pacientů, kteří byli vyřazeni z další analýzy. Typ užitého léku k CMV profylaxi neměl žádný vliv na rozvoj CMV nemoci ve skupině OPD, zatímco ve skupině PPD častěji onemocněli pacienti, kteří dostávali profylakticky valganciklovir či ganciklovir (OR 2,68, 95% CI 1,09–5,95, p = 0,023, Graf 2). CMV nemoc neměla vliv na přežití pacientů po transplantaci (p = 0,78, Graf 3).

***Graf 2*.** Kumulativní incidence výskytu CMV nemoci dle typu profylaxe a doby po LTx ve skupinách OPD (A) a PPD (B)



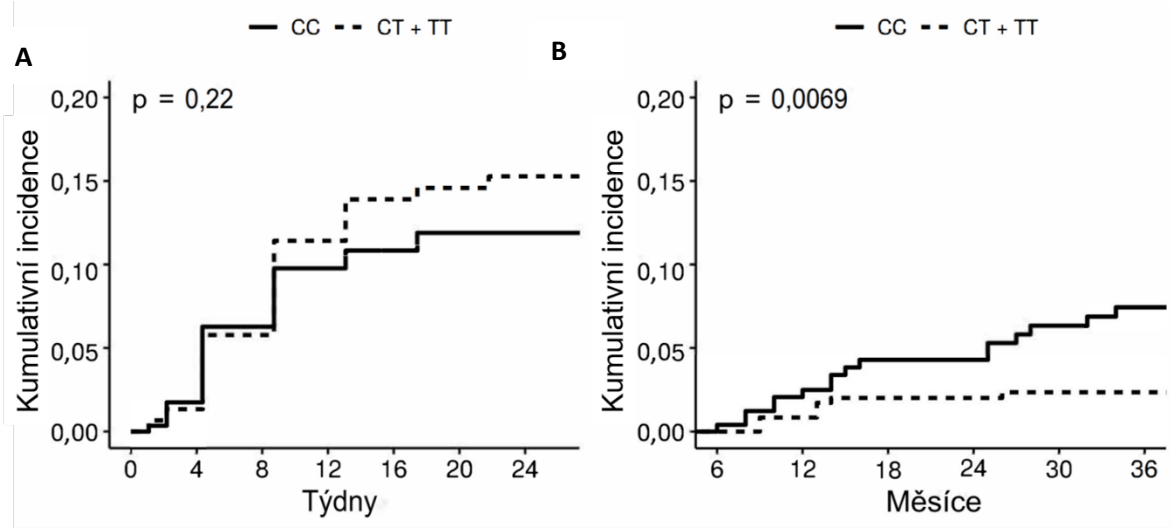
***Graf 3*.** Kaplan-Meierova křivka přežití pacientů po LTx dle doby výskytu CMV (A) a dle genotypu *IL28B* (B).



Asociace mezi výskytem CMV nemoci a genotypem *IL28B*.

Frekvence genotypů *IL28B* v časném potransplantačním období v podskupině s OPD se nelišily od podskupiny bez CMV nemoci (CC 33,3 %, CT+TT 66,7 % vs. CC 38,6 %, CT+TT 61,4 %, p = 0,22) (Graf 4A). V období po ukončení profylaxe proti CMV byl signifikantně častější výskyt genotypu CC zjištěn v podskupině s PPD (CC 61,1 %, CT+TT 38,9 %) ve srovnání s pacienty bez CMV nemoci (OR 0,43, 95% CI 0,23–0,81, p = 0,0069) (Graf 4B). Genotyp *IL28B* neměl vliv na dlouhodobé přežití pacientů po LTx (p = 0,92).

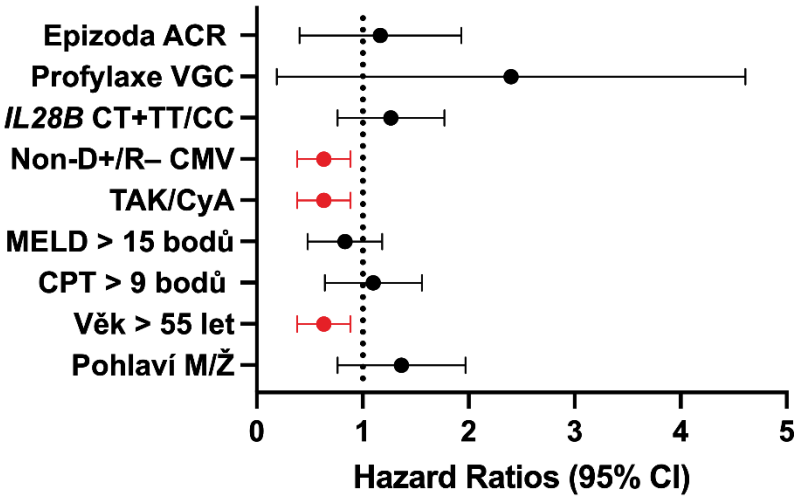
***Graf 4*.** Kumulativní incidence CMV nemoci dle genotypu *IL28B* a doby po LTx ve skupinách OPD (A) a PPD (B).



Evaluace protektivních faktorů

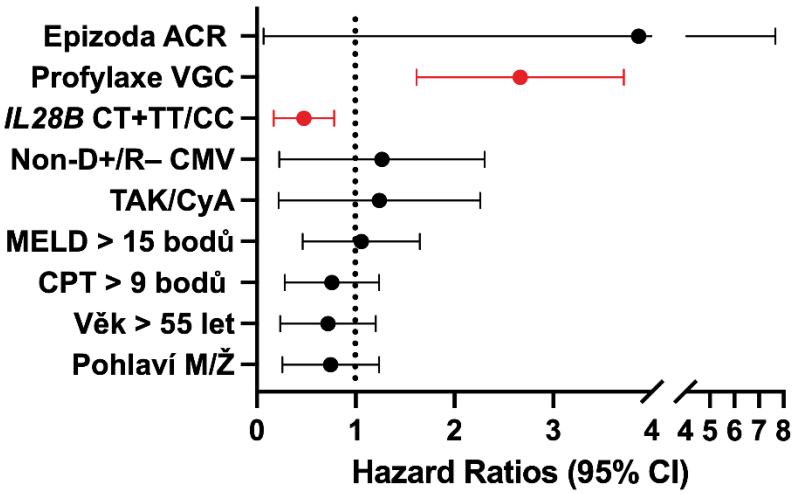
Ve skupině OPD neměl genotyp *IL28B* vliv na výskyt epizody CMV nemoci v alelickém (CC vs. CT + TT, p = 0,32) ani v recesivním modelu (CC + CT vs. TT p = 0,79). Jako protektivní faktory před rozvojem CMV nemoci byly identifikovány věk >55 let (p = 0,001), předtransplantační CMV sérostatus jiný než D+/R– (OR 0,39, 95% CI 0,2–0,7, p < 0,001) a imunosupresivní léčba takrolimem (OR 0,48, 95% CI 0,28–0,83, p = 0,01). Tyto výsledky zůstaly signifikantní také v multivariantní analýze (Graf 5).

***Graf 5*.** Multivariantní analýza rizikových faktorů OPD CMV



Nosičství alely T genu *IL28B* mělo protektivní vliv na výskyt PPD (OR 0,4, 95% CI 0,2–0,8, p = 0,008), podobně jako věk >55 let (p = 0,02). Signifikantní zvýšení rizika PPD bylo zjištěno při použití valganciklovir či ganciklovir v profylaxi CMV (OR 2,68, 95% CI 1,09–5,95, p = 0,023). V multivariantní analýze zůstaly z výše zmíněných rizikových faktorů významné jen nosičství alely T genu *IL28B* a typ antivirové profylaxe (Graf 6).

***Graf 6*.** Multivariantní analýza rizikových faktorů rozvoje PPD CMV



4.2 Nosiči alely G varianty rs738409 *PNPLA3* u pacientů s cirhózou C a genotypem viru 1b mají nižší virémii HCV a selhání jater v nižším věku

Správné načasování LTx patří neodmyslitelně k faktorům spojeným s příznivějším potransplantačním průběhem. Znalost přirozeného průběhu jednotlivých jaterních onemocnění je tak zásadní k predikci prognózy pacientů a správného načasování LTx. Přirozený průběh jaterních onemocnění však může být do značné míry ovlivněn různými genetickými variantami. Jedna z nejdůležitějších variant s prokázanou asociací s progresí jaterních chorob je rs738409 c.444C>G (p.Ile148Met) v genu *PNPLA3 (Romeo et al. 2008)*. U chronické HCV infekce byl zatím popsán vliv nosičství alely G na progresi fibrózy jater, nikoliv ale na rozvoj chronického jaterní selhání jater (CLF, chronic liver failure) a nutnost LTx. Naším cílem bylo zhodnotit vliv genotypu *PNPLA3* na riziko rozvoje CLF u pacientů s HCV infekcí genotypem viru 1b, který byl dosud dominantním u kandidátů LTx s HCV infekcí v ČR.

Charakteristika souboru a metody

Retrospektivně jsme zhodnotili 172 dospělých pacientů s jaterní cirhózou C infikovaných genotypem 1b, kteří v našem centru podstoupili LTx v období 1995–2018. Vyřazeni byli pacienti s pozitivitou HBsAg či anti-HBc a pacienti s nadměrným příjmem alkoholu (> 60 g/den u mužů a > 40 g/den u žen). Sto pacientů bylo indikováno k LTx pro CLF dle MELD a Child-Pugh skóre (CPT) a 72 pacientů bylo k LTx indikováno pro malý HCC v cirhotických játrech. Žádný z pacientů nebyl léčen protivirovou léčbou v posledním roce před LTx. Protivirová léčba byla podávána až v potransplantačním období dle aktuální dostupnosti protivirových léků, buď režimem založeným na interferonu nebo režimem DAA. Frekvence genotypů *PNPLA3* byly porovnány s 647 pacienty z české populační průřezové studie MONICA (MONItoring trends and determinants in CArdiovascular disease) (Cifkova et al. 2010; Trunecka et al. 2018). Demografické údaje pacientů jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Demografická, klinická a laboratorní data skupin s CLF a HCC.

	CLF n = 100	HCC n = 72	P
Pohlaví, muži (n)	68 (68,0 %)	38 (52,8 %)	0,0428
Věk [roky]	53,5 ± 7,2	57,6 ± 8,6	< 0,001
BMI [kg/m^2]	26,2 ± 4,2	26,8 ± 3,7	0,175
Diabetes mellitus 2. typu	27 (27,0)	25 (34,7)	0,277
CPT klasifikace			< 0,001
A	6 (6,0)	37 (51,4)	
B	48 (48,0)	27 (37,5)	
C	46 (46,0)	8 (11,1)	
CPT skóre [body]	9,1 ± 1,8	7,1 ± 1,9	< 0,001
MELD skóre [body]	14,1 ± 3,9	11,1 ± 3,7	< 0,001
Ascites			< 0,001
Žádný	44 (44,0)	53 (73,6)	
Malý	32 (32,0)	14 (19,5)	
Velký	24 (24,0)	5 (6,9)	
AFP [µg/l]	34,5 ± 50,1	337,1 ± 926,8	< 0,001
Celkový bilirubin [µmol/l]	51,8 ± 77,3	35,6 ± 46,7	< 0,001
Albumin [g/l]	29,0 ± 6,5	33,5 ± 6,8	< 0,001
ALT [µkat/l]	1,3 ± 0,9	1,5 ± 1,2	0,117
Celkový cholesterol [mmol/l]	3,4 ± 1,0	3,7 ± 1,0	0,004
HDL cholesterol [mmol/l]	0,9 ± 0,4	1,1 ± 0,4	0,037
LDL cholesterol [mmol/l]	1,9 ± 0,8	2,1 ± 0,7	0,080
Triacylglyceroly [mmol/l]	1,1 ± 0,5	1,3 ± 0,7	0,009
Protrombinový čas [INR]	1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,2	< 0,001

Údaje jsou vyjádřeny jako čísla (%) nebo průměry ± směrodatná odchylka.
MELD- model for End-Stage Liver Disease; CPT- Child-Pugh-Turcotte

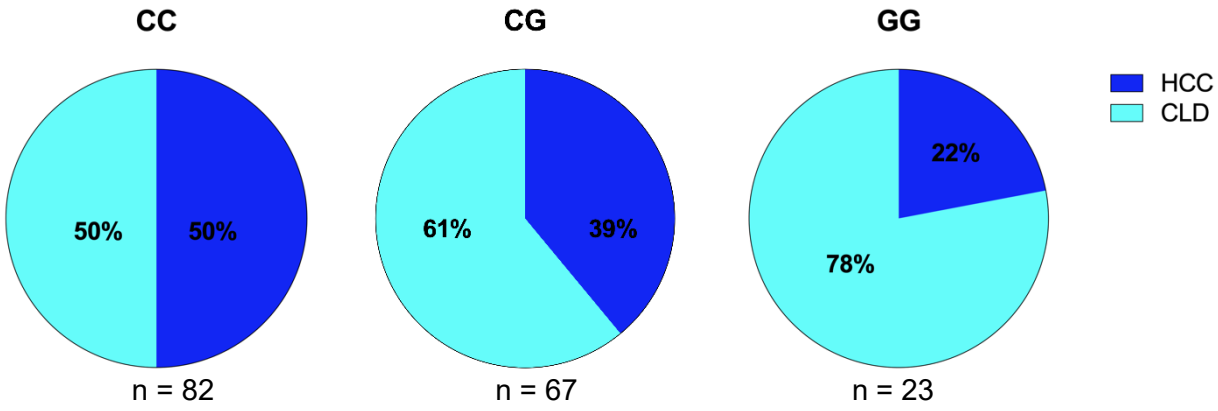
Asociace genotypu *PNPLA3* s průběhem jaterního onemocnění

Pacienti indikovaní k LTx pro CLF (funkční klasifikace cirhózy CPT B a C) byli významně mladší, častěji byli zastoupeni muži a měli nižší hodnoty sérového cholesterolu a triacylglycerolů ve srovnání s pacienty, kteří byli k LTx indikováni pro HCC.

Zastoupení genotypů *PNPLA3* ve skupině pacientů s CLF se významně lišilo ve srovnání s pacienty s HCC a zastoupení nepříznivých genotypů (CG a GG) bylo významně vyšší ve skupině CLF, a to jak v alelickém (OR 1,9, 95% CI 1,02–3,48, p = 0,045), tak recesivním modelu (OR 2,94, 95% CI 1,03–7,51, p = 0,042) (Tab. 4).

Frekvence genotypů *PNPLA3* se lišily rovněž při srovnání skupiny CLF a studie MONICA, a to jak v alelickém (OR 1,87, 95% CI 1,222–2,875, p = 0,004), tak v recesivním (OR 3,33, 95%CI 1,824–6,084, p < 0,001) modelu (Tab. 4). Hodnoty OR se v recesivním modelu prakticky zdvojnásobily, z čehož lze soudit na aditivní efekt každé alely G (Graf 7). Naproti tomu frekvence genotypů ve skupině HCC se od frekvence genotypů ve studii MONICA signifikantně nelišily (Tab. 4).

Graf 7. Indikace k LTx (CLF nebo HCC) dle genotypu *PNPLA3*



CLF- chronické jaterní selhání; HCC- hepatocelulární karcinom

Tabulka 4. Frekvence genotypů varianty rs738409 C>G *PNPLA3* ve skupinách CLF, HCC a studii MONICA.

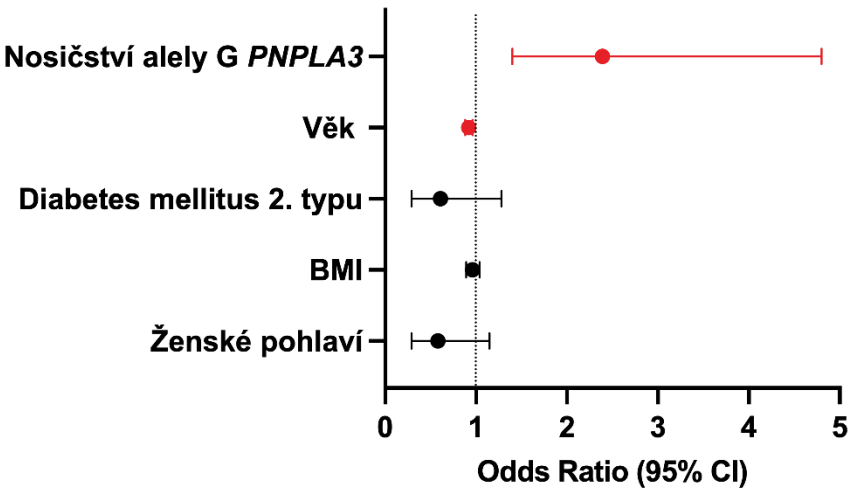
Lokus	Genotyp	CLF (n = 100)	HCC (n = 72)	OR	95% CI	p
PNPLA3 rs738409 c.444C>G	CC	41 (41 %)	41 (57 %)	1	-	-
	CG	41 (41 %)	26 (36 %)	1,90	1,017–3,472	0,045[a]
	GG	18 (18 %)	5 (7 %)	2,94	1,032–7,513	0,042[b]
Lokus	Genotyp	CLF (n = 100)	MONICA (n = 647)	OR	95 % CI	p
PNPLA3 rs738409 c.444C>G	CC	41 (41 %)	366 (57 %)	1	-	-
	CG	41 (41 %)	241 (37 %)	1,87	1,222–2,875	0,004[a]
	GG	18 (18 %)	40 (6 %)	3,33	1,824–6,084	<0,001[b]
Lokus	Genotyp	HCC (n = 72)	MONICA (n = 647)	OR	95 % CI	p
PNPLA3 rs738409 c.444C>G	CC	41 (57 %)	366 (57 %)	1	-	-
	CG	26 (36 %)	241 (37 %)	0,98	0,602–1,610	0,951[a]
	GG	5 (7 %)	40 (6 %)	1,13	0,432–2,968	0,800[b]

[a] alelický model (*PNPLA3* CG + GG vs. CC), [b] recesivní model (*PNPLA3* GG vs. CC + CG)

Rizikové faktory nutnosti LTx

V logistické regresní analýze byly jako rizikové faktory nutnosti LTx pro CLF identifikovány věk a varianta rs738409 *PNPLA3*, nosičství alely G zvýšilo riziko LTx pro CLF 2,4x (Graf 8).

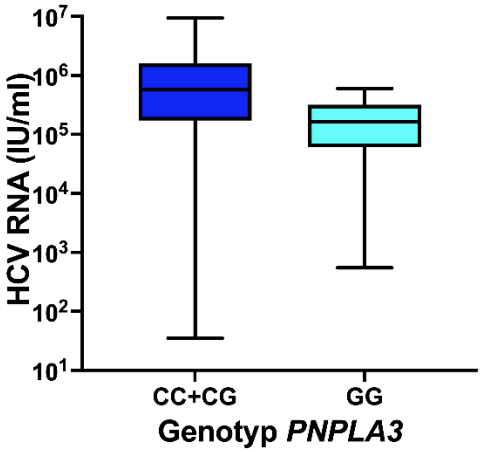
Graf 8. Rizikové faktory nutnosti LTx.



HCV RNA před transplantací

Kvantitativní stanovení virémie před LTx bylo k dispozici u 127/172 pacientů (65 ve skupině CLF a 62 ve skupině HCC). V této podskupině mělo genotyp *PNPLA3* CC 64 pacientů, genotyp CG 49 pacientů a genotyp GG 14 pacientů. Homozygoti GG měli signifikantně nižší předtransplantační virémii ve srovnání s nosiči alespoň jedné alely C (medián, interkvartilový rozsah [IQR]; GG 162 500 [46 200–269 000] IU/ml vs. CC + CG 638 000 [179 000–1 632 500] IU/ml, $p < 0,001$) (Graf 9). Předtransplantační virémie byla také významně nižší u pacientů s CLF ve srovnání se skupinou HCC (medián [IQR]; CLF 344 000 [116 000–846 368] IU/ml vs. HCC 823 500 [259 750–1 760 000], $p = 0,008$).

***Graf 9*.** Vliv genotypu rs738409 *PNPLA3* na virémii (HCV RNA) před LTx.



4.3 Exprese transkriptů asociovaných s operační tolerancí u pacientů s HBV po transplantaci ledviny (dosud nepublikovaná data).

Léčba HBV pomocí NUC výrazně zlepšuje přežití štěpů i příjemců (pacientů) po transplantaci ledviny (RTx). Protivirová léčba účinně brání reaktivaci HBV a progresi jaterního onemocnění u imunosuprimovaných jedinců, přesto však dochází k imunitní modifikaci na podkladě reziduální replikace HBV, která je naopak pro pacienty přínosná. Již v minulosti jsme popsali vynikající dlouhodobé přežití u HBV infikovaných příjemců štěpu ledviny ve srovnání s historickými kontrolami příjemců štěpu ledviny bez HBV infekce (Sperl et al. 2013). Předpokládali jsme, že u příjemců ledviny má chronická HBV infekce suprimovaná léčbou NUC schopnost navodit OT změnou v regulaci adaptivní imunitní odpovědi.

Charakteristika souboru a metody

Jednalo se o retrospektivní studii navrženou k analýze exprese transkriptů asociovaných s OT u příjemců RTx a HBV infekcí. Expresní profily byly porovnávány v pěti skupinách: příjemci RTx se stabilní funkcí štěpu, s HBV (n = 9) nebo bez HBV infekce (n = 8), pacienti bez RTx s chronickou HBV léčenou (n = 9) i neléčenou (n = 8) a zdravé kontroly (n = 6). Příjemci RTx měli všichni dlouhodobě stabilně dobrou funkci štěpu nejméně 5 let po RTx. Párování pacientů proběhlo dle doby od RTx, koncentrace sérového kreatininu a věku. Pacienti z kontrolní skupiny s chronickou HBV infekcí bez transplantované ledviny byli k předchozí skupině přiřazováni dle věku. Charakteristika pacientů je uvedena v Tab. 5. Analyzované geny byly vybrané na základě literárního přehledu jako transkripty asociované s operační tolerancí u RTx či LTx a jako transkripty asociované s imunitní odpovědí při HBV infekci.

***Tabulka 5*.** Charakteristika pacientů po RTx.

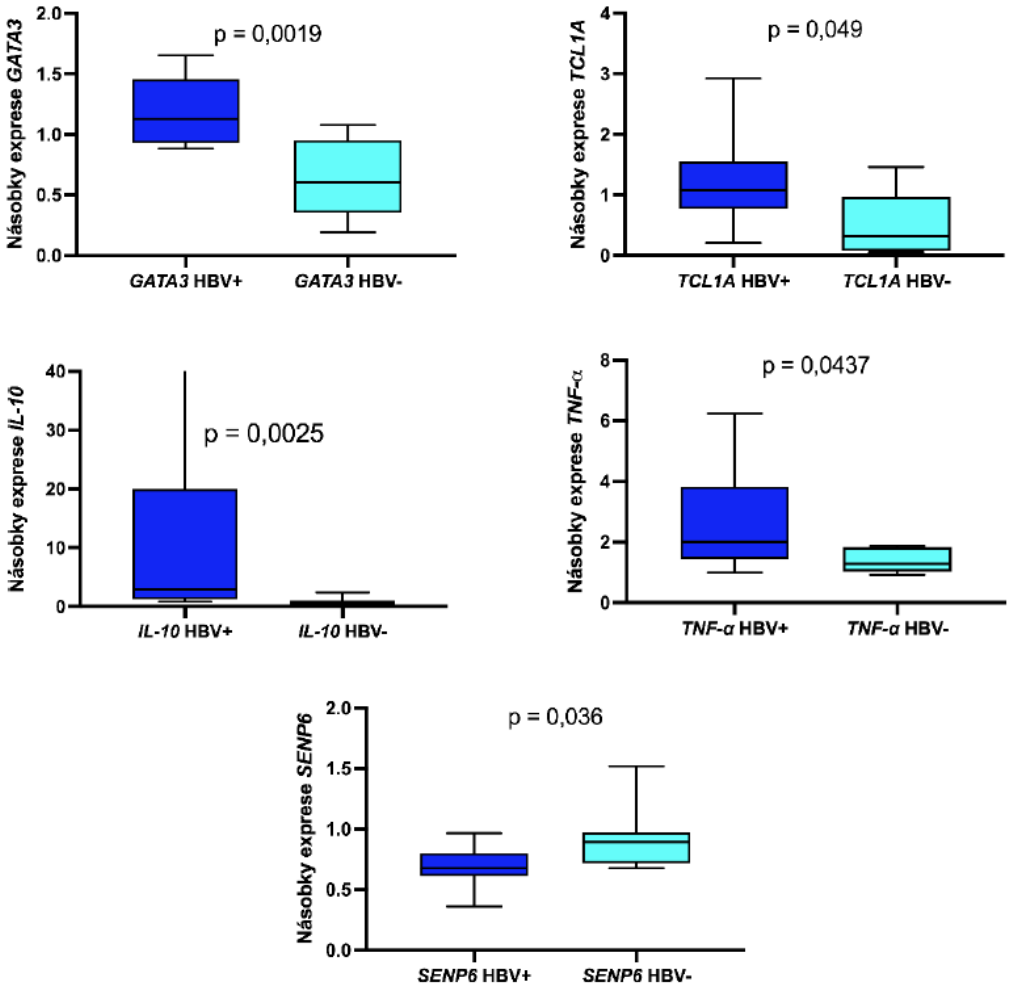
	HBV pozitivní RTx (n = 9)	**HBV negativní RTx** (n = 8)	p
Věk, [roky, medián], (rozptyl)	61,6 (45,7–70,7)	53,7 (37,6–72,9)	0,847
Pohlaví (M/Ž)	7/2	6/2	
Dárce (zemřelý/živý)	9/0	6/2	
PRA max. [%, medián], (rozptyl)	8 (2–46)	7,5 (0–39)	0,809
HLA neshody [medián], (rozptyl)	3 (0–5)	3 (2–6)	
Věk dárce, [roky, medián], (rozptyl)	45 (11–75)	41 (15–60)	
Doba dialýzy [roky, medián], (rozptyl)	2,5 (1–11,2)	1.2 (0–2,5)	0,135
Doba od RTx [roky, medián], (rozptyl)	14,3 (6–18,1)	16.5 (7,9–20,3)	0,211
Kreatinin [µmol/l, medián], (rozptyl)	119,5 (67,5–334,1)	161,7 (93–317,3)	0,673
Protivirová léčba			
LAM+TDF	6	0	
LAM	2	0	
ADF	2	0	

PRA- panel-reaktivní protilátky

Příjemci RTx s HBV mají vyšší expresi *GATA3, TCL1A, IL-10* a *TNF- α*

K objasnění uvažované protektivní role HBV infekce na přijetí štěpu ledviny byla porovnána exprese genů z periferní krve spojených s OT dle předchozích znalostí z literárního přehledu. Porovnali jsme příjemce štěpu ledviny s a bez HBV infekce. Pacienti s HBV měli významně vyšší expresi genů *GATA3* (p = 0,0019), *TCL1A* (p = 0,049), *IL-10* (p = 0,0025) a *TNF-α* (p = 0,027). Snížená exprese byla zaznamenaná v genu *SENP6* (p = 0,034) (Graf 10). Vzhledem k tomu, že obě skupiny byly léčeny udržovací imunosupresivní medikací, lze efekt této léčby vyloučit.

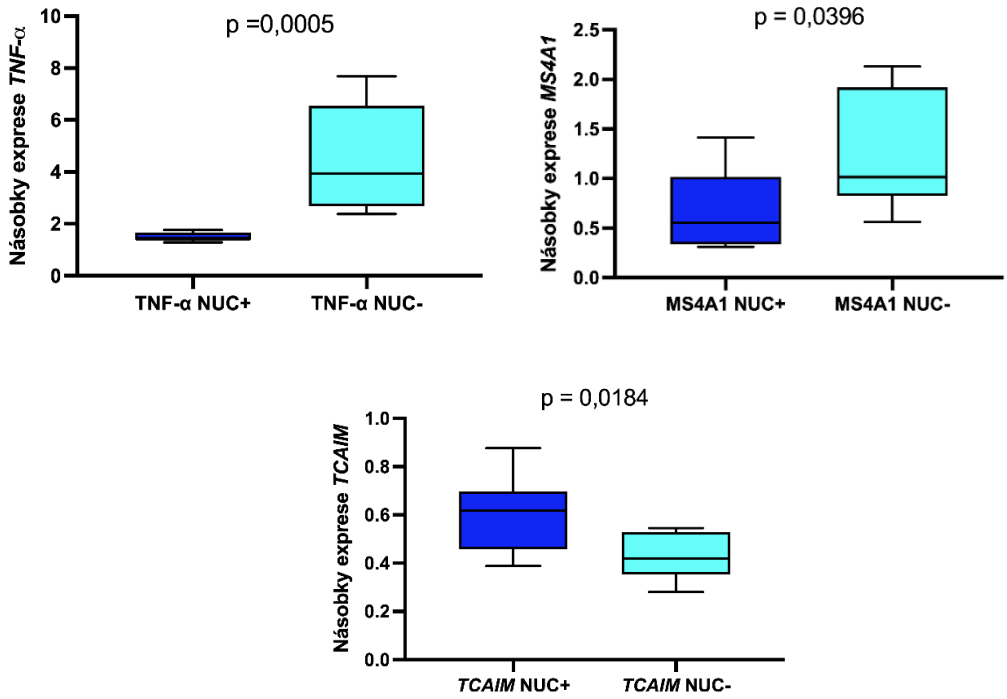
Graf 10. Exprese genů asociovaných s operační tolerancí, srovnání pacientů po RTx s HBV a bez HBV infekce. Násobky exprese k mediánu exprese zdravých kontrol.



Efekt protivirové léčby na expresi genů asociovaných s operační tolerancí

K vyloučení efektu protivirové terapie na expresi těchto genů byly srovnány skupiny netransplantovaných pacientů s chronickou HBV infekcí s protivirovou léčbou nebo bez léčby. Terapií byla ovlivněna exprese 3 genů, signifikantně klesla exprese *TNF-α* (p = 0,0005), *MS4A1* (p = 0,0396) a naopak se zvýšila exprese genu *TCAIM* (p = 0,0184), (Graf 11).

Graf 11. Exprese genů asociovaných s protivirovou léčbou u pacientů s HBV infekcí s protivirovou léčbou NUC a bez ní. Násobky exprese k mediánu exprese zdravých kontrol.



Efekt dlouhodobé imunosupresivní léčby na expresi transkriptů spojených s OT

K vyloučení vlivu imunosupresivní léčby na expresi těchto transkriptů byly srovnány skupiny transplantovaných (n = 17) a netransplantovaných (tedy pacientů s i bez HBV a zdravé kontroly, n = 23). U příjemců ledviny došlo k významnému poklesu exprese *FOXP3* (p < 0,0001), *CD79A* (p = 0,0009), *FCRL1* (p = 0,013), *GATA3* (p = 0,023), *TCL1A* (p = 0,035) a *FCRL2* (p = 0,043). Zatímco exprese *FOXP3* byla snížena u příjemců ledviny s i bez HBV infekce, exprese *GATA3* a TCL1A byly vyšší u příjemců s HBV infekcí než HBV negativních.

5. Obecná diskuze

V první práci (Chmelova et al. 2019) jsme prokázali, že **nosičství alely *IL28B*** rs12979860 **T** je spojeno s nižším výskytem CMV nemoci po ukončení antivirové profylaxe (PPD). Souvislost *IL28B* s prolomením profylaxe v časném potransplantačním období jsme však neprokázali. Výsledky jsme porovnali s dalšími studiemi, které se zabývaly podobnou problematikou. Jejich závěry jsou kontroverzní. Opačné výsledky publikovala švýcarská skupina, ale při podrobnějším zhodnocení je patrné, že se jedná o heterogenní soubor pacientů po různých SOT, kterým byla protivirová léčba proti CMV podávána jak v režimu preemptivním, tak univerzálním (Manuel et al. 2015). Asociace s variantou *INFL4*, resp. *IL28B* byla patrná pouze ve skupině s preemptivně podávanou profylaxí CMV nemoci. Podobně tomu bylo v další práci u příjemců RTx, kde asociace byla prokázána pouze u pacientů bez univerzálně podávané profylaxe (Fernandez-Ruiz et al. 2015). Další práce v této oblasti naopak potvrzují naše výsledky, kdy alela T byla asociována s nižší incidencí CMV nemoci (Egli et al. 2014; Bravo et al. 2014).

Varianta *IL28B* rs12979860 byla poprvé popsaná v souvislosti se spontánní i léčbou interferonovým režimem navozenou eliminací HCV (Ge et al. 2009; Suppiah et al. 2009). Později byla identifikovaná varianta rs368234815 (dříve ss469415590) TT/ΔG, která je v silné genové vazbě s variantou rs12979860 C/T v evropské a asijské populaci (Prokunina-Olsson et al. 2013). Protein IFNL4 produkovaný alelami ΔG/ ΔG (odpovídá rs12979860 T/T) je spojen s vyšší bazální expresí ISG, jejíž úroveň se již nezvýší po stimulaci exogenním IFN-α z důvodu exhausce T lymfocytů (Sung et al. 2017). Zvýšení exprese ISG je však podmínkou pro dosažení eliminace HCV infekce.

Předpokladem pro dosažení imunitní kontroly CMV infekce je stimulace IFN-I a IFN-II, které jsou ale velmi účinně antagonizované IE geny CMV, a které efektivně inhibují kanonickou interferonovou signalizační kaskádu. Dle našich poznatků není doposud tento jev popsán u IFN-III, ale vzhledem k tomu, že IE1 inhibuje STAT2, lze předpokládat stejný mechanismus i pro tuto skupinu interferonů. Domníváme se tak, že schopnost exprese *IFNL4* je z doposud nepopsaného důvodu dostačující k imunitní kontrole CMV infekce.

Vzhledem k vyšším nákladům na univerzální profylaxi CMV i k nežádoucím účinkům profylaxe by klinickým přínosem v budoucnu mohla být snadnější identifikace

pacientů v riziku CMV infekce a adjustací profylaxe dle rizikových faktorů, z nichž většina je snadno ověřitelná (CMV sérostatus, věk, užívání takrolimu). Genotypizace *IL28B* je široce zavedenou metodou, nicméně k uvedení do klinické praxe by bylo třeba naše výsledky validovat na nezávislém souboru pacientů.

Varianta *PNPLA3* rs738409 c.444C>G je asociovaná se steatózou a rychlejší progresí fibrózy i u pacientů s infekcí HCV. V naší práci jsme dále doložili, že alela G je zároveň asociována s rychlejší progresí CLF vyžadující LTx v nižším věku, avšak s nižší virémií HCV. Ve srovnání s pacienty indikovanými k LTx pro HCC při zachovalé funkci jater a s kontrolní studií MONICA měli nosiči alely G genu *PNPLA3* častěji CLF (Senkerikova et al. 2019).

Vysvětlení této asociace mezi nosičstvím variantní alely G a časnějšího rozvoje CLF u pacientů s chronickou HCV infekcí zahrnuje mechanismy již popsané u ALD a NASH. Recentní meta-analýza ukázala, že bělošská populace s HCV infekcí a genotypem GG má více vyjádřenou steatózu i fibrózu jater, podobně tomu bylo ve studii HALT-C (Fan et al. 2016; Ali et al. 2016). Rozdíl však nacházíme v případě HCC, kdy pro ALD a NASH je dobře dokumentovaná asociace s alelou *PNPLA3* G, avšak pro HCV nikoliv (Falleti et al. 2011; Liu et al. 2014; Trepo et al. 2012). Nosičství alely G u chronické HCV infekce může být interpretováno jako protektivní proti vzniku HCC v cirhotických játrech. Domníváme se však, že taková interpretace není správná. Nejedná se totiž o přímý protektivní efekt alely G před rozvojem HCC, nýbrž o akceleraci rozvoje chronického selhání jater. Nosiči alely G jsou indikováni k transplantaci jater v mladším věku, tj. dříve, než se v jejich cirhotických játrech vytvoří HCC. Tuto představu podporuje i skutečnost, že vyšší věk byl nejsilnějším rizikovým faktorem vzniku HCC v cirhotických játrech v řadě dosud publikovaných studií (Aleman et al. 2013). Předpokládáme, že nosiči alely G mají rychleji progredující jaterní chorobu, neboť trpí kromě jaterního zánětu vyvolaného HCV infekcí i steatohepatitidou z vyšší akumulace lipidů v játrech, tj. mají duální chorobu. Naši představu bohužel nelze potvrdit hodnocením histologických nálezů explantovaných jater, neboť v pokročilých stadiích jaterní cirhózy mizí dříve přítomná steatóza, ale svědčí pro ni aditivní efekt počtu přítomných alel G.

Rychlejší progrese HCV infekce do CLF byla překvapivě spojena s nižší virémií před LTx. Domníváme se, že vysvětlením nižší virémie u nosičů alely G je ztížená kompletace virionu a jeho uvolnění z hepatocytu, což je děj závislý na tvorbě VLDL, která vázne právě

u nosičů variantní alely G. Náš výsledek je kompatibilní se zjištěními studie HALT-C, že na progresi fibrózy jater u pacientů léčených pro HCV neměla vliv výše virémie, ale jen skutečnost, zda došlo k eliminaci HCV či nikoliv (Huang et al. 2007).

V poslední dosud nepublikované práci týkající se **HBV infekce u příjemců transplantovaných ledvin** jsme se pokusili objasnit příčinu dříve publikovaných vynikajících výsledků přežití štěpů ledviny u příjemců s léčenou HBV infekcí (Cosconea et al. 2012; Sperl et al. 2013). Vycházeli jsme z faktu, že nejčastější příčinou ztráty štěpu ledviny je alloantigen-dependentní rejekce štěpu. Nejlepší přežití štěpu mají pacienti, jejichž imunita umožní navodit stav OT. Podobnou situaci je možné pozorovat v případě vertikálního přenosu HBV infekce nebo její akvizice v dětském věku, kdy často po několik dekád pozorujeme fázi imunotolerance (v současnosti se tato fáze nazývá HBeAg pozitivní chronická infekce HBV, viz Tab. 1). V této fázi je možné zaznamenat relativně vysokou replikaci HBV, přesto je však aktivita jaterních enzymů nízká a v histologickém obraze jsou patrné jen minimální nekroinflamatorní změny. Oproti původnímu předpokladu je však pravděpodobné, že za touto fází HBV nestojí nezralost imunitního systému v novorozeneckém a dětském věku, neboť byla prokázána identická Th1-buněčná imunitní odpověď HBV-specifických T-lymfocytů. Tyto buňky co do počtu a funkčnosti dokonce převýšily hodnoty u dospělých pacientů ve fázi imunitní clearance (Kennedy et al. 2012).

V naší práci jsme vyšetřili expresi panelu genů, které jsou literárně odpovědné za schopnost navodit OT u pacientů po transplantaci jater či ledviny a také markery spojené s imunitní tolerancí u pacientů s HBV (Appenzeller-Herzog, Hartleif, and Vionnet 2021). Ve skupině pacientů po transplantaci ledviny s chronickou HBV infekcí jsme prokázali zvýšenou expresi genů *GATA3, IL-10, TCL1A* a *TNF-α*, naproti tomu exprese *SENP6* byla snížená ve srovnání s transplantovanými pacienty bez HBV infekce. *GATA3* je transkripční faktor Th2-buněk popsaných v souvislosti s OT (Moraes-Vieira et al. 2012). HBV infekce podle jiné práce podporuje expresi *GATA3*, který tvoří trimer s GATA2 a HBx proteinem. Následkem je potom downregulace MICA/B (MHC class I polypeptide-related sequence A a B), které slouží jako ligandy receptorů NK buněk (Xing and Ferrari de Andrade 2020). *TCL1A* byl poprvé popsaný jako onkogen při rozvoji T a B lymfomů. Několik studií prokázalo jeho vyšší expresi u pacientů se známou OT díky podpoře proliferace a růstu buněk. Jeho působení je spojené s diferenciací B lymfocytů a produkcí

protizánětlivého IL-10 (Brinas, Danger, and Brouard 2021). Jeho souvislost s chronickou HBV infekcí však nebyla dle našich poznatků dosud zdokumentovaná.

Sporná však zůstává úloha TNF-α, který je dobře známý pro své prozánětlivé působení, naproti tomu však některé studie zároveň prokazují jeho schopnost aktivovat Tregs. TNF-α působí cestou receptorů TNFR1, který exprimován na řadě různých typů buněk a obsahuje cytoplasmatickou „death" doménu, a TNRF2, který je exprimovaný prakticky výhradně na imunitních buňkách. TNFR2 „death" doménu postrádá, avšak váže se na TNFR asociovaný faktor 2 a aktivuje NF-κB a MAP kinázovou signalizační kaskádu. Myši s deficitem TNFR1 měly vysoký sklon k infekcím, zatímco TNFR2 deficitní myši měly tendenci k exacerbacím zánětu (Mancusi et al. 2018). Aktivace konkrétního typu receptoru má tedy zásadní vliv na výsledný fenotyp.

Zajímavá je downregulace exprese genu *SENP6* v našem souboru, který je asociovaný s funkcí NK buněk a který byl v několika pracích upregulovaný u pacientů po transplantaci ledviny se známou OT (Perez-Sanz et al. 2019). Tato diskrepance může být podmíněna celkově malým počtem pacientů ve sledovaných souborech, včetně našeho.

Naše výsledky mohou napomoci pochopit mechanismus, kterým vzniká OT. V budoucnu by pak dosažení OT mohlo být cílem nových terapeutických postupů za účelem zlepšení přežití transplantovaných orgánů i jejich příjemců.

6. Souhrn výsledků

1. Nosičství alely T v lokusu rs12979860 *IL28B* snižuje riziko rozvoje CMV nemoci po ukončení protivirové profylaxe u pacientů po transplantaci jater. Protektivními faktory proti prolomení CMV profylaxe byly jiný než D+/R– sérostatus, věk příjemce vyšší než 55 let a imunosuprese založená na takrolimu. Užívání valgancykloviru bylo rizikové pro rozvoj postprofylaktické CMV nemoci, zatímco nosičství alely T bylo faktorem protektivním.

2. Nosiči alely G lokusu rs738409 *PNPLA3* měli vyšší riziko progrese CLF a potřebovali tak transplantaci jater v mladším věku. Homozygoti GG měli před transplantací nižší virémii.

3. Geny související s operační tolerancí, *GATA3, TCL1A, IL-10* a *TNF-α,* byly zvýšeně exprimovány u pacientů po transplantaci ledviny s HBV infekcí, zatímco exprese *SENP6* byla snížena. Netransplantovaní pacienti s chronickou léčenou HBV měli v porovnání s pacienty s neléčenou HBV sníženou expresi *TNF-α*, *MS4A1* a *TCAIM*. Pacienti po transplantaci ledviny potom měli ve srovnání s netransplantovanými sníženou expresi *FOXP3*, *CD79A*, *FCRL1*, *GATA3*, *TCL1A* a *FCRL2*. Zatímco exprese *FOXP3* byla snížena u transplantovaných s HBV i bez HBV, exprese *GATA3* a *TCL1A* byla u pacientů s HBV vyšší než u pacientů bez HBV.

7. Seznam vybraných prezentací a publikací

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

1. Chmelová K, Fraňková S, Jirsa M, Neřoldová M, Sticová E, Merta D, Šenkeříková R, Trunečka P, Špičák J, Šperl J. **IL28B rs12979860 T allele protects against CMV disease in liver transplant recipients in the post-prophylaxis and late period.** Transplant infectious disease. 2019, 21(4), e13124. **IF 2,071**
2. Šenkeříková R, Fraňková S, Jirsa M, Kreidlová M, Merta D, Neřoldová M, Chmelová K, Špičák J, Šperl J. **PNPLA3 rs738409 G allele carriers with genotype 1b HCV cirrhosis have lower viral load but develop liver failure at younger age**. PLoS ONE [online]. 2019, 14(9), e0222609. **IF 2,740**

Publikace *in* extenso, bez vztahu k tématu disertace

1. Chmelová K, Šperl J, Špičák J. **Covid-19 a játra.** Farmakoterapeutická revue. 2021, **6**(5), 608-613.
2. Rábeková Z, Fraňková S, Jirsa M, Neřoldová M, Lunova M, Fabián O, Květoň M, Varyš D, Chmelová K, Adámková V, Hubáček J, Špičák J, Merta D, Šperl J. **Alpha-1 Antitrypsin and Hepatocellular Carcinoma in Liver Cirrhosis: SERPINA1 MZ or MS Genotype Carriage Decreases the Risk**. International journal of molecular sciences. 2021, 22(19), 10560. **IF 6,208**
3. Varyš ., Slatinská J, Pítová V, Chmelová K, Špičák J, Novotný J, Fabián O, Šperl J, Fraňková S. **Cytomegalovirová enteritida jako neobvyklý zdroj krvácení do gastrointestinálního traktu.** Gastroenterologie a hepatologie. 2021, 75(4), 304-310.
4. Šperl J, Kriedlová M, Merta D, Chmelová K, Šenkeříková R, Fraňková S. **Paritaprevir/Ritonavir/Ombitasvir plus Dasabuvir regimen in the treatment of genotype 1 chronic hepatitis C infection in patients with severe renal impairment and end-stage renal disease: a real-life cohort.** Kidney and blood pressure research. 2018, 43(2), 594-605. **IF 2,123**
5. Chmelová K, Fraňková S, Šperl J. **Cytomegalovirová infekce a játra.** Gastroenterologie a hepatologie. 2017, 71(6), 517-523.
6. Špičák J, Chmelová K. **Inhibitory protonové pumpy - nové molekuly, nové poznatky.** Kardiologická revue. 2016, 18(1), 67-75.

Prezentace související přímo s Ph.D.

Ústní sdělení

1. Šenkeříková R, Fraňková S, Jirsa M, Kreidlová M, Merta D, Neřoldová M, Chmelová K, Šperl J. **Nosiči PNPLA3 rs 738409G alely infikovaní genotypem 1 viru hepatitidy C mají nižší virémii, ale vyšší riziko chronického selhání jater.** Pražské podzimní gastroenterologické dny. Praha. 26.09.2019 - 27.09.2019.
2. Chmelová K, Fraňková S, Jirsa M, Merta D, Špičák J, Trunečka P, Šperl J. **Genotyp IFNL4 rs12979860 příjemce ovlivňuje vznik pozdní CMV infekce u pacientů po**

transplantaci jater. II. kongres Společnosti pro orgánové transplantace ČLS JEP. Špindlerův Mlýn. 04.04.2018 - 07.04.2018.

3. Rábeková Z, Fraňková S, Jirsa M, Neřoldová M, Budišová L, Chmelová K, Šperl J. **Mezi kandidáty transplantace jater s cirhózou různé etiologie je významně více nosičů genotypu MZ genu SERPINA1 než v běžné populaci**. XLVIII. májové hepatologické dny. online. 12.05.2021 - 14.05.2021.
4. Rábeková Z, Fraňková S, Jirsa M, Neřoldová M, Budišová L, Fabián O, Květoň M, Varyš D, Chmelová K, Adámková V, Hubáček J, Špičák J, Šperl J. **MZ genotype of SERPINA1 gene is a risk factor for liver cirrhosis in alcoholic liver disease and NASH**. 29th United European Gastroenterology Week Virtual 2021. virtual, 03.10.2021 - 05.10.2021.

Postery

1. Chmelová K, Fraňková S, Jirsa M, Neřoldová M, Trunečka P, Špičák J, Šperl J. **Risk of late-onset CMV infection after liver transplantation is associated with recipient's IFNL4 rs12979860 genotype.** International Liver Congress / 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Amsterdam, NL, 19.04.2017 - 23.04.2017.
2. Šperl J, Hrubá P, Girmanová E, Týcová I, Fraňková S, Chmelová K, Viklický O. **Critical adaptive immune regulators are differentially regulated in kidney transplant recipients with or without chronic hepatitis B.** 68th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) / Liver Meeting. Washington, US, 20.10.2017 - 24.10.2017.

Prezentace nesouvisející přímo s Ph.D.

Ústní sdělení

1. Chmelová K. **ACLF**. *Akademie ČHS*. Praha, CZ. 21.02.2020 - 22.02.2020.
2. Chmelová K. **Akutní hepatitida E jako příčina ACLF**. Akademie České hepatologické společnosti ČLS JEP 2019. Praha, CZ. 06.09.2019.
3. Chmelová K. **CMV infekce nejen po transplantaci jater.** Edukační seminář klinická hepatologie. Praha. 08.03.2018 - 09.03.2018.
4. Fraňková S, Chmelová K, Merta D, Trunečka P, Špičák J, Šperl J. **Transplantace jater pro HCV infekci v éře přímo působících antivirotik, zkušenosti jednoho centra 2014 - 2017.** II. kongres Společnosti pro orgánové transplantace ČLS JEP. Špindlerův Mlýn. 04.04.2018 - 07.04.2018
5. Chmelová K, Fraňková S, Trunečka P. **Umíme vyléčit jaterní chirhózu?.** XLIX. májové hepatologické dny 2022. Olomouc, CZ. 11.05.2022 - 13.05.2022.
6. Chmelová K, Fraňková S, Šperl J, Froněk J, Trunečka P, Taimr P, Špičák J. **Výsledky transplantace jater pro metastázy neuroendokrinního tumoru**. XLIX. májové hepatologické dny 2022. Olomouc, CZ. 11.05.2022 - 13.05.2022
7. Chmelová K, Fraňková S, Viklický O, Slatinská J, Rábeková Z, Šperl J. **Lamivudin v profylaxi reaktivaci a přenosu HBV infekce u pacientů po transplantaci ledviny.** XLVIII. májové hepatologické dny. online. 12.05.2021 - 14.05.2021

8. Chmelová K, Fraňková S, Šperl J. **Akutní hepatitida E jako příčína akutního selhání jater nasedajícího na chronické.** XLVII. májové hepatologické dny. Plzeň, CZ. 15.05.2019 - 17.05.2019.
9. Šperl J, Fraňková S, Chmelová K. **Paritaprevir/ritonavir, ombitasvir a dasabuvir u chronické HCV infekce genotyp 1b a cirhózy jater**. 6. kongres České gastroenterologické společnosti. Ostrava, CZ, 30.11.2017 - 02.12.2017.
10. Chmelová K, Fraňková S, Sticová E, Špičák J, Trunečka P, Šperl J. **Leukocytoklastická vaskulitida jako extrahepatální manifestace chronické hepatitidy C**. XLIV. májové hepatologické dny. Karlovy Vary, CZ, 25.05.2016 - 27.05.2016.

Postery

1. Šenkeříková R, Chmelová K, Fraňková S, Lunová M, Trunečka P, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. **Genetické faktory u alkoholické nemoci jater**. I. kongres Společnosti pro orgánové transplantace ČLS JEP. Špindlerův Mlýn. 30.03.2016 - 02.04.2016
2. Chmelová K, Fraňková S, Froněk J, Trunečka P, Taimr P, Špičák J, Šperl J. **Outcome of liver transplantation for metastatic neuroendocrine tumours**. 29th United European Gastroenterology Week Virtual 2021. virtual, 03.10.2021 - 05.10.2021.
3. Bajer L, Chmelová K, Březina J, Mačinga P, Taimr P, Špičák J, Drastich P. **Recurrence of primary biliary cholangitis after liver transplantation: A single center experience.** Digestive Disease Week (DDW). San Diego, US, 18.05.2019 - 21.05.2019.

Kapitoly v monografiích

1. Chmelová K. **Intestinální selhání.** In: J. Martínek, P. Trunečka. Gastroenterologie a hepatologie v algoritmech. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2021, s. 196-204.

2. Chmelová K. **Ascites při jaterní cirhóze**. In: J. Martínek, P. Trunečka. Gastroenterologie a hepatologie v algoritmech. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2021, s. 535-540.

3. Chmelová K, Trunečka P. **Primární biliární cholangitida**. In: J. Martínek, P. Trunečka. Gastroenterologie a hepatologie v algoritmech. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2021, s. 601-604.

4. Chmelová K, Trunečka P. **Wilsonova choroba**. In: J. Martínek, P. Trunečka. Gastroenterologie a hepatologie v algoritmech. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2021, s. 615-621.

5. Chmelová K. **Virová hepatitida A a E**. In: J. Martínek, P. Trunečka. Gastroenterologie a hepatologie v algoritmech. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2021, s. 581-584.

6. Chmelová K. **Primární sklerozující cholangitida**. In: J. Martínek, P. Trunečka. Gastroenterologie a hepatologie v algoritmech. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2021, s. 605-610.

7. Chmelová K. **Akutní selhání jater na chronickém**. In: P, Urbánek. Obyčejné nemoci trávicího traktu, 1. vyd. Praha: Grada, 2022, s. 276-288. V tisku.

8. Seznam použité literatury

Abate, D. A., S. Watanabe, and E. S. Mocarski. 2004. 'Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response', *J Virol*, 78: 10995-1006.

Ago, H., T. Adachi, A. Yoshida, M. Yamamoto, N. Habuka, K. Yatsunami, and M. Miyano. 1999. 'Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus', *Structure*, 7: 1417-26.

Alarcon, V., S. Hernandez, L. Rubio, F. Alvarez, Y. Flores, M. Varas-Godoy, G. V. De Ferrari, M. Kann, R. A. Villanueva, and A. Loyola. 2016. 'The enzymes LSD1 and Set1A cooperate with the viral protein HBx to establish an active hepatitis B viral chromatin state', *Sci Rep*, 6: 25901.

Aleman, S., N. Rahbin, O. Weiland, L. Davidsdottir, M. Hedenstierna, N. Rose, H. Verbaan, P. Stal, T. Carlsson, H. Norrgren, A. Ekbom, F. Granath, and R. Hultcrantz. 2013. 'A risk for hepatocellular carcinoma persists long-term after sustained virologic response in patients with hepatitis C-associated liver cirrhosis', *Clin Infect Dis*, 57: 230-6.

Ali, M., A. Yopp, P. Gopal, M. S. Beg, H. Zhu, W. Lee, and A. G. Singal. 2016. 'A Variant in PNPLA3 Associated With Fibrosis Progression but not Hepatocellular Carcinoma in Patients With Hepatitis C Virus Infection', *Clin Gastroenterol Hepatol*, 14: 295-300.

Allemann, P., N. Demartines, H. Bouzourene, A. Tempia, and N. Halkic. 2013. 'Long-term outcome after liver resection for hepatocellular carcinoma larger than 10 cm', *World J Surg*, 37: 452-8.

Alvisi, G., O. Marin, G. Pari, M. Mancini, S. Avanzi, A. Loregian, D. A. Jans, and A. Ripalti. 2011. 'Multiple phosphorylation sites at the C-terminus regulate nuclear import of HCMV DNA polymerase processivity factor ppUL44', *Virology*, 417: 259-67.

Anders, D. G., M. A. Kacica, G. Pari, and S. M. Punturieri. 1992. 'Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication', *J Virol*, 66: 3373-84.

Andre, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J. L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Brechot, G. Paranhos-Baccala, and V. Lotteau. 2002. 'Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles', *J Virol*, 76: 6919-28.

Appenzeller-Herzog, C., S. Hartleif, and J. Vionnet. 2021. 'Clinical parameters and biomarkers predicting spontaneous operational tolerance after liver transplantation: A scoping review', *Am J Transplant*, 21: 3312-23.

Balazs, Z., D. Tombacz, A. Szucs, Z. Csabai, K. Megyeri, A. N. Petrov, M. Snyder, and Z. Boldogkoi. 2017. 'Long-Read Sequencing of Human Cytomegalovirus Transcriptome Reveals RNA Isoforms Carrying Distinct Coding Potentials', *Sci Rep*, 7: 15989.

Balkow, S., A. Kersten, T. T. Tran, T. Stehle, P. Grosse, C. Museteanu, O. Utermohlen, H. Pircher, F. von Weizsacker, R. Wallich, A. Mullbacher, and M. M. Simon. 2001. 'Concerted action of the FasL/Fas and perforin/granzyme A and B pathways is mandatory for the development of early viral hepatitis but not for recovery from viral infection', *J Virol*, 75: 8781-91.

Balogh, J., D. Victor, 3rd, E. H. Asham, S. G. Burroughs, M. Boktour, A. Saharia, X. Li, R. M. Ghobrial, and H. P. Monsour, Jr. 2016. 'Hepatocellular carcinoma: a review', *J Hepatocell Carcinoma*, 3: 41-53.

Baltimore, D. 1971. 'Viral genetic systems', *Trans N Y Acad Sci*, 33: 327-32.

Barbalat, R., L. Lau, R. M. Locksley, and G. M. Barton. 2009. 'Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands', *Nat Immunol*, 10: 1200-7.

Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, J. Mous, and H. Jacobsen. 1993. 'Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions', *J Virol*, 67: 3835-44.

Bartenschlager, R., V. Lohmann, and F. Penin. 2013. 'The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection', *Nat Rev Microbiol*, 11: 482-96.

Bartenschlager, R., and H. Schaller. 1992. 'Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome', *EMBO J*, 11: 3413-20.

Bartosch, B., J. Dubuisson, and F. L. Cosset. 2003. 'Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes', *J Exp Med*, 197: 633-42.

Beck, J., and M. Nassal. 2003. 'Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein', *J Biol Chem*, 278: 36128-38.

Bertoletti, A., and C. Ferrari. 2016. 'Adaptive immunity in HBV infection', *J Hepatol*, 64: S71-S83.

Bertoletti, A., and M. Hong. 2014. 'Age-Dependent Immune Events during HBV Infection from Birth to Adulthood: An Alternative Interpretation', *Front Immunol*, 5: 441.

Bhat, N., and K. A. Fitzgerald. 2014. 'Recognition of cytosolic DNA by cGAS and other STING-dependent sensors', *Eur J Immunol*, 44: 634-40.

Bibert, S., A. Wojtowicz, P. Taffe, O. Manuel, E. Bernasconi, H. Furrer, H. F. Gunthard, M. Hoffmann, L. Kaiser, M. Osthoff, M. Cavassini, P. Y. Bochud, and H. I. V. Cohort Study Swiss. 2014. 'The IFNL3/4 DeltaG variant increases susceptibility to cytomegalovirus retinitis among HIV-infected patients', *AIDS*, 28: 1885-9.

Billerbeck, E., Y. H. Kang, L. Walker, H. Lockstone, S. Grafmueller, V. Fleming, J. Flint, C. B. Willberg, B. Bengsch, B. Seigel, N. Ramamurthy, N. Zitzmann, E. J. Barnes, J. Thevanayagam, A. Bhagwanani, A. Leslie, Y. H. Oo, S. Kollnberger, P. Bowness, O. Drognitz, D. H. Adams, H. E. Blum, R. Thimme, and P. Klenerman. 2010. 'Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 3006-11.

Biolatti, M., V. Dell'Oste, S. Pautasso, F. Gugliesi, J. von Einem, C. Krapp, M. R. Jakobsen, C. Borgogna, M. Gariglio, M. De Andrea, and S. Landolfo. 2018. 'Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp65 (pUL83) Dampens Type I Interferon Production by Inactivating the DNA Sensor cGAS without Affecting STING', *J Virol*, 92.

Biolatti, M., F. Gugliesi, V. Dell'Oste, and S. Landolfo. 2018. 'Modulation of the innate immune response by human cytomegalovirus', *Infect Genet Evol*, 64: 105-14.

Blumberg, B. S., H. J. Alter, and S. Visnich. 1965. 'A "New" Antigen in Leukemia Sera', *JAMA*, 191: 541-6.

Bodro, M., N. Sabe, L. Llado, C. Baliellas, J. Niubo, J. Castellote, J. Fabregat, A. Rafecas, and J. Carratala. 2012. 'Prophylaxis versus preemptive therapy for cytomegalovirus disease in high-risk liver transplant recipients', *Liver Transpl*, 18: 1093-9.

Boettler, T., E. Panther, B. Bengsch, N. Nazarova, H. C. Spangenberg, H. E. Blum, and R. Thimme. 2006. 'Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection', *J Virol*, 80: 3532-40.

Boni, C., P. Lampertico, L. Talamona, T. Giuberti, F. Invernizzi, V. Barili, P. Fisicaro, M. Rossi, M. C. Cavallo, A. Vecchi, G. Pedrazzi, A. Alfieri, M. Colombo, G. Missale, and C. Ferrari. 2015. 'Natural killer cell phenotype modulation and natural killer/T-cell interplay in nucleos(t)ide analogue-treated hepatitis e antigen-negative patients with chronic hepatitis B', *Hepatology*, 62: 1697-709.

Borst, E. M., R. Bauerfeind, A. Binz, T. M. Stephan, S. Neuber, K. Wagner, L. Steinbruck, B. Sodeik, T. Lenac Rovis, S. Jonjic, and M. Messerle. 2016. 'The Essential Human Cytomegalovirus Proteins pUL77 and pUL93 Are Structural Components Necessary for Viral Genome Encapsidation', *J Virol*, 90: 5860-75.

Borst, E. M., S. Mathys, M. Wagner, W. Muranyi, and M. Messerle. 2001. 'Genetic evidence of an essential role for cytomegalovirus small capsid protein in viral growth', *J Virol*, 75: 1450-8.

Bowie, A. G., and L. Unterholzner. 2008. 'Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling', *Nat Rev Immunol*, 8: 911-22.

Bravo, D., C. Solano, E. Gimenez, M. J. Remigia, I. Corrales, P. Amat, and D. Navarro. 2014. 'Effect of the IL28B Rs12979860 C/T polymorphism on the incidence and features of active cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant patients', *J Med Virol*, 86: 838-44.

Bressanelli, S., L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R. L. Vitale, M. Mathieu, R. De Francesco, and F. A. Rey. 1999. 'Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 13034-9.

Brinas, F., R. Danger, and S. Brouard. 2021. 'TCL1A, B Cell Regulation and Tolerance in Renal Transplantation', *Cells*, 10.

Brubaker, S. W., K. S. Bonham, I. Zanoni, and J. C. Kagan. 2015. 'Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective', *Annu Rev Immunol*, 33: 257-90.

Bruix, J., M. Sherman, and Diseases American Association for the Study of Liver. 2011. 'Management of hepatocellular carcinoma: an update', *Hepatology*, 53: 1020-2.

Bruss, V., J. Hagelstein, E. Gerhardt, and P. R. Galle. 1996. 'Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity', *Virology*, 218: 396-9.

Burdette, D. L., and R. E. Vance. 2013. 'STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol', *Nat Immunol*, 14: 19-26.

Busca, A., and A. Kumar. 2014. 'Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection', *Virol J*, 11: 22.

Butcher, S. J., J. Aitken, J. Mitchell, B. Gowen, and D. J. Dargan. 1998. 'Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction', *J Struct Biol*, 124: 70-6.

Cannon, M. J., D. S. Schmid, and T. B. Hyde. 2010. 'Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection', *Rev Med Virol*, 20: 202-13.

Carrere-Kremer, S., C. Montpellier-Pala, L. Cocquerel, C. Wychowski, F. Penin, and J. Dubuisson. 2002. 'Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus', *J Virol*, 76: 3720-30.

Catanese, M. T., K. Uryu, M. Kopp, T. J. Edwards, L. Andrus, W. J. Rice, M. Silvestry, R. J. Kuhn, and C. M. Rice. 2013. 'Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 9505-10.

Cifkova, R., Z. Skodova, J. Bruthans, V. Adamkova, M. Jozifova, M. Galovcova, P. Wohlfahrt, A. Krajcoviechova, R. Poledne, P. Stavek, and V. Lanska. 2010. 'Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. Czech MONICA and Czech post-MONICA', *Atherosclerosis*, 211: 676-81.

Cosconea, S., H. Fontaine, J. F. Meritet, M. Corouge, P. Sogni, A. Vallet-Pichard, V. Mallet, C. Legendre, and S. Pol. 2012. 'Benefits associated with antiviral treatment in kidney allograft recipients with chronic hepatitis B virus infection', *J Hepatol*, 57: 55-60.

Crissien, A. M., and C. Frenette. 2014. 'Current management of hepatocellular carcinoma', *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 10: 153-61.

Crowther, R. A., N. A. Kiselev, B. Bottcher, J. A. Berriman, G. P. Borisova, V. Ose, and P. Pumpens. 1994. 'Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy', *Cell*, 77: 943-50.

Dane, D. S., C. H. Cameron, and M. Briggs. 1970. 'Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis', *Lancet*, 1: 695-8.

Dao Thi, V. L., C. Granier, M. B. Zeisel, M. Guerin, J. Mancip, O. Granio, F. Penin, D. Lavillette, R. Bartenschlager, T. F. Baumert, F. L. Cosset, and M. Dreux. 2012. 'Characterization of

hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps', *J Biol Chem*, 287: 31242-57.

Das, A., G. Ellis, C. Pallant, A. R. Lopes, P. Khanna, D. Peppa, A. Chen, P. Blair, G. Dusheiko, U. Gill, P. T. Kennedy, M. Brunetto, P. Lampertico, C. Mauri, and M. K. Maini. 2012. 'IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection', *J Immunol*, 189: 3925-35.

Dell'Oste, V., M. Biolatti, G. Galitska, G. Griffante, F. Gugliesi, S. Pasquero, A. Zingoni, C. Cerboni, and M. De Andrea. 2020. 'Tuning the Orchestra: HCMV vs. Innate Immunity', *Front Microbiol*, 11: 661.

Dell'Oste, V., D. Gatti, F. Gugliesi, M. De Andrea, M. Bawadekar, I. Lo Cigno, M. Biolatti, M. Vallino, M. Marschall, M. Gariglio, and S. Landolfo. 2014. 'Innate nuclear sensor IFI16 translocates into the cytoplasm during the early stage of in vitro human cytomegalovirus infection and is entrapped in the egressing virions during the late stage', *J Virol*, 88: 6970-82.

Dervite, I., D. Hober, and P. Morel. 2001. 'Acute hepatitis B in a patient with antibodies to hepatitis B surface antigen who was receiving rituximab', *N Engl J Med*, 344: 68-9.

Dobbs, N., N. Burnaevskiy, D. Chen, V. K. Gonugunta, N. M. Alto, and N. Yan. 2015. 'STING Activation by Translocation from the ER Is Associated with Infection and Autoinflammatory Disease', *Cell Host Microbe*, 18: 157-68.

Donnelly, R. P., and S. V. Kotenko. 2010. 'Interferon-lambda: a new addition to an old family', *J Interferon Cytokine Res*, 30: 555-64.

Dusheiko, G. M., J. H. Hoofnagle, W. G. Cooksley, S. P. James, and E. A. Jones. 1983. 'Synthesis of antibodies to hepatitis B virus by cultured lymphocytes from chronic hepatitis B surface antigen carriers', *J Clin Invest*, 71: 1104-13.

EASL. 2016. 'EASL Clinical Practice Guidelines: Liver transplantation', *J Hepatol*, 64: 433-85.

———. 2017. 'EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection', *J Hepatol*, 67: 370-98.

———. 2020. 'EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series()', *J Hepatol*, 73: 1170-218.

Eble, B. E., D. R. MacRae, V. R. Lingappa, and D. Ganem. 1987. 'Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen', *Mol Cell Biol*, 7: 3591-601.

Egli, A., A. Humar, and D. Kumar. 2012. 'State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician', *Clin Infect Dis*, 55: 1678-89.

Egli, A., A. Levin, D. M. Santer, M. Joyce, D. O'Shea, B. S. Thomas, L. F. Lisboa, K. Barakat, R. Bhat, K. P. Fischer, M. Houghton, D. L. Tyrrell, D. Kumar, and A. Humar. 2014. 'Immunomodulatory Function of Interleukin 28B during primary infection with cytomegalovirus', *J Infect Dis*, 210: 717-27.

Elazar, M., K. H. Cheong, P. Liu, H. B. Greenberg, C. M. Rice, and J. S. Glenn. 2003. 'Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication', *J Virol*, 77: 6055-61.

Elazar, M., P. Liu, C. M. Rice, and J. S. Glenn. 2004. 'An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication', *J Virol*, 78: 11393-400.

Evans, A. S. 1978. 'Infectious mononucleosis and related syndromes', *Am J Med Sci*, 276: 325-39.

Evans, M. J., T. von Hahn, D. M. Tscherne, A. J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatziioannou, J. A. McKeating, P. D. Bieniasz, and C. M. Rice. 2007. 'Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry', *Nature*, 446: 801-5.

Fabris, C., E. Falleti, A. Cussigh, D. Bitetto, E. Fontanini, S. Bignulin, S. Cmet, E. Fornasiere, E. Fumolo, S. Fangazio, A. Cerutti, R. Minisini, M. Pirisi, and P. Toniutto. 2011. 'IL-28B

rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC', *J Hepatol*, 54: 716-22.

Falleti, E., C. Fabris, S. Cmet, A. Cussigh, D. Bitetto, E. Fontanini, E. Fornasiere, S. Bignulin, E. Fumolo, E. Bignulin, M. Pirisi, and P. Toniutto. 2011. 'PNPLA3 rs738409C/G polymorphism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence', *Liver Int*, 31: 1137-43.

Fan, J. H., M. Q. Xiang, Q. L. Li, H. T. Shi, and J. J. Guo. 2016. 'PNPLA3 rs738409 Polymorphism Associated with Hepatic Steatosis and Advanced Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C Virus: A Meta-Analysis', *Gut Liver*, 10: 456-63.

Fernandez-Ruiz, M., I. Corrales, M. Arias, J. M. Campistol, E. Gimenez, J. Crespo, M. O. Lopez-Oliva, I. Beneyto, P. L. Martin-Moreno, F. Llamas-Fuente, A. Gutierrez, T. Garcia-Alvarez, R. Guerra-Rodriguez, N. Calvo, A. Fernandez-Rodriguez, J. M. Tabernero-Romo, M. D. Navarro, A. Ramos-Verde, J. M. Aguado, D. Navarro, and Opera Study Group. 2015. 'Association between individual and combined SNPs in genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients', *Am J Transplant*, 15: 1323-35.

Ferre, P., and F. Foufelle. 2007. 'SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective', *Horm Res*, 68: 72-82.

Foy, E., K. Li, C. Wang, R. Sumpter, Jr., M. Ikeda, S. M. Lemon, and M. Gale, Jr. 2003. 'Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease', *Science*, 300: 1145-8.

Frenette, C. T., A. J. Isaacson, I. Bargellini, S. Saab, and A. G. Singal. 2019. 'A Practical Guideline for Hepatocellular Carcinoma Screening in Patients at Risk', *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes*, 3: 302-10.

Gamadia, L. E., E. B. Remmerswaal, J. F. Weel, F. Bemelman, R. A. van Lier, and I. J. Ten Berge. 2003. 'Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease', *Blood*, 101: 2686-92.

Ganem, D., and A. M. Prince. 2004. 'Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences', *N Engl J Med*, 350: 1118-29.

Ge, D., J. Fellay, A. J. Thompson, J. S. Simon, K. V. Shianna, T. J. Urban, E. L. Heinzen, P. Qiu, A. H. Bertelsen, A. J. Muir, M. Sulkowski, J. G. McHutchison, and D. B. Goldstein. 2009. 'Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance', *Nature*, 461: 399-401.

Gerlich, W. H. 2013. 'Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now', *Virol J*, 10: 239.

Gerna, G., A. Sarasini, M. Patrone, E. Percivalle, L. Fiorina, G. Campanini, A. Gallina, F. Baldanti, and M. G. Revello. 2008. 'Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection', *J Gen Virol*, 89: 853-65.

Glebe, D., M. Aliakbari, P. Krass, E. V. Knoop, K. P. Valerius, and W. H. Gerlich. 2003. 'Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus', *J Virol*, 77: 9511-21.

Goodrum, F. 2016. 'Human Cytomegalovirus Latency: Approaching the Gordian Knot', *Annu Rev Virol*, 3: 333-57.

Grakoui, A., D. W. McCourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1993. 'A second hepatitis C virus-encoded proteinase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 10583-7.

Griffiths, P., R. Whitley, D. R. Snydman, N. Singh, M. Boeckh, and Forum International Herpes Management. 2008. 'Contemporary management of cytomegalovirus infection in transplant recipients: guidelines from an IHMF workshop, 2007', *Herpes*, 15: 4-12.

Gripon, P., J. Le Seyec, S. Rumin, and C. Guguen-Guillouzo. 1995. 'Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity', *Virology*, 213: 292-9.

Guidotti, L. G., C. M. Eggers, A. K. Raney, S. Y. Chi, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, and A. McLachlan. 1999. 'In vivo regulation of hepatitis B virus replication by peroxisome proliferators', *J Virol*, 73: 10377-86.

Guidotti, L. G., D. Inverso, L. Sironi, P. Di Lucia, J. Fioravanti, L. Ganzer, A. Fiocchi, M. Vacca, R. Aiolfi, S. Sammicheli, M. Mainetti, T. Cataudella, A. Raimondi, G. Gonzalez-Aseguinolaza, U. Protzer, Z. M. Ruggeri, F. V. Chisari, M. Isogawa, G. Sitia, and M. Iannacone. 2015. 'Immunosurveillance of the liver by intravascular effector CD8(+) T cells', *Cell*, 161: 486-500.

Hao, R., J. He, X. Liu, G. Gao, D. Liu, L. Cui, G. Yu, W. Yu, Y. Chen, and D. Guo. 2015. 'Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatocyte nuclear factor 6', *J Virol*, 89: 4345-55.

Hayes, C. N., Y. Zhang, G. N. Makokha, M. Z. Hasan, M. D. Omokoko, and K. Chayama. 2016. 'Early events in hepatitis B virus infection: From the cell surface to the nucleus', *J Gastroenterol Hepatol*, 31: 302-9.

Hertoghs, K. M., P. D. Moerland, A. van Stijn, E. B. Remmerswaal, S. L. Yong, P. J. van de Berg, S. M. van Ham, F. Baas, I. J. ten Berge, and R. A. van Lier. 2010. 'Molecular profiling of cytomegalovirus-induced human CD8+ T cell differentiation', *J Clin Invest*, 120: 4077-90.

Hoffmann, J., C. Boehm, K. Himmelsbach, C. Donnerhak, H. Roettger, T. S. Weiss, D. Ploen, and E. Hildt. 2013. 'Identification of alpha-taxilin as an essential factor for the life cycle of hepatitis B virus', *J Hepatol*, 59: 934-41.

Honda, M., L. H. Ping, R. C. Rijnbrand, E. Amphlett, B. Clarke, D. Rowlands, and S. M. Lemon. 1996. 'Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA', *Virology*, 222: 31-42.

Huan, B., M. J. Kosovsky, and A. Siddiqui. 1995. 'Retinoid X receptor alpha transactivates the hepatitis B virus enhancer 1 element by forming a heterodimeric complex with the peroxisome proliferator-activated receptor', *J Virol*, 69: 547-51.

Huang, H., F. Sun, D. M. Owen, W. Li, Y. Chen, M. Gale, Jr., and J. Ye. 2007. 'Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 5848-53.

Huang, Y., J. C. Cohen, and H. H. Hobbs. 2011. 'Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease', *J Biol Chem*, 286: 37085-93.

Humar, A., D. Snydman, and A. S. T. Infectious Diseases Community of Practice. 2009. 'Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients', *Am J Transplant*, 9 Suppl 4: S78-86.

Chang, K. S., J. Jiang, Z. Cai, and G. Luo. 2007. 'Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture', *J Virol*, 81: 13783-93.

Chisari, F. V., and C. Ferrari. 1995. 'Hepatitis B virus immunopathogenesis', *Annu Rev Immunol*, 13: 29-60.

Chmelova, K., S. Frankova, M. Jirsa, M. Neroldova, E. Sticova, D. Merta, R. Senkerikova, P. Trunecka, J. Spicak, and J. Sperl. 2019. 'IL28B rs12979860 T allele protects against CMV disease in liver transplant recipients in the post-prophylaxis and late period', *Transpl Infect Dis*, 21: e13124.

Choi, H. J., A. Park, S. Kang, E. Lee, T. A. Lee, E. A. Ra, J. Lee, S. Lee, and B. Park. 2018. 'Human cytomegalovirus-encoded US9 targets MAVS and STING signaling to evade type I interferon immune responses', *Nat Commun*, 9: 125.

Choudhary, N. S., S. Saigal, R. K. Bansal, N. Saraf, D. Gautam, and A. S. Soin. 2017. 'Acute and Chronic Rejection After Liver Transplantation: What A Clinician Needs to Know', *J Clin Exp Hepatol*, 7: 358-66.

Inverso, D., and M. Iannacone. 2016. 'Spatiotemporal dynamics of effector CD8+ T cell responses within the liver', *J Leukoc Biol*, 99: 51-5.

Ishii, S., K. Iizuka, B. C. Miller, and K. Uyeda. 2004. 'Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 15597-602.

Jain, A., J. Reyes, R. Kashyap, S. F. Dodson, A. J. Demetris, K. Ruppert, K. Abu-Elmagd, W. Marsh, J. Madariaga, G. Mazariegos, D. Geller, C. A. Bonham, T. Gayowski, T. Cacciarelli, P. Fontes, T. E. Starzl, and J. J. Fung. 2000. 'Long-term survival after liver transplantation in 4,000 consecutive patients at a single center', *Ann Surg*, 232: 490-500.

Jaoude, G. A., and C. Sureau. 2005. 'Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus', *J Virol*, 79: 10460-6.

Jean Beltran, P. M., and I. M. Cristea. 2014. 'The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics', *Expert Rev Proteomics*, 11: 697-711.

Jiang, B., and E. Hildt. 2020. 'Intracellular Trafficking of HBV Particles', *Cells*, 9.

Kalejta, R. F. 2008. 'Tegument proteins of human cytomegalovirus', *Microbiol Mol Biol Rev*, 72: 249-65, table of contents.

Katze, M. G., Y. He, and M. Gale, Jr. 2002. 'Viruses and interferon: a fight for supremacy', *Nat Rev Immunol*, 2: 675-87.

Kennedy, P. T. F., E. Sandalova, J. Jo, U. Gill, I. Ushiro-Lumb, A. T. Tan, S. Naik, G. R. Foster, and A. Bertoletti. 2012. 'Preserved T-cell function in children and young adults with immune-tolerant chronic hepatitis B', *Gastroenterology*, 143: 637-45.

Kenneson, A., and M. J. Cannon. 2007. 'Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection', *Rev Med Virol*, 17: 253-76.

Kobashigawa, J., D. Dadhania, S. Bhorade, D. Adey, J. Berger, G. Bhat, M. Budev, A. Duarte-Rojo, M. Dunn, S. Hall, M. N. Harhay, K. L. Johansen, S. Joseph, C. C. Kennedy, E. Kransdorf, K. L. Lentine, R. J. Lynch, M. McAdams-DeMarco, S. Nagai, M. Olymbios, J. Patel, S. Pinney, J. Schaenman, D. L. Segev, P. Shah, L. G. Singer, J. P. Singer, C. Sonnenday, P. Tandon, E. Tapper, S. G. Tullius, M. Wilson, M. Zamora, and J. C. Lai. 2019. 'Report from the American Society of Transplantation on frailty in solid organ transplantation', *Am J Transplant*, 19: 984-94.

Koeberlein, B., A. zur Hausen, N. Bektas, H. Zentgraf, R. Chin, L. T. Nguyen, R. Kandolf, J. Torresi, and C. T. Bock. 2010. 'Hepatitis B virus overexpresses suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) thereby contributing to severity of inflammation in the liver', *Virus Res*, 148: 51-9.

Kollmann, T. R., O. Levy, R. R. Montgomery, and S. Goriely. 2012. 'Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly', *Immunity*, 37: 771-83.

Koonin, E. V., M. Krupovic, and V. I. Agol. 2021. 'The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution?', *Microbiol Mol Biol Rev*, 85: e0005321.

Koppen-Rung, P., A. Dittmer, and E. Bogner. 2016. 'Intracellular Distribution of Capsid-Associated pUL77 of Human Cytomegalovirus and Interactions with Packaging Proteins and pUL93', *J Virol*, 90: 5876-85.

Kotenko, S. V., G. Gallagher, V. V. Baurin, A. Lewis-Antes, M. Shen, N. K. Shah, J. A. Langer, F. Sheikh, H. Dickensheets, and R. P. Donnelly. 2003. 'IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex', *Nat Immunol*, 4: 69-77.

Kramvis, A. 2014. 'Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus', *Intervirology*, 57: 141-50.

Krishnan, A., W. Zhou, S. F. Lacey, A. P. Limaye, D. J. Diamond, and C. La Rosa. 2010. 'Programmed death-1 receptor and interleukin-10 in liver transplant recipients at high risk for late cytomegalovirus disease', *Transpl Infect Dis*, 12: 363-70.

Kusne, S., and J. E. Blair. 2006. 'Viral and fungal infections after liver transplantation--part II', *Liver Transpl*, 12: 2-11.

La Rosa, C., and D. J. Diamond. 2012. 'The immune response to human CMV', *Future Virol*, 7: 279-93.

Le Seyec, J., P. Chouteau, I. Cannie, C. Guguen-Guillouzo, and P. Gripon. 1998. 'Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity', *J Virol*, 72: 5573-8.

Lefevre, M., D. J. Felmlee, M. Parnot, T. F. Baumert, and C. Schuster. 2014. 'Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E', *PLoS One*, 9: e95550.

Levy, O. 2007. 'Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates', *Nat Rev Immunol*, 7: 379-90.

Li, Y., T. Koshiba, A. Yoshizawa, Y. Yonekawa, K. Masuda, A. Ito, M. Ueda, T. Mori, H. Kawamoto, Y. Tanaka, S. Sakaguchi, N. Minato, K. J. Wood, and K. Tanaka. 2004. 'Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation', *Am J Transplant*, 4: 2118-25.

Limaye, A. P., R. Bakthavatsalam, H. W. Kim, S. E. Randolph, J. B. Halldorson, P. J. Healey, C. S. Kuhr, A. E. Levy, J. D. Perkins, J. D. Reyes, and M. Boeckh. 2006. 'Impact of cytomegalovirus in organ transplant recipients in the era of antiviral prophylaxis', *Transplantation*, 81: 1645-52.

Liu, Y. L., G. L. Patman, J. B. Leathart, A. C. Piguet, A. D. Burt, J. F. Dufour, C. P. Day, A. K. Daly, H. L. Reeves, and Q. M. Anstee. 2014. 'Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma', *J Hepatol*, 61: 75-81.

Lok, A. S., L. B. Seeff, T. R. Morgan, A. M. di Bisceglie, R. K. Sterling, T. M. Curto, G. T. Everson, K. L. Lindsay, W. M. Lee, H. L. Bonkovsky, J. L. Dienstag, M. G. Ghany, C. Morishima, Z. D. Goodman, and Halt- C. Trial Group. 2009. 'Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease', *Gastroenterology*, 136: 138-48.

Lucifora, J., S. Arzberger, D. Durantel, L. Belloni, M. Strubin, M. Levrero, F. Zoulim, O. Hantz, and U. Protzer. 2011. 'Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection', *J Hepatol*, 55: 996-1003.

Lukhele, S., G. M. Boukhaled, and D. G. Brooks. 2019. 'Type I interferon signaling, regulation and gene stimulation in chronic virus infection', *Semin Immunol*, 43: 101277.

Lunova, M., J. Kubovciak, B. Smolkova, M. Uzhytchak, K. Michalova, A. Dejneka, P. Strnad, O. Lunov, and M. Jirsa. 2021. 'Expression of Interferons Lambda 3 and 4 Induces Identical Response in Human Liver Cell Lines Depending Exclusively on Canonical Signaling', *Int J Mol Sci*, 22.

Luo, L., S. Chen, Q. Gong, N. Luo, Y. Lei, J. Guo, and S. He. 2013. 'Hepatitis B virus X protein modulates remodelling of minichromosomes related to hepatitis B virus replication in HepG2 cells', *Int J Mol Med*, 31: 197-204.

Lutgehetmann, M., T. Bornscheuer, T. Volz, L. Allweiss, J. H. Bockmann, J. M. Pollok, A. W. Lohse, J. Petersen, and M. Dandri. 2011. 'Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon-alpha in chimeric mice', *Gastroenterology*, 140: 2074-83, 83 e1-2.

Ma, Y., M. Anantpadma, J. M. Timpe, S. Shanmugam, S. M. Singh, S. M. Lemon, and M. Yi. 2011. 'Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins', *J Virol*, 85: 86-97.

Macagno, A., N. L. Bernasconi, F. Vanzetta, E. Dander, A. Sarasini, M. G. Revello, G. Gerna, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2010. 'Isolation of human monoclonal antibodies that

potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex', *J Virol*, 84: 1005-13.
Macovei, A., C. Petrareanu, C. Lazar, P. Florian, and N. Branza-Nichita. 2013. 'Regulation of hepatitis B virus infection by Rab5, Rab7, and the endolysosomal compartment', *J Virol*, 87: 6415-27.
Mahoney, F. J. 1999. 'Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection', *Clin Microbiol Rev*, 12: 351-66.
Maini, M. K., C. Boni, C. K. Lee, J. R. Larrubia, S. Reignat, G. S. Ogg, A. S. King, J. Herberg, R. Gilson, A. Alisa, R. Williams, D. Vergani, N. V. Naoumov, C. Ferrari, and A. Bertoletti. 2000. 'The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection', *J Exp Med*, 191: 1269-80.
Maini, M. K., and A. J. Gehring. 2016. 'The role of innate immunity in the immunopathology and treatment of HBV infection', *J Hepatol*, 64: S60-S70.
Mancusi, A., S. Piccinelli, A. Velardi, and A. Pierini. 2018. 'The Effect of TNF-alpha on Regulatory T Cell Function in Graft-versus-Host Disease', *Front Immunol*, 9: 356.
Manuel, O., A. Wojtowicz, S. Bibert, N. J. Mueller, C. van Delden, H. H. Hirsch, J. Steiger, M. Stern, A. Egli, C. Garzoni, I. Binet, M. Weisser, C. Berger, A. Cusini, P. Meylan, M. Pascual, P. Y. Bochud, and Study Swiss Transplant Cohort. 2015. 'Influence of IFNL3/4 polymorphisms on the incidence of cytomegalovirus infection after solid-organ transplantation', *J Infect Dis*, 211: 906-14.
Marti-Carreras, J., and P. Maes. 2019. 'Human cytomegalovirus genomics and transcriptomics through the lens of next-generation sequencing: revision and future challenges', *Virus Genes*, 55: 138-64.
Mathurin, P., C. Mouquet, T. Poynard, C. Sylla, H. Benalia, C. Fretz, V. Thibault, J. F. Cadranel, B. Bernard, P. Opolon, P. Coriat, and M. O. Bitker. 1999. 'Impact of hepatitis B and C virus on kidney transplantation outcome', *Hepatology*, 29: 257-63.
Mazewski, C., R. E. Perez, E. N. Fish, and L. C. Platanias. 2020. 'Type I Interferon (IFN)-Regulated Activation of Canonical and Non-Canonical Signaling Pathways', *Front Immunol*, 11: 606456.
Mazzaferro, V., J. M. Llovet, R. Miceli, S. Bhoori, M. Schiavo, L. Mariani, T. Camerini, S. Roayaie, M. E. Schwartz, G. L. Grazi, R. Adam, P. Neuhaus, M. Salizzoni, J. Bruix, A. Forner, L. De Carlis, U. Cillo, A. K. Burroughs, R. Troisi, M. Rossi, G. E. Gerunda, J. Lerut, J. Belghiti, I. Boin, J. Gugenheim, F. Rochling, B. Van Hoek, P. Majno, and Group Metroticket Investigator Study. 2009. 'Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis', *Lancet Oncol*, 10: 35-43.
Mazzaferro, V., E. Regalia, R. Doci, S. Andreola, A. Pulvirenti, F. Bozzetti, F. Montalto, M. Ammatuna, A. Morabito, and L. Gennari. 1996. 'Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis', *N Engl J Med*, 334: 693-9.
McClary, H., R. Koch, F. V. Chisari, and L. G. Guidotti. 2000. 'Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines', *J Virol*, 74: 2255-64.
McMahon, H. T., and E. Boucrot. 2011. 'Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12: 517-33.
Milich, D., and T. J. Liang. 2003. 'Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection', *Hepatology*, 38: 1075-86.
Milich, D. R. 2019. 'Is the function of the HBeAg really unknown?', *Hum Vaccin Immunother*, 15: 2187-91.
Miller, R. H., S. Kaneko, C. T. Chung, R. Girones, and R. H. Purcell. 1989. 'Compact organization of the hepatitis B virus genome', *Hepatology*, 9: 322-7.

Miller, R. H., and R. H. Purcell. 1990. 'Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 2057-61.

Mocarski, E.S., Shenk, T. and Pass, R.F. . 2013. *Cytomegalovirus.* (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2701-2772).

Mohamadkhani, A., E. Naderi, M. Sotoudeh, A. Katoonizadeh, G. Montazeri, and H. Poustchi. 2014. 'Clinical feature of intrahepatic B-lymphocytes in chronic hepatitis B', *Int J Inflam*, 2014: 896864.

Moradpour, D., F. Penin, and C. M. Rice. 2007. 'Replication of hepatitis C virus', *Nat Rev Microbiol*, 5: 453-63.

Moraes-Vieira, P. M., M. C. Takenaka, H. M. Silva, S. M. Monteiro, F. Agena, F. Lemos, D. Saitovitch, J. Kalil, and V. Coelho. 2012. 'GATA3 and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation', *Clin Immunol*, 142: 117-26.

Moriyama, T., S. Guilhot, K. Klopchin, B. Moss, C. A. Pinkert, R. D. Palmiter, R. L. Brinster, O. Kanagawa, and F. V. Chisari. 1990. 'Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice', *Science*, 248: 361-4.

Navarro, D. 2016. 'Expanding role of cytomegalovirus as a human pathogen', *J Med Virol*, 88: 1103-12.

Nemecek, V., J. Castkova, P. Fritz, A. Linhartova, E. Svandova, H. Sramova, and B. Kriz. 2003. 'The 2001 serological survey in the Czech Republic--viral hepatitis', *Cent Eur J Public Health*, 11 Suppl: S54-61.

Newell, K. A., A. Asare, A. D. Kirk, T. D. Gisler, K. Bourcier, M. Suthanthiran, W. J. Burlingham, W. H. Marks, I. Sanz, R. I. Lechler, M. P. Hernandez-Fuentes, L. A. Turka, V. L. Seyfert-Margolis, and S. T. Study Group Immune Tolerance Network. 2010. 'Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans', *J Clin Invest*, 120: 1836-47.

Noureddin, M., Y. Rotman, F. Zhang, H. Park, B. Rehermann, E. Thomas, and T. J. Liang. 2015. 'Hepatic expression levels of interferons and interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C: A phenotype-genotype correlation study', *Genes Immun*, 16: 321-9.

Oldstone MBA, Whitton JL. . 2001. *Fields virology.*

Oliveira-Nascimento, L., P. Massari, and L. M. Wetzler. 2012. 'The Role of TLR2 in Infection and Immunity', *Front Immunol*, 3: 79.

Ori, A., and Y. Shaul. 1995. 'Hepatitis B virus enhancer binds and is activated by the Hepatocyte nuclear factor 3', *Virology*, 207: 98-106.

Orzalli, M. H., and D. M. Knipe. 2014. 'Cellular sensing of viral DNA and viral evasion mechanisms', *Annu Rev Microbiol*, 68: 477-92.

Patient, R., C. Hourioux, and P. Roingeard. 2009. 'Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles', *Cell Microbiol*, 11: 1561-70.

Patient, R., C. Hourioux, P. Y. Sizaret, S. Trassard, C. Sureau, and P. Roingeard. 2007. 'Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking', *J Virol*, 81: 3842-51.

Paya, C., A. Humar, E. Dominguez, K. Washburn, E. Blumberg, B. Alexander, R. Freeman, N. Heaton, M. D. Pescovitz, and Group Valganciclovir Solid Organ Transplant Study. 2004. 'Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients', *Am J Transplant*, 4: 611-20.

Pedrana, A., S. Munari, M. Stoove, J. Doyle, and M. Hellard. 2021. 'The phases of hepatitis C elimination: achieving WHO elimination targets', *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 6: 6-8.

Perez-Sanz, F., B. Revilla-Nuin, L. Martinez-Alarcon, J. I. Herrero, P. Ramirez, J. A. Pons, and A. Baroja-Mazo. 2019. 'Tolerance Biomarkers in Liver Transplantation: Independent

External Validation of the Predictive Strength of SENP6 and FEM1C Gene Expression', *Transplantation*, 103: 1887-92.

Picarda, G., and C. A. Benedict. 2018. 'Cytomegalovirus: Shape-Shifting the Immune System', *J Immunol*, 200: 3881-89.

Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A. J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani. 1998. 'Binding of hepatitis C virus to CD81', *Science*, 282: 938-41.

Pley, C., J. Lourenco, A. L. McNaughton, and P. C. Matthews. 2022. 'Spacer Domain in Hepatitis B Virus Polymerase: Plugging a Hole or Performing a Role?', *J Virol*, 96: e0005122.

Ploss, A., M. J. Evans, V. A. Gaysinskaya, M. Panis, H. You, Y. P. de Jong, and C. M. Rice. 2009. 'Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells', *Nature*, 457: 882-6.

Polaris Observatory, H. C. V. Collaborators. 2022. 'Global change in hepatitis C virus prevalence and cascade of care between 2015 and 2020: a modelling study', *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 7: 396-415.

Prange, R., and R. E. Streeck. 1995. 'Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins', *EMBO J*, 14: 247-56.

Prokunina-Olsson, L., B. Muchmore, W. Tang, R. M. Pfeiffer, H. Park, H. Dickensheets, D. Hergott, P. Porter-Gill, A. Mumy, I. Kohaar, S. Chen, N. Brand, M. Tarway, L. Liu, F. Sheikh, J. Astemborski, H. L. Bonkovsky, B. R. Edlin, C. D. Howell, T. R. Morgan, D. L. Thomas, B. Rehermann, R. P. Donnelly, and T. R. O'Brien. 2013. 'A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus', *Nat Genet*, 45: 164-71.

Rabe, B., A. Vlachou, N. Pante, A. Helenius, and M. Kann. 2003. 'Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 9849-54.

Radziwill, G., W. Tucker, and H. Schaller. 1990. 'Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity', *J Virol*, 64: 613-20.

Rall, L. B., D. N. Standring, O. Laub, and W. J. Rutter. 1983. 'Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II', *Mol Cell Biol*, 3: 1766-73.

Rawlinson, W. D., S. B. Boppana, K. B. Fowler, D. W. Kimberlin, T. Lazzarotto, S. Alain, K. Daly, S. Doutre, L. Gibson, M. L. Giles, J. Greenlee, S. T. Hamilton, G. J. Harrison, L. Hui, C. A. Jones, P. Palasanthiran, M. R. Schleiss, A. W. Shand, and W. J. van Zuylen. 2017. 'Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy', *Lancet Infect Dis*, 17: e177-e88.

Razonable, R. R. 2005. 'Epidemiology of cytomegalovirus disease in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients', *Am J Health Syst Pharm*, 62: S7-13.

Ren, J. H., J. L. Hu, S. T. Cheng, H. B. Yu, V. K. W. Wong, B. Y. K. Law, Y. F. Yang, Y. Huang, Y. Liu, W. X. Chen, X. F. Cai, H. Tang, Y. Hu, W. L. Zhang, X. Liu, Q. X. Long, L. Zhou, N. N. Tao, H. Z. Zhou, Q. X. Yang, F. Ren, L. He, R. Gong, A. L. Huang, and J. Chen. 2018. 'SIRT3 restricts hepatitis B virus transcription and replication through epigenetic regulation of covalently closed circular DNA involving suppressor of variegation 3-9 homolog 1 and SET domain containing 1A histone methyltransferases', *Hepatology*, 68: 1260-76.

Rock, K. L., and A. L. Goldberg. 1999. 'Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides', *Annu Rev Immunol*, 17: 739-79.

Roche, P. A., and K. Furuta. 2015. 'The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation', *Nat Rev Immunol*, 15: 203-16.

Romagnani, C., M. Della Chiesa, S. Kohler, B. Moewes, A. Radbruch, L. Moretta, A. Moretta, and A. Thiel. 2005. 'Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells', *Eur J Immunol*, 35: 2452-8.

Romeo, S., J. Kozlitina, C. Xing, A. Pertsemlidis, D. Cox, L. A. Pennacchio, E. Boerwinkle, J. C. Cohen, and H. H. Hobbs. 2008. 'Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease', *Nat Genet*, 40: 1461-5.

Saleiro, D., and L. C. Platanias. 2019. 'Interferon signaling in cancer. Non-canonical pathways and control of intracellular immune checkpoints', *Semin Immunol*, 43: 101299.

Sato, S., K. Li, T. Kameyama, T. Hayashi, Y. Ishida, S. Murakami, T. Watanabe, S. Iijima, Y. Sakurai, K. Watashi, S. Tsutsumi, Y. Sato, H. Akita, T. Wakita, C. M. Rice, H. Harashima, M. Kohara, Y. Tanaka, and A. Takaoka. 2015. 'The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus', *Immunity*, 42: 123-32.

Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R. M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese, and A. Vitelli. 2002. 'The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus', *EMBO J*, 21: 5017-25.

Senkerikova, R., S. Frankova, M. Jirsa, M. Kreidlova, D. Merta, M. Neroldova, K. Chmelova, J. Spicak, and J. Sperl. 2019. 'PNPLA3 rs738409 G allele carriers with genotype 1b HCV cirrhosis have lower viral load but develop liver failure at younger age', *PLoS One*, 14: e0222609.

Senkerikova, R., S. Frankova, J. Sperl, M. Oliverius, E. Kieslichova, H. Filipova, D. Kautznerova, E. Honsova, P. Trunecka, and J. Spicak. 2014. 'Incidental hepatocellular carcinoma: risk factors and long-term outcome after liver transplantation', *Transplant Proc*, 46: 1426-9.

Sester, M., U. Sester, B. Gartner, G. Heine, M. Girndt, N. Mueller-Lantzsch, A. Meyerhans, and H. Kohler. 2001. 'Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation', *Transplantation*, 71: 1287-94.

Shimomura, I., Y. Bashmakov, and J. D. Horton. 1999. 'Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus', *J Biol Chem*, 274: 30028-32.

Schulze, A., P. Gripon, and S. Urban. 2007. 'Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans', *Hepatology*, 46: 1759-68.

Schurich, A., P. Khanna, A. R. Lopes, K. J. Han, D. Peppa, L. Micco, G. Nebbia, P. T. Kennedy, A. M. Geretti, G. Dusheiko, and M. K. Maini. 2011. 'Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-Prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection', *Hepatology*, 53: 1494-503.

Sinzger, C., M. Digel, and G. Jahn. 2008. 'Cytomegalovirus cell tropism', *Curr Top Microbiol Immunol*, 325: 63-83.

Speliotes, E. K., J. L. Butler, C. D. Palmer, B. F. Voight, Giant Consortium, M. IGen Consortium, C. R. N. Nash, and J. N. Hirschhorn. 2010. 'PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease', *Hepatology*, 52: 904-12.

Sperl, J., S. Frankova, J. Spicak, and O. Viklicky. 2013. 'Further evidence of the benefits associated with antiviral treatment in kidney allograft recipients with chronic hepatitis B virus infection', *J Hepatol*, 58: 833-5.

Stahl, M., J. Beck, and M. Nassal. 2007. 'Chaperones activate hepadnavirus reverse transcriptase by transiently exposing a C-proximal region in the terminal protein domain that contributes to epsilon RNA binding', *J Virol*, 81: 13354-64.

Statista. 2022. 'Estimated number of organ transplantations worldwide in 2020'. https://www.statista.com/statistics/398645/global-estimation-of-organ-transplantations/.

Stolp, J., L. A. Turka, and K. J. Wood. 2014. 'B cells with immune-regulating function in transplantation', *Nat Rev Nephrol*, 10: 389-97.

Strnad, P., S. Buch, K. Hamesch, J. Fischer, J. Rosendahl, R. Schmelz, S. Brueckner, M. Brosch, C. V. Heimes, V. Woditsch, D. Scholten, H. D. Nischalke, S. Janciauskiene, M. Mandorfer, M. Trauner, M. J. Way, A. McQuillin, M. C. Reichert, M. Krawczyk, M. Casper, F. Lammert, F. Braun, W. von Schonfels, S. Hinz, G. Burmeister, C. Hellerbrand, A. Teufel, A. Feldman, J. M. Schattenberg, H. Bantel, A. Pathil, M. Demir, J. Kluwe, T. Boettler, M. Ridinger, N. Wodarz, M. Soyka, M. Rietschel, F. Kiefer, T. Weber, S. Marhenke, A. Vogel, H. Hinrichsen, A. Canbay, M. Schlattjan, K. Sosnowsky, C. Sarrazin, J. von Felden, A. Geier, P. Deltenre, B. Sipos, C. Schafmayer, M. Nothnagel, E. Aigner, C. Datz, F. Stickel, M. Y. Morgan, J. Hampe, T. Berg, and C. Trautwein. 2019. 'Heterozygous carriage of the alpha1-antitrypsin Pi*Z variant increases the risk to develop liver cirrhosis', *Gut*, 68: 1099-107.

Sung, P. S., S. H. Hong, J. H. Chung, S. Kim, S. H. Park, H. M. Kim, S. K. Yoon, and E. C. Shin. 2017. 'IFN-lambda4 potently blocks IFN-alpha signalling by ISG15 and USP18 in hepatitis C virus infection', *Sci Rep*, 7: 3821.

Suppiah, V., M. Moldovan, G. Ahlenstiel, T. Berg, M. Weltman, M. L. Abate, M. Bassendine, U. Spengler, G. J. Dore, E. Powell, S. Riordan, D. Sheridan, A. Smedile, V. Fragomeli, T. Muller, M. Bahlo, G. J. Stewart, D. R. Booth, and J. George. 2009. 'IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy', *Nat Genet*, 41: 1100-4.

Sylwester, A. W., B. L. Mitchell, J. B. Edgar, C. Taormina, C. Pelte, F. Ruchti, P. R. Sleath, K. H. Grabstein, N. A. Hosken, F. Kern, J. A. Nelson, and L. J. Picker. 2005. 'Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects', *J Exp Med*, 202: 673-85.

Terczynska-Dyla, E., S. Bibert, F. H. Duong, I. Krol, S. Jorgensen, E. Collinet, Z. Kutalik, V. Aubert, A. Cerny, L. Kaiser, R. Malinverni, A. Mangia, D. Moradpour, B. Mullhaupt, F. Negro, R. Santoro, D. Semela, N. Semmo, C. Cohort Study Group Swiss Hepatitis, M. H. Heim, P. Y. Bochud, and R. Hartmann. 2014. 'Reduced IFNlambda4 activity is associated with improved HCV clearance and reduced expression of interferon-stimulated genes', *Nat Commun*, 5: 5699.

Thompson, A. J., and S. A. Locarnini. 2007. 'Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response', *Immunol Cell Biol*, 85: 435-45.

Thurner, C., C. Witwer, I. L. Hofacker, and P. F. Stadler. 2004. 'Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes', *J Gen Virol*, 85: 1113-24.

Trepo, E., E. Guyot, N. Ganne-Carrie, D. Degre, T. Gustot, D. Franchimont, A. Sutton, P. Nahon, and C. Moreno. 2012. 'PNPLA3 (rs738409 C>G) is a common risk variant associated with hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis', *Hepatology*, 55: 1307-8.

Trepo, E., S. Romeo, J. Zucman-Rossi, and P. Nahon. 2016. 'PNPLA3 gene in liver diseases', *J Hepatol*, 65: 399-412.

Trunecka, P., I. Mikova, D. Dlouha, J. A. Hubacek, E. Honsova, L. Kolesar, V. Lanska, S. Frankova, J. Sperl, M. Jirsa, and R. Poledne. 2018. 'Donor PNPLA3 rs738409 genotype is a risk factor for graft steatosis. A post-transplant biopsy-based study', *Dig Liver Dis*, 50: 490-95.

Tsukuda, S., and K. Watashi. 2020. 'Hepatitis B virus biology and life cycle', *Antiviral Res*, 182: 104925.

Uchida, T., K. Takahashi, K. Tatsuno, U. Dhingra, and J. F. Eliason. 1996. 'Inhibition of hepatitis-B-virus core promoter by p53: implications for carcinogenesis in hepatocytes', *Int J Cancer*, 67: 892-7.

Unterholzner, L., S. E. Keating, M. Baran, K. A. Horan, S. B. Jensen, S. Sharma, C. M. Sirois, T. Jin, E. Latz, T. S. Xiao, K. A. Fitzgerald, S. R. Paludan, and A. G. Bowie. 2010. 'IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA', *Nat Immunol*, 11: 997-1004.

Urban, S., R. Bartenschlager, R. Kubitz, and F. Zoulim. 2014. 'Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes', *Gastroenterology*, 147: 48-64.

van de Berg, P. J., A. van Stijn, I. J. Ten Berge, and R. A. van Lier. 2008. 'A fingerprint left by cytomegalovirus infection in the human T cell compartment', *J Clin Virol*, 41: 213-7.
van Leeuwen, E. M., I. J. ten Berge, and R. A. van Lier. 2007. 'Induction and maintenance of CD8+ T cells specific for persistent viruses', *Adv Exp Med Biol*, 590: 121-37.
VanBuskirk, A. M., W. J. Burlingham, E. Jankowska-Gan, T. Chin, S. Kusaka, F. Geissler, R. P. Pelletier, and C. G. Orosz. 2000. 'Human allograft acceptance is associated with immune regulation', *J Clin Invest*, 106: 145-55.
Vieyres, G., J. Dubuisson, and T. Pietschmann. 2014. 'Incorporation of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion', *Viruses*, 6: 1149-87.
Wang, Y., N. Kory, S. BasuRay, J. C. Cohen, and H. H. Hobbs. 2019. 'PNPLA3, CGI-58, and Inhibition of Hepatic Triglyceride Hydrolysis in Mice', *Hepatology*, 69: 2427-41.
Wang, Y. Q., and X. Y. Zhao. 2020. 'Human Cytomegalovirus Primary Infection and Reactivation: Insights From Virion-Carried Molecules', *Front Microbiol*, 11: 1511.
Wang, Z., W. Zhou, T. Srivastava, C. La Rosa, A. Mandarino, S. J. Forman, J. A. Zaia, W. J. Britt, and D. J. Diamond. 2008. 'A fusion protein of HCMV IE1 exon4 and IE2 exon5 stimulates potent cellular immunity in an MVA vaccine vector', *Virology*, 377: 379-90.
Webster, G. J., S. Reignat, M. K. Maini, S. A. Whalley, G. S. Ogg, A. King, D. Brown, P. L. Amlot, R. Williams, D. Vergani, G. M. Dusheiko, and A. Bertoletti. 2000. 'Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms', *Hepatology*, 32: 1117-24.
Werner, J. M., A. Abdalla, N. Gara, M. G. Ghany, and B. Rehermann. 2013. 'The hepatitis B vaccine protects re-exposed health care workers, but does not provide sterilizing immunity', *Gastroenterology*, 145: 1026-34.
Wherry, E. J., S. J. Ha, S. M. Kaech, W. N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J. N. Blattman, D. L. Barber, and R. Ahmed. 2007. 'Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection', *Immunity*, 27: 670-84.
WHO. 'Hepatitis B'. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b.
Wong, R. J., R. Cheung, and A. Ahmed. 2014. 'Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S', *Hepatology*, 59: 2188-95.
Xing, S., and L. Ferrari de Andrade. 2020. 'NKG2D and MICA/B shedding: a 'tag game' between NK cells and malignant cells', *Clin Transl Immunology*, 9: e1230.
Xing, T., J. Zhu, J. Xian, A. Li, X. Wang, W. Wang, and Q. Zhang. 2019. 'miRNA-548ah promotes the replication and expression of hepatitis B virus by targeting histone deacetylase 4', *Life Sci*, 219: 199-208.
Yan, H., G. Zhong, G. Xu, W. He, Z. Jing, Z. Gao, Y. Huang, Y. Qi, B. Peng, H. Wang, L. Fu, M. Song, P. Chen, W. Gao, B. Ren, Y. Sun, T. Cai, X. Feng, J. Sui, and W. Li. 2012. 'Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus', *Elife*, 1: e00049.
Yang, P. L., A. Althage, J. Chung, H. Maier, S. Wieland, M. Isogawa, and F. V. Chisari. 2010. 'Immune effectors required for hepatitis B virus clearance', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 798-802.
Yoshizawa, A., A. Ito, Y. Li, T. Koshiba, S. Sakaguchi, K. J. Wood, and K. Tanaka. 2005. 'The roles of CD25+CD4+ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation', *Transplant Proc*, 37: 37-9.
Yu, X., J. Jih, J. Jiang, and Z. H. Zhou. 2017. 'Atomic structure of the human cytomegalovirus capsid with its securing tegument layer of pp150', *Science*, 356.
Zarrouk, K., J. Piret, and G. Boivin. 2017. 'Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors', *Virus Res*, 234: 177-92.
Zhang, T. Y., Q. Yuan, J. H. Zhao, Y. L. Zhang, L. Z. Yuan, Y. Lan, Y. C. Lo, C. P. Sun, C. R. Wu, J. F. Zhang, Y. Zhang, J. L. Cao, X. R. Guo, X. Liu, X. B. Mo, W. X. Luo, T. Cheng, Y. X. Chen, M. H. Tao, J. W. Shih, Q. J. Zhao, J. Zhang, P. J. Chen, Y. A. Yuan, and N. S. Xia. 2016.

'Prolonged suppression of HBV in mice by a novel antibody that targets a unique epitope on hepatitis B surface antigen', *Gut*, 65: 658-71.

Zhang, Y., Z. Gao, S. Wang, J. Liu, N. Paul, T. He, C. Liu, H. Zhang, Y. Lv, R. Cao, W. Mao, J. Wan, H. Ma, M. Huang, Y. Liu, J. Wang, P. Liao, P. Zeng, M. He, and H. Shan. 2020. 'Hepatitis C virus genotype/subtype distribution and evolution among Chinese blood donors: Revealing recent viral expansion', *PLoS One*, 15: e0235612.

Zoulim, F., J. Saputelli, and C. Seeger. 1994. 'Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo', *J Virol*, 68: 2026-30.