

**Univerzita Karlova  
1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA  
1. lékařská fakulta**

**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**

MUD. Klára Chmelová

Praha 2022

## **Doktorské studijní programy v biomedicíně**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

**Obor:** Biochemie a patobiochemie

**Předseda oborové rady:** prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

**Školící pracoviště:** Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM)  
Klinika hepatogastroenterologie a Laboratoř experimentální  
hepatologie, Praha, Česká republika

**Školitel:** doc. MUDr Jan Šperl, CSc.,  
IKEM, Klinika hepatogastroenterologie, Praha, Česká  
republika

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah	
Souhrn .....	4
Abstract .....	5
1 Úvod.....	6
1.1 Cytomegalovirus.....	6
Taxonomie, struktura a replikace CMV viru .....	6
Imunita proti CMV .....	6
1.2 Virus hepatitidy B.....	6
Taxonomie, struktura a replikace viru HBV .....	6
1. Imunita proti HBV .....	7
Operační tolerance a imunotolerance .....	7
1.3 Virus hepatitidy C.....	7
Taxonomie, struktura a replikace viru.....	7
HCC a přežití po transplantaci .....	8
HCC a <i>PNPLA3</i> .....	8
2 Cíle práce.....	8
3 Metody .....	8
3.1 Stanovení replikace CMV .....	8
3.2 Stanovení HCV RNA a genotypu HCV .....	8
3.3 Genotypizace <i>IL28B</i> a <i>PNPLA3</i> .....	8
3.4 Genové exprese.....	9
3.5 Statistická analýza .....	9
4 Výsledky a komentáře .....	9
4.1 Alela T v rs12979860 v genu <i>IL28B</i> chrání před pozdním nástupem CMV nemoci u pacientů po transplantaci jater.....	9
4.2 Nosiči alely G varianty rs738409 <i>PNPLA3</i> u pacientů s cirhózou C a genotypem viru 1b mají nižší virémii HCV a selhání jater v nižším věku.....	11
4.3 Exprese transkriptů asociovaných s operační tolerancí u pacientů s HBV po transplantaci ledviny (dosud nepublikovaná data).....	13
5 Obecná diskuze .....	14
6 Souhrn výsledků.....	16
7 Seznam použité literatury .....	16
8 Seznam vybraných publikací .....	20

## 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, některá díky imunoaktivaci mohou způsobovat rejekci štěpu, jiná naopak mohou být naopak asociována s imunitou. 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 genotypů 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- $\alpha$* , 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- $\alpha$*  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). Vliv na potransplantační průběh má však řada faktorů, včetně virových onemocnění. Průběh před i po SOT je do značné míry ovlivněn také nosičstvím variant některých genů. Mezi nejvýznamnější v hepatologii patří varianty rs12979860 (C/T) genu *IL28B* a rs738409 (G/C) genu *PNPLA3* (Ge et al. 2009).

### 1.1 Cytomegalovirus

Infekce lidským CMV představuje nejčastější oportunní virovou infekci po SOT.

#### Taxonomie, struktura a replikace CMV viru

Lidský CMV je ubikviterní herpesvirus, který má schopnost perzistovat v organismu v latentní formě. Patří do čeledi *Herpesviridae*, maturovaný virion sestává z jedné kopie dsDNA a jeho nukleokapsidy, amorfni hmoty zvané tegument a obalu viru. Genom obsahuje více než 165 známých genů (Yu et al. 2017). Nejznámějším proteinem tegumentu je pp65, který je důležitým cílem humorální i buněčné imunity a zprostředkovává fosforylaci virových proteinů ze skupiny bezprostředních časných. V minulosti byl široce využíván k diagnostice CMV infekce. Genom je tvořen třemi skupinami genů, které jsou označeny jako bezprostřední časné (IE), časné (E) a pozdní (L). Mechanismus navození latentní fáze infekce nebyl doposud spolehlivě popsán. V této fázi se virová DNA replikuje společně s hostitelskou DNA (Goodrum 2016).

#### Imunita proti CMV

Po vstupu viru do buňky dojde hostitelskou buňkou k rozpoznání virionu a aktivaci několika mechanismů a buněčných drah vrozené imunitní odpovědi (Navarro 2016).

Většina imunopresivních režimů je založena především na oblenění T-buňkami zprostředkované odpovědi ve snaze zabránit rejekci štěpu. V případě snížení počtu CD4+ T buněk může dojít k nekontrolované replikaci, jejímž následkem může být až život ohrožující orgánové poškození (Sester et al. 2001). Do popředí se tak do značné míry může dostávat imunita vrozená. IFN-I zajišťují intracelulární obranu cestou svých receptorů IFNAR1/2, které jsou asociované s tyrosinkinázou TYK2 a Janusovou kinázou JAK1. Dále se aktivují 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 interferonem stimulovaných genů (ISG) (Mazewski et al. 2020; Lukhele, Boukhaled, and Brooks 2019). Tato JAK/STAT dependentní dráha je označovaná tradičně jako kanonická.

SNP rs12979860 byl popsán v nekódující oblasti v blízkosti genu *IFNL3* v souvislosti s vyšší spontánní eliminací viru či úspěšnější léčbou pegylovaným interferonem  $\alpha$  a ribavirinem (Ge et al. 2009; Suppiah et al. 2009). Přítomnost alely T v SNP rs12979860 je spojena s vyšší bazální expresí ISG, ale při stimulaci exogenním IFN- $\alpha$  již nedochází k dalšímu zvýšení (Noureddin et al. 2015; Terczynska-Dyla et al. 2014).

### 1.2 Virus hepatitidy B

Virus hepatitidy B byl objevený v roce 1965 (Blumberg, Alter, and Visnich 1965). Je jím celosvětově infikováno asi 290 milionů osob (HBsAg pozitivních). Virus sám o sobě není cytopatogenní, infekce HBV je proces dynamický a odráží interakci mezi replikací viru a imunitní odpovědí hostitele.

#### Taxonomie, struktura a replikace viru HBV

Virus hepatitidy B náleží do čeledi *Hepadnaviridae*. Má 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. Dále obsahuje RNA dependentní DNA polymerázu (reverzní transkriptázu), k replikaci s využívá templát pgRNA.

Kompletní virion, neboli Daneova částice, je tvořena lipidovým obalem, na jehož povrchu se nachází HBsAg, a který uvnitř obsahuje ikosahedrální nukleokapsidu složenou z Hbc proteinů.

Virová DNA má velikost 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. *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). ORF *P* kóduje virovou polymerázu, ORF *X* kóduje tzv. HBx protein, malý 16,5 kDa protein, který zajišťuje signální transdukcii, aktivaci transkripce, opravu DNA a inhibuje degradaci proteinů (Zoulim, Saputelli, and Seeger 1994; Lucifora et al. 2011). Všechny 4 ORF se nacházejí na kompletním (-) DNA vlákně. Virion interaguje s heparansulfátovými proteoglykany (zejména glypican 5) na povrchu hepatocytů, poté se posouvá ke specifitějšímu 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). Virus vstupuje do hepatocytu clathrinem mediovanou endocytózou. Po transportu virové DNA do jádra se odštěpí virová polymeráza a pomocí hostitelského reparačního mechanismu se nukleová kyselina opraví na kompletní dva řetězce a uzavře se do velmi stabilní cccDNA, která následně slouží jako templát k transkripci virové RNA.

### **Imunita proti HBV**

V obvyklých případech virová infekce aktivuje vrozenou imunitu pomocí PRR receptorů. Ty rozpoznávají specifické struktury patogenů, tzv. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Smyslem aktivace PRR je zapojení adaptorových proteinů (TRIF, MyD88) a následná exprese protivirových cytokinů, především cestou IFN-I (IFN- $\alpha/\beta$ ) a aktivace NK buněk. Zdrojem INF-I jsou především samotné napadené buňky a pDC, zatímco INF-II (tedy IFN- $\gamma$ ) jsou produkovány NK a NKT buňkami (Busca and Kumar 2014; Thompson and Locarnini 2007; Katze, He, and Gale 2002).

V případě HBV je indukce inflamatorních cytokinů 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.

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 epitopů exprimovaných na povrchu buněk spolu s molekulami HLA I. nebo II. třídy (Oldstone MBA 2001). HBV specifické T-lymfocyty zůstávají hlavním efektoem eliminace viru a jaterního zánětu. Účinek CD8+ T-buňky 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).

### **Operační tolerance a imunotolerance**

Operační tolerance (OT) je poměrně raritní stav, kdy imunita příjemce akceptuje allogenní štěp i po vysazení imunosupresivní medikace. Nejdůležitější roli mají T-lymfocyty, které se označují jako regulační (Tregs)(Yoshizawa et al. 2005). Významným regulátorem diferenciací Tregs je FOXP3 (forkhead box P3), ztráta jeho funkce vede k závažným život ohrožujícím imunitním dysregulacím (Li et al. 2004). Mechanismus suprese je zajištěn pomocí IL-10 a TGF- $\beta$ .

Paradoxně podobný pojem, tedy imunotolerance, je historicky dobře známý jako jedna z fází hepatitidy B. Jedná se o fázi pozorovanou především u osob, které akvírovaly HBV perinatálně či v dětském nebo mladém věku a trvala zpravidla desítky let.

### **1.3 Virus hepatitidy C**

Celosvětově je virem hepatitidy C (HCV) infikováno asi 71 milionů jedinců (Polaris Observatory 2022). 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). Úspěšná léčba znamená kompletní eradikaci viru z organismu a je definovaná jako negativní virémie 12 či 24 týdnů po ukončení léčby (setrvalá virologická odpověď, SVR).

### **Taxonomie, struktura a replikace viru**

Virus hepatitidy C patří do čeledi *Flaviviridae* a rodu *hepacivirus*. Samotný HCV má značně variabilní genom, vytváří 7 genotypů (1–7). HCV je malý obalený virus (55–65 nm v průměru) obsahující jedno pozitivní RNA vlákno (Catanese et al. 2013). Obal viru je tvořen lipidovou dvouvrstvou spolu s

některými apo-lipoproteiny a estery cholesterolu, které představují téměř polovinu všech lipidů virového obalu (Andre et al. 2002; Chang et al. 2007). Povrchové glykoproteiny zajišťují interakci s hostitelskými receptorovými komplexy a fúzi virového obalu s endozomálními membránami napadených buněk. V krevním řečišti virus cirkuluje ve vazbě na lipoproteiny s nízkou (LDL) či velmi nízkou denzitou (VLDL), dále ve vazbě na imunoglobuliny či samostatně. HCV vstupuje do buněk pomocí klathrinem zprostředkované endocytózy. Genom HCV je pak uvolněn do cytozolu, kde dochází k translaci a vzniku polyproteinu (Moradpour, Penin, and Rice 2007).

### **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 nejvýznamnějším rizikovým faktorem rozvoje HCC. Pokud je HCC zachycen v časném stadiu a je možné chirurgické řešení (resekce či transplantace jater), jsou výsledky přežití velmi dobré.

### **HCC a *PNPLA3***

Varianta rs738409 C>G (I148M) v genu fosfolipázy *PNPLA3* (patatin-like phosphatase domain-containing protein 3) byla poprvé popsána 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. Protein *PNPLA3* je intracelulárně lokalizován na membránách lipidových kapének. Proti původní domněnce, že I148M substituce vede ke snížení fosfolipázové aktivity o 80 %, existují nyní důkazy o zcela odlišném mechanismu vzniku steatózy, který nikterak nesouvisí s enzymovou aktivitou *PNPLA3* (Huang, Cohen, and Hobbs 2011). 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 sekvstruje CGI-58 a znemožňuje jeho dostupnost pro ATGL jako kofaktoru nezbytného k hydrolýze triacylglycerolů (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<sup>®</sup> CMV RG PCR (Quiagen, GmbH, Hilden, SRN). Organové postižení bylo potvrzeno histologicky v barvení hematoxylinem-eosinem nebo imunohistochemicky. .

### **3.2 Stanovení HCV RNA a genotypu HCV**

HCV RNA byla hodnocena ze vzorků odebraných 24 hodin před transplantací jater pomocí Roche COBAS<sup>®</sup> AmpliPrep/COBAS<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> HCV Quantitative Test v1.0 nebo v2.0 (Roche Molecular Systems Inc., South Branchburg, NJ).

### **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 restriční analýzou (RFLP)(Fabris et al. 2011). Produkt o velikosti 242 bp byl následně štěpen enzymem *Bsh1236I*. 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.

### 3.4 Genové exprese

Pro analýzu genové exprese byla izolována RNA z periferní krve pomocí kitu PAXgene Blood RNA (Qiagen, Hilden, SRN) a kvantifikována měřením absorbance při 260 nm. Poté byla provedena reverzní transkripce, získaná cDNA byla analyzována RT-qPCR za užití Taqman-low density array (Applied Biosystems). Takto bylo zhodnoceno 31 kandidátních genů, získaná data byla kvantifikována softwarem SDS 2.4 (Applied Biosystems) a relativní genové exprese byly určeny komparativní  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodou Relative Quantification (RQ) Manager Software v 1.2.1 (Applied Biosystems).

### 3.5 Statistická analýza

Spojitě 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  $\chi^2$  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](http://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

### 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, ať už se jedná o primoinfekci či reaktivaci onemocnění. Nejčastěji je výskyt CMV nemoci pozorován 2–3 měsíce po SOT, nicméně její nástup může být oddálen podáváním profylaktické protivirové léčby. 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. Dosud bylo publikováno několik studií, které popsaly asociaci variant *IL28B* resp. *IFNL4* s rizikem CMV infekce u pacientů po SOT a HSCT, výsledky ale byly protichůdné. Cílem studie bylo validovat asociaci varianty rs12979860 *IL28B* s rizikem CMV infekce u pacientů po LTx.

#### Metody.

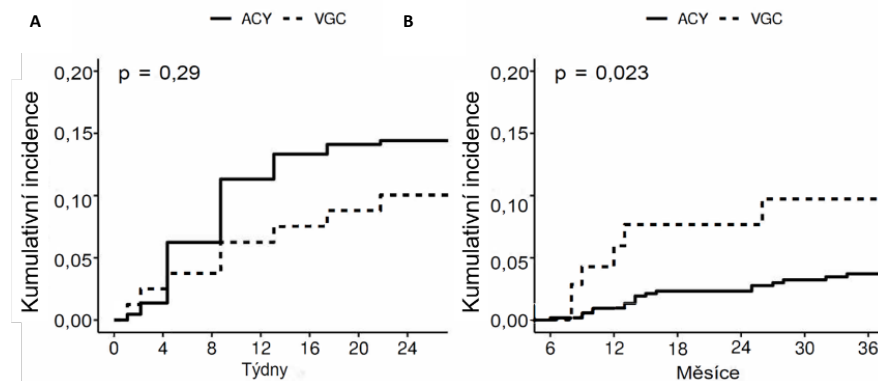
Retrospektivně jsme vyhledali 743 dospělých pacientů, kteří podstoupili LTx, v období 1996–2015 pro jaterní cirhózu různé etiologie s nebo bez malého HCC. Poté jsme identifikovali pacienty, kteří měli typické příznaky CMV nemoci a měli sérologický či histologický průkaz CMV nemoci. Separátně jsme hodnotili pacienty s časným (OPD) a pozdním (PPD) nástupem CMV nemoci. 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).

#### 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 prodělal 6/144 (4,2 %) pacientů, kteří byli vyloučeni 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 1). CMV nemoc neměla vliv na přežití pacientů po transplantaci ( $p = 0,78$ ).

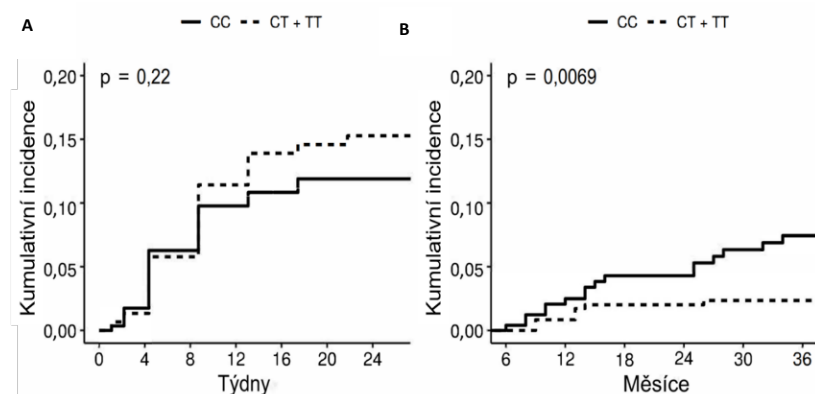
**Graf 1.** Kumulativní incidence výskytu CMV nemoci dle typu profylaxe a doby po LTx ve skupinách OPD (A) a PPD (B)



#### 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 2A). 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 2B). Genotyp *IL28B* neměl vliv na dlouhodobé přežití pacientů po LTx ( $p = 0,92$ ).

**Graf 2.** Kumulativní incidence CMV nemoci dle genotypu *IL28B* a doby po LTx ve skupinách OPD (A) a PPD (B).

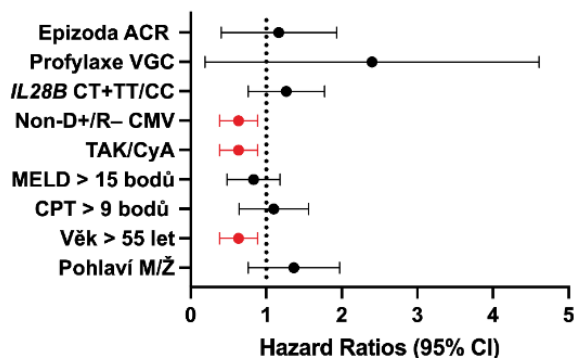


#### Evaluace protektivních faktorů.

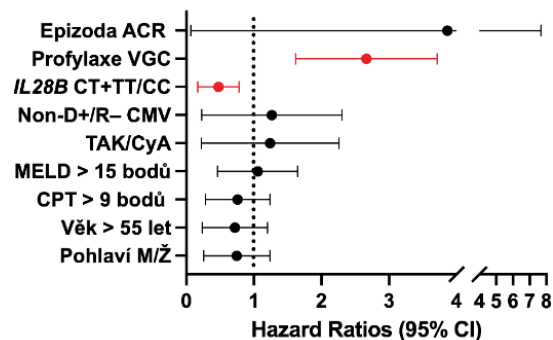
Ve skupině OPD neměl genotyp *IL28B* vliv na výskyt epizody CMV nemoci v alelickém (CC vs. CT + TT,  $p = 0,32$ ) ani v recesivním modelu (CC + CT vs. TT  $p = 0,79$ ). Jako protektivní faktory před rozvojem CMV nemoci byly identifikovány věk  $>55$  let ( $p = 0,001$ ), předtransplantační CMV sérostatus 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 3). 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

valgancikloviru či gancikloviru v profylaxi CMV (OR 2,68, 95% CI 1,09–5,95,  $p = 0,023$ ). V multivariantsní analýze zůstaly z výše zmíněných rizikových faktorů významné jen nosičství alely T genu *IL28B* a typ antivirové profylaxe (Graf 4).

**Graf 3.** Multivariantsní analýza rizikových faktorů OPD CMV



**Graf 4.** Multivariantsní 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

Znalost přirozeného průběhu jednotlivých jaterních onemocnění je 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*. Naším cílem bylo zhodnotit vliv genotypu *PNPLA3* na riziko rozvoje chronického jaterního selhání (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.

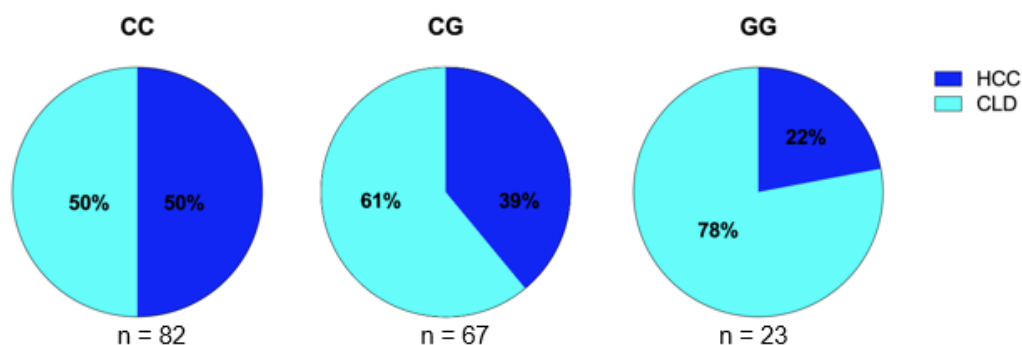
Retrospektivně jsme zhodnotili 172 dospělých pacientů s jaterní cirhózou C infikovaných genotypem 1b, kteří v našem centru podstoupili LTx v období 1995–2018. Vyřazeni byli pacienti s pozitivitou HBsAg či anti-HBc a pacienti s nadměrným příjmem alkoholu (> 60 g/den u mužů a > 40 g/den u žen). Sto pacientů 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. 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).

##### 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. 1).

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. Hodnoty OR se v recesivním modelu prakticky zdvojnásobily, z čehož lze soudit na aditivní efekt každé alely G (Graf 5). Naproti tomu frekvence genotypů ve skupině HCC se od frekvence genotypů ve studii MONICA signifikantně nelišily (Tab. 1).

**Graf 5.** Indikace k LTx (CLF nebo HCC) dle genotypu *PNPLA3*



CLF- chronické jaterní selhání; HCC- hepatocelulární karcinom

**Tabulka 1.** Frekvence genotypů rs738409 C>G *PNPLA3* ve skupinách CLF, HCC a studii MONICA.

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

<sup>a</sup> alelický model (*PNPLA3* CG + GG vs. CC), <sup>b</sup> recesivní model (*PNPLA3* GG vs. CC + CG)

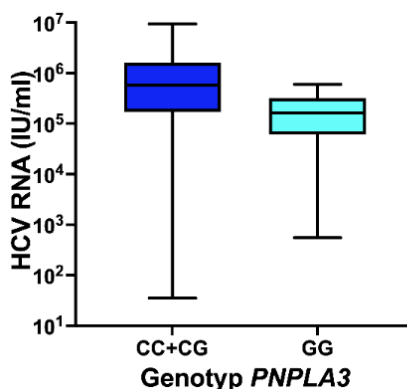
### Rizikové faktory nutnosti LTx.

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

### 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 6). 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 6.** Vliv genotypu rs738409 *PNPLA3* na virémii (HCV RNA) před LTx.



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

Léčba HBV pomocí nukleos(t)idových analog (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.**

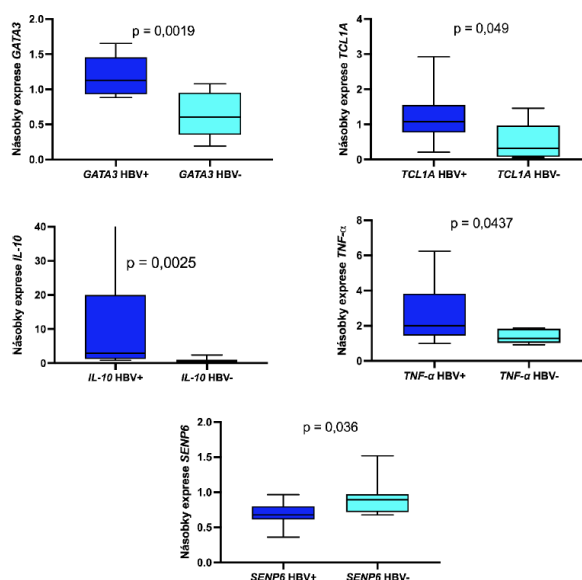
Jednalo se o retrospektivní studii navrženou k analýze exprese transkriptů asociovaných s OT u příjemců RTx a HBV infekcí. Expresní profily byly porovnávány v pěti skupinách: příjemci RTx se stabilní funkcí štěpu, s HBV (n = 9) nebo bez HBV infekce (n = 8), pacienti bez RTx s chronickou HBV léčenou (n = 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. Analyzované geny byly vybrány na základě literárního přehledu jako transkripty asociované s operační tolerancí u RTx či LTx a jako transkripty asociované s imunitní odpovědí při HBV infekci.

##### **Příjemci RTx s HBV mají vyšší expresi *GATA3*, *TCL1A* a *IL-10*.**

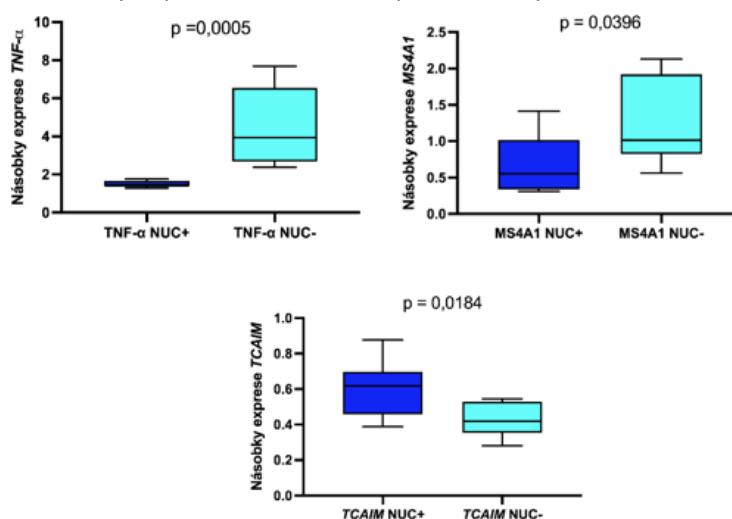
K objasnění uvažované protektivní role HBV infekce na přijetí štěpu ledviny byla porovnána exprese genů z periferní krve spojených s OT. Porovnali jsme příjemce štěpu ledviny s a bez HBV infekce. Pacienti s HBV měli významně vyšší expresi genů *GATA3* (p = 0,0019), *TCL1A* (p = 0,049), *IL-10* (p = 0,0025) a *TNF-α* (p = 0,027). Snížená exprese byla zaznamenána v genu *SENP6* (p = 0,034) (Graf 7).  
*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 *TCA1M* (p = 0,0184), (Graf 8).

**Graf 7.** Expres genů asociovaných s operační tolerancí, srovnání pacientů po RTx s HBV a bez HBV infekce. Násobky exprese k mediánu exprese zdravých kontrol.



**Graf 8.** Expres genů asociovaných s protiviřovou léčbou u pacientů s HBV infekcí s protiviřovou 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. Opačné výsledky publikovala švýcarská skupina, ale při podrobnějším zhodnocení je patrné, že se jedná o heterogenní soubor pacientů po různých SOT, kterým byla protiviřová 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).

Nosičství genotypu TT rs12979860 je spojen s vyšší bazální expresí ISG, jejíž úroveň se již nezvýší po stimulaci exogenním IFN- $\alpha$  z důvodu exhausce T lymfocytů (Sung et al. 2017). Předpokladem pro dosažení imunitní kontroly CMV infekce je stimulace IFN-I a IFN-II, které jsou ale velmi účinně antagonistizované IE geny CMV, a které efektivně inhibují IFN signalizační kaskádu. Podobný mechanismus lze očekávat i v případě IFN-III.

**Varianta *PNPLA3* rs738409 c.444C>G** je asociována 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).

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). Věk dle řady studií 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, a proto jsou indikováni k LTx v mladším věku pro CLF, tedy dříve, než dojde k rozvoji HCC.

Rychlejší progresi HCV infekce do chronického selhání jater 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.

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 (Coscone 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 několik dekád pozorujeme fázi imunotolerance (t.č. se tato fáze nazývá HBeAg pozitivní chronická infekce HBV).

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- $\alpha$* , naproti tomu exprese *SENP6* byla snižena ve srovnání s transplantovanými pacienty bez HBV infekce. *GATA3* je transkripční faktor Th2-buněk popsáných 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 popsán 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 zůstává úloha TNF- $\alpha$ , který je známý pro své prozánětlivé působení, naproti tomu však některé studie zároveň prokazují jeho schopnost aktivovat Tregs. TNF- $\alpha$  působí cestou receptorů TNFR1, který exprimován na řadě typů buněk a obsahuje cytoplasmatickou „death“ doménu, a TNFR2, který je exprimovaný prakticky výhradně na imunitních buňkách. TNFR2 „death“ doménu postrádá, ale váže se na TNFR asociovaný faktor 2 a aktivuje NF- $\kappa$ B a MAP kinázovou signalizační

kaskádu. 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 progresu 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- $\alpha$* , 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- $\alpha$* , *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 použité literatury

- Aleman, S., N. Rahbin, O. Weiland, L. Davidsdottir, M. Hedenstierna, N. Rose, H. Verbaan, P. Stal, T. Carlsson, H. Norrgren, A. Ekblom, 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.
- 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.
- 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.
- Blumberg, B. S., H. J. Alter, and S. Visnich. 1965. 'A "New" Antigen in Leukemia Sera', *JAMA*, 191: 541-6.
- 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.
- Brinas, F., R. Danger, and S. Brouard. 2021. 'TCL1A, B Cell Regulation and Tolerance in Renal Transplantation', *Cells*, 10.



- Bruix, J., M. Sherman, and Diseases American Association for the Study of Liver. 2011. 'Management of hepatocellular carcinoma: an update', *Hepatology*, 53: 1020-2.
- Busca, A., and A. Kumar. 2014. 'Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection', *Virology*, 11: 22.
- 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.
- Coscone, 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.
- EASL. 2020. 'EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series()', *J Hepatol*, 73: 1170-218.
- 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.
- Fabris, C., E. Falletti, 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.
- Falletti, 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.
- 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.
- 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.
- Goodrum, F. 2016. 'Human Cytomegalovirus Latency: Approaching the Gordian Knot', *Annu Rev Virol*, 3: 333-57.

- 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.
- 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.
- 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.
- Katze, M. G., Y. He, and M. Gale, Jr. 2002. 'Viruses and interferon: a fight for supremacy', *Nat Rev Immunol*, 2: 675-87.
- Li, Y., T. Koshihara, 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.
- Liu, Y. L., G. L. Patman, J. B. Leathart, A. C. Piguat, 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.
- 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.
- 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.
- Mazewski, C., R. E. Perez, E. N. Fish, and L. C. Platanius. 2020. 'Type I Interferon (IFN)-Regulated Activation of Canonical and Non-Canonical Signaling Pathways', *Front Immunol*, 11: 606456.
- 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.
- 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.
- Navarro, D. 2016. 'Expanding role of cytomegalovirus as a human pathogen', *J Med Virol*, 88: 1103-12.
- Noureddin, M., Y. Rotman, F. Zhang, H. Park, B. Rehmann, 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*.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- Trunečka, P., I. Miková, D. Dlouhá, J. A. Hubáček, E. Honsová, L. Kolesar, V. Lanska, S. Franková, J. Šperl, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

## 8 Seznam vybraných 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 D, 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.

### 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