

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor:
Molekulární biologie a biochemie organismů



Lucie Písková

Vývoj imunitní odpovědi proti lidskému cytomegaloviru
Formation of anti-hCMV immunity

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Kamila Žůrková, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3. 5. 2013

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla zejména poděkovat své skvělé školitelce Kamile Žůrkové, bez které by tato práce nikdy nevznikla, děkuji jí za rady a věcné připomínky při vedení bakalářské práce a za zkušenosti, které mi předala při práci v laboratoři. Mé díky patří i rodině a drahému příteli Davidovi Přikrylovi za oporou, kterou mi během studia poskytli.

Abstrakt

Lidský cytomegalovirus (HCMV) je starobylý virus s dvouvláknovou DNA patřící do podčeledi β Herpesvirinae a je všudypřítomný v lidských populacích. Jako u jiných herpesvirů vede primární HCMV infekce k celoživotní latenci a periodicky dochází ke zpětné reaktivaci viru z latence. Přenos tohoto viru závisí na přímém kontaktu mezi lidmi. U imunokompetentních jedinců je primární HCMV infekce většinou asymptomatická, ale reaktivovaný virus je hlavním důvodem nemocí u jedinců se sníženou obranyschopností včetně pacientů s AIDS a příjemců alogenních transplantátů.

Tato práce se zabývá HCMV a jeho koexistencí s imunitním systémem hostitele. Dále obsahuje informace o komplikacích způsobených HCMV u pacientů po orgánových transplantacích nebo po transplantacích hematopoetických kmenových buněk.

Klíčová slova: HCMV, imunitní systém, protilátky, cytotoxické lymfocyty, transplantace

Abstract

The human cytomegalovirus (HCMV) is an ancient double-stranded DNA virus that belongs to subfamily β Herpesvirinae and is ubiquitous in human population. Like other herpesviruses infections, the HCMV primary infection leads to a lifelong latency and the virus reactivates from latency periodically through the whole life. The transmission of this virus depends on direct contact among people. The primary HCMV infection is usually asymptomatic in immunocompetent individuals but the reactivated virus is a major cause of diseases in immunocompromised individuals including AIDS patients and allo-graft transplant recipients.

This work represents a report about HCMV and its coexistence with the host immune system. The thesis also contains information about complications caused by HCMV in patients who underwent solid-organ or hematopoietic stem cell transplantation.

Keywords: HCMV, immune system, antibodies, cytotoxic lymphocytes, transplantation

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Obsah.....	6
Seznam zkratk	8
Úvod	11
1 Herpesviridae	12
2 Životní cyklus HCMV.....	14
2.1 Složení virionu	14
2.2 Cyklus viru	15
2.3 Exprese genů	16
2.4 Přenos HCMV	17
2.5 Latence a reaktivace	18
3 Interakce HCMV s imunitním systémem.....	20
3.1 Patogeneze.....	20
3.2 Imunitní odpověď zdravého člověka na HCMV	21
3.2.1 Přirozená imunita	21
3.2.2 Adaptivní imunita.....	22
3.2.2.1 Humorální odpověď	22
3.2.2.2 Buněčná imunita	22
3.2.2.2.1 CD8 ⁺ T-lymfocyty	22
3.2.2.2.2 CD4 ⁺ T-lymfocyty	23
3.3 Únik HCMV imunitnímu systému	23
4 Rekonstituce imunitního systému po transplantaci kostní dřeně	25
4.1 Rekonstituce přirozené imunity	25
4.2 Adaptivní imunitní rekonstituce.....	25
4.2.1 B-lymfocyty	25
4.2.2 T-lymfocyty.....	26
5 Posttransplantační ohrožení života při infekci HCMV	27
5.1 Význam HCMV při orgánové transplantaci.....	27
5.2 Transplantace hematopoetických kmenových buněk.....	27
6 Možnosti léčby či utlumení HCMV chemickou a biologickou léčbou	29
6.1 Antivirotika – profylaktická léčba.....	29

6.2	Antivirotika – preemptivní léčba.....	29
6.3	Buněčná terapie	30
6.4	Profylaktická vakcinace	31
	Závěr.....	32
	Seznam použité literatury	33

Seznam zkratk

AIDS	syndrom získané imunodeficiency (acquired immune deficiency syndrome)
Allo-SCT	alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	diferenční antigen (cluster of differentiation)
CDV	cidofovir
CNS	centrální nervový systém
D	dárce
DCs	dendritické buňky (dendritic cells)
DE	opožděně časné geny (delayed-early)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EBV	virus Epstein a Barrové (Epstein-Barr virus)
gB	glykoprotein B
GCV	ganciclovir
gH	glykoprotein H
gL	glykoprotein L
gM	glykoprotein M
gN	glykoprotein N
gO	glykoprotein O
GvH	reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host)
HAART	vysoce aktivní retrovirální terapie (highly active antiretroviral therapy)
HCMV	lidský cytomegalovirus (human cytomegalovirus)
HHV	lidský herpesvirus (Human Herpesvirus)
HIV	virus lidské imunodeficiency (human immunodeficiency virus)
HLA	hlavní lidský antigen (human leukocyte antigen)
HP	primáza
HSV	Herpes Simplex Virus
IE	bezprostředně časné geny (immediate-early)
IFN	interferon
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E

IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin
IR	invertovaná repetice (internal repeat)
IRL	dlouhá invertovaná vnitřní repetice (internal repeat long)
IRS	krátká invertovaná vnitřní repetice (internal repeat short)
kbp	páry kilobází
L	pozdní geny (late)
LTP	největší tegumentový protein (the largest tegument protein)
MCP	majoritní kapsidový protein (major capsid protein)
MHC I/II	hlavní histokompatibilitní komplex (major histocompatibility complex)
MIEP	hlavní promotor bezprostředně časných genů (major immediate early promotor)
NF- κ B	transkripční jaderný faktor (nuclear factor κ B)
NK	přirozený zabiják (natural killer)
NKG2A	inhibiční receptor NK buněk
ORF	otevřený čtecí rámec (open reading frame)
OriLyt	místo počátku replikace
PAC	<i>cis</i> element
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PFA	foscarnet
POL	katalytická podjednotka polymerázy
PORT	portální protein (portal protein)
pp	fosfoprotein
PPS	procesivní podjednotka polymerázy
R	příjemce
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
SCP	nejmenší kapsidový protein (the smallest capsid protein)
SCT	transplantace hematopoetických kmenových buněk (hematopoetic stem cell transplantation)
SOT	transplantace orgánů (solid-organ transplantation)
SSB	protein vázající se na jednořetězcovou nukleovou kyselinu (single strand binding)

STAT	transduktory a aktivátory transkripce (signal transducers and activators of transcription)
TLR	receptor podobný Toll (Toll-like receptor)
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
TRI	kapsidový protein
TRL	dlouhá repetitivní koncová oblast (terminal repeat long)
TRS	krátká repetitivní koncová oblast (terminal repeat short)
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
UL	dlouhá unikátní kódující oblast (unique long)
US	krátká unikátní kódující oblast (unique short)
VGCV	valganciklovir
VZV	Varicella Zoster Virus

Úvod

Lidský cytomegalovirus (HCMV) je virus hojně rozšířený po celém světě, jak ve vyspělých zemích, tak v rozvojových. Patří do skupiny lidských herpetických virů a je z nich vůbec největší. Tento virus je spojen s asymptomatickou infekcí u normálních zdravých jedinců, ale pokud nastane infekce během těhotenství, může dojít i k poškození plodu (Fowler et al., 1992). Přenos HCMV při transplantacích představuje další velký problém, protože HCMV infekce ohrožuje pacienta na životě.

V naší laboratoři na Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT) se zabýváme infekcí HCMV po transplantaci kostní dřeně, proto bych se chtěla v této práci zaměřit na průběh infekce HCMV a dále imunitní odpověď na něj u zdravých lidí a u pacientů s narušeným imunitním systémem.

1 Herpesviridae

Čeď Herpesviridae pŕedstavuje obalené viry s dvouřetězcovou lineární DNA uzavřenou v kapsidě s ikosahedrální symetrií. Pro tyto viry je typický tzv. tegument, což je amorfni bílkovinná hmota obsahující i buněčnou a virovou RNA mezi kapsidou a lipidovým obalem. Funkce proteinů v tegumentu je pŕevážně strukturní, avšak hrají i roli v odpovědi hostitele na infekci.

Herpetické viry se dělí na tři podčeledi: α , β , γ (viz Tab. 1). Podčeleď α Herpesvirinae zaštiťuje ptačí a savčí viry, u kterých probíhá latentní fáze infekce v gangliích centrálního nervového systému (CNS), např. virus Herpes Simplex Virus I (HSV-I) a II (HSV-II) a Varicella Zoster (VZV). β Herpesvirinae jsou viry, které mají dlouhý replikační cyklus, napadají různé buňky v těle a patří sem právě lidský cytomegalovirus. Poslední podčeleď, γ Herpesvirinae, útočí hlavně na B-lymfocyty, ale mohou infikovat i buňky lymfatických uzlin, spadá sem např. virus Epsteinova a Barrové (EBV).

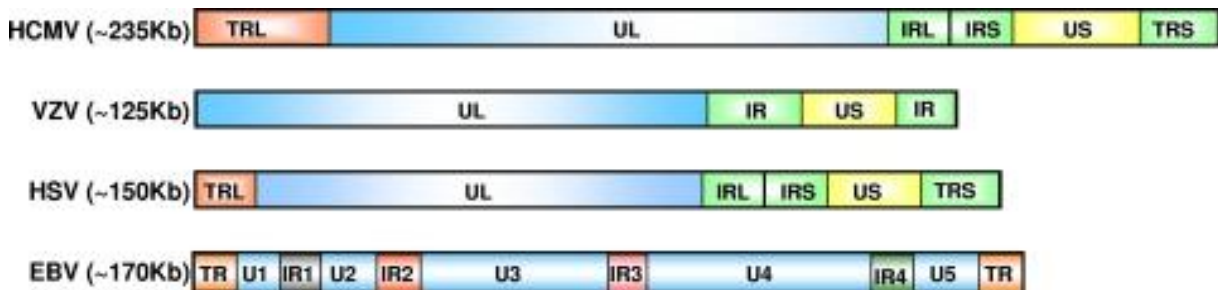
Herpesvirus	Zkratka		Velikost (kb)
	Běžná	Formální	
<i>Alphaherpesvirinae</i>			
<i>Simplexvirus</i>			
Herpes simplex virus type 1	HSV-1	HHV-1	152
Herpes simplex virus type 2	HSV-2	HHV-2	155
<i>Varicellovirus</i>			
Varicella-zoster virus	VZV	HHV-3	125
<i>Betaherpesvirinae</i>			
<i>Cytomegalovirus</i>			
HCMV	HCMV	HHV-5	227-236
<i>Roseolovirus</i>			
Human herpesvirus type 6	HHV-6	HHV-6	159-162
Human herpesvirus type 7	HHV-7	HHV-7	144-153
<i>Gammaherpesvirinae</i>			
<i>Lymphocryptovirus</i>			
EBV	EBV	HHV-4	172-173
<i>Rhadinovirus</i>			
Human herpesvirus type 8	HHV-8	HHV-8	134-138

Tab. 1: Klasifikace lidských Herpesvirů (Crough and Khanna, 2009)

Genom Herpesviridae je tvořen DNA a mezi viry panuje značný polymorfismus ve velikosti díky koncovým a vnitřním repeticím (viz Obr. 1). Nejdříve byla mapována forma E genomu, který představují např. HCMV či HSV. Na levém konci genomu je repetitivní oblast **TRL** (terminal repeat long), ta má sekvence **a** a **b** (palindromatické sekvence), pak následuje dlouhá kódující unikátní oblast **L (UL)**, dále invertovaná vnitřní repetice **IRL** (internal repeat long), která obsahuje invertovanou repetici **b**. Za dlouhou repetici se nachází oblast **IRS** (internal repeat short), krátká invertovaná repetice s invertovanou sekvencí **c**. Za **IRS** se nachází druhá kódující **US** (unique short) oblast a na pravém konci genomu je sekvence **TRS** (terminal repeat short), ta obsahuje krátkou sekvenci **c** a **a**. Při replikaci DNA dochází k rekombinaci na repetitivních sekvencích, což má za následek vznik až čtyř možných izomerů, protože může dojít k obrácení repetice u formy E genomu.

V genomu VZV, který představuje formu D genomu, je invertovanými repeticemi (**IR**) obklopena pouze **US** oblast, to značí možnost vzniku pouze dvou izomerů genomu.

Genom EBV má formu C. Ta sestává z většího množství vnitřních repetic, které rozdělují unikátní oblast na kratší úseky a nedávají vzniknout izomerům genomu při replikaci DNA.



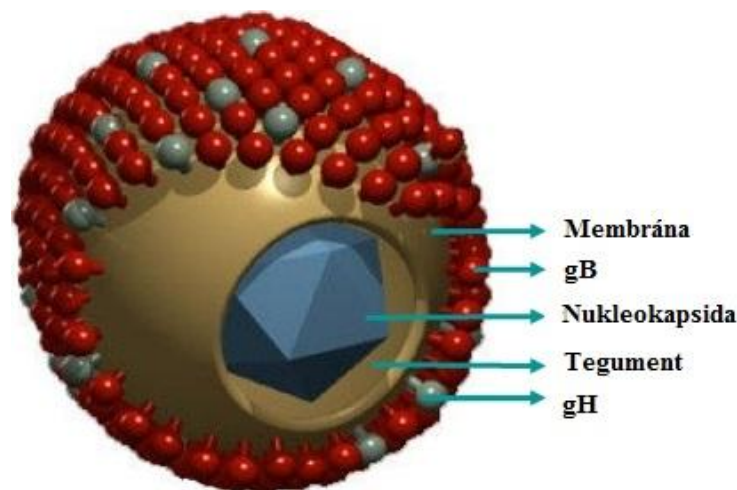
Obr. 1: Uspořádání genomů herpesvirů

2 Životní cyklus HCMV

Lidský cytomegalovirus je běžným β herpesvirem s formálním označením HHV-5. Má virion o velikosti 200 – 300 nm a genom o velikosti přibližně 235 kilobází párů (kbp), ten kóduje více než 165 genů (Davison et al., 2003).

2.1 Složení virionu

Virion HCMV sestává z nukleokapsidy uložené uvnitř tegumentu, který je navíc ohraničen lipidovou dvouvrstvou (viz Obr. 2). Nukleokapsida ve svých útrokách nese virovou genetickou informaci. Dále se skládá z pěti hlavních proteinů (Britt and Boppana, 2004): majoritní protein kapsidy (MCP, produkt genu UL86), minoritní (TRI2, produkt genu UL85), minoritní vazebný (TRI1, produkt genu UL46), nejmenší (SCP, produkt genu UL48-49) a portální (PORT, produkt genu UL104).



Obr. 2: Virion HCMV (zdroj <http://www.biografix.de/>)

Kapsidové proteiny jsou uspořádány do útvaru s triangulačním číslem $T = 16$. MCP se skládá do hexonů a pentonů a tím vytvoří základní tvar ikosahedrální struktury kapsidy (Chen et al., 1999). Mezi nimi jsou triplexy TRI1 a TRI2. Protein SCP se nachází na vrcholech kapsidy a PORT proteiny jsou velice důležité pro enkapsidaci virové DNA do nukleokapsidy (Varnum et al., 2004).

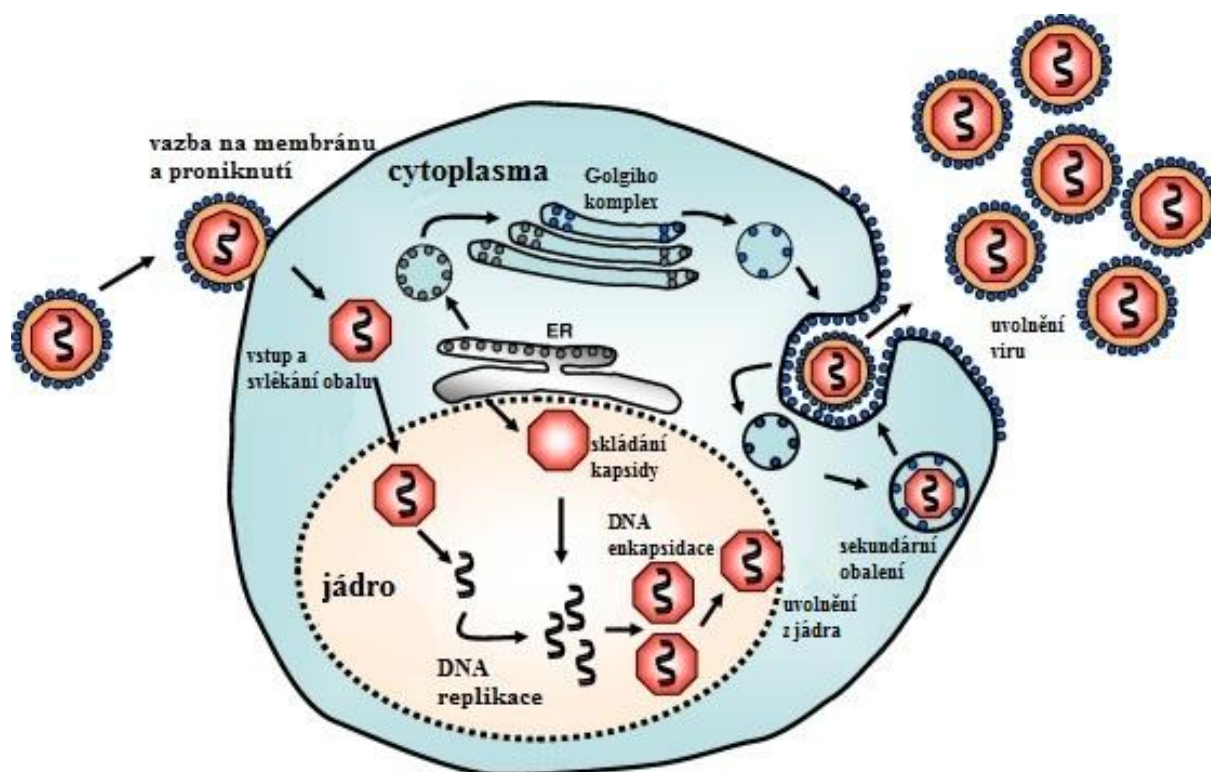
Tegument (matrix) je bílkovinná hmota, která obsahuje hlavně proteiny z rodiny UL82 včetně nejhojnějšího proteinu, na který je zaměřena imunita hostitele, pp65 (produkt genu UL83), virový transaktivátor pp71 (UL82), maturační protein pp150 (UL32) a největší

tegumentový protein (LTP, produkt genu UL48). Tegument je na povrchu kryt membránou, která obsahuje virem kódované glykoproteiny: gB, gH, gL, gM, gN a gO (Varnum et al., 2004).

2.2 Cyklus viru

Díky glykoproteinům, které si HCMV nese na svém povrchu, dokáže virus specificky interagovat s receptory na hostitelské buňce a vstoupit dovnitř fúzí nebo endocytózou. Glykoprotein B je rozhodující pro interakci s heparansulfátem na buněčné membráně a k fúzi do útrobu napadené buňky (Isaacson and Compton, 2009). Je také cílem neutralizačních protilátek humorální imunity. Glykoproteiny M a N také pomáhají interakci virionu s povrchem buňky a proteiny gH, gL a gO mají roli přímo ve fúzi s membránou, tvoří tzv. vstupní fúzní komplex (Varnum et al., 2004). Po fúzi se nukleokapsida uvolní do cytoplasmy a je přesunuta do jádra, kde se z ní uvolní DNA. Tehdy se začnou exprimovat proteiny IE genů, což jsou bezprostředně časné geny. Dále dojde k transkripci a translaci DE genů (opožděně časné geny), které jsou závislé na expresi genů IE. Jejich produkty iniciují replikaci virové DNA a jsou důležité i pro maturaci kapsidy. Později se exprimují L geny (pozdní geny). Virová replikace vyvolává enkapsidaci nově vzniklé virové DNA, která se ve formě kapsid dostává z jádra do cytoplasmy. K získání sekundárního obalu dojde v cytoplasmě, kdy je kapsida obalena membránou z endoplazmatického retikula a z Golgiho komplexu, následně virus opustí hostitelskou buňku exocytózou (viz Obr. 3).

HCMV vytváří i prázdné viriony bez DNA, které se v infikovaném organismu nedají rozpoznat od plně funkčních virionů. To je viru velice nápomocné při „obraně“ proti hostitelskému imunitnímu systému. Imunitní systém bojuje proti všem virionům, a čím víc jich bude, tím spíše se nějakému virionu může podařit „útok“ uniknout a nakazit další buňky. Viriony bez DNA slouží tedy pouze k tomu, aby zabavily imunitní systém hostitele a viriony s DNA se mohly volně šířit.



Obr. 3: Životní cyklus HCMV (Crough and Khanna, 2009)

2.3 Exprese genů

Genom viru je popsán výše v první kapitole Herpesviridae, ale zde bych ještě ráda zmínila další důležité oblasti genomu HCMV. V terminálních repeticích se nacházejí elementy PAC-1 a PAC-2, které fungují jako signál pro zabalení virové DNA do kapsidy (Britt and Boppana, 2004). Dále oblast oriLyt, která se nachází mezi UL57 a UL69 oblastí; je nezbytná pro replikaci DNA a slouží jako počátek replikace, origin (Anders et al., 1992). Hlavní IE promotorový enhancer (zesilovač; MIEP) slouží jako transkripční regulátor po vstupu do buňky pro geny IE1 a IE2 (viz dále) a může také hrát důležitou roli ve fázi latence a následné reaktivaci viru (Reeves et al., 2005)

Jakmile se virová DNA dostane do jádra, začíná exprese IE genů ze čtyř různých oblastí UL36/UL37, IE1/IE2, TRS1/IRS1 a US3 (Pari and Anders, 1993). Regulace IE1 a IE2 genů je zajištěna enhancerem MIEP a dalšími aktivátory případně represory (Prösch et al., 2000). Tato oblast má esenciální funkci pro expresi genů oblasti DE a L. IE2-p86 indukuje zastavení buněčného cyklu, IE1-p72 potlačuje signál STAT dráhy, která aktivuje tvorbu interferonu (Paulus et al., 2006).

Po expresi genů IE dochází k expresi DE genů, které jsou nezbytné pro replikaci DNA a účastní se procesů zrání kapsidy. Důležitou oblastí je UL112-113, kde jsou kódované proteiny přispívající k zahájení replikace. Oblast UL54 je esenciální, protože kóduje katalytickou podjednotku DNA polymerázy.

Tím je prostředí buňky připravené na replikaci DNA. Syntéza je závislá na aktivaci v oblasti oriLyt, kde replikace začne. Pro replikaci jsou důležité tyto proteiny: katalytická podjednotka polymerázy (POL) kódovaná v oblasti UL54, procesivní podjednotka polymerázy (PPS) z oblasti UL44, SSB protein (single strand DNA binding protein) z UL57 a primáza (HP; McMahon and Anders, 2002).

Před zahájením syntézy nové virové DNA musí nejdříve dojít ke spojení řetězce a vzniku cirkulární DNA. Pak začnou na oriLyt působit již vzniklé aktivátory genů IE a DE a dojde k iniciaci replikace. Později dochází k syntéze L genů, kde část je exprimovaná ještě za dobu replikace a část potřebuje už replikaci zastavenou (Stinski, 1978). Proteiny DE a L genů jsou důležité pro zrání kapsidy, enkapsidaci DNA, maturaci a výstup virionu z buňky (Tandon and Mocarski, 2012).

2.4 Přenos HCMV

Séroprevalence HCMV je 20 – 100 % na různých místech světa, obecně je známo, že země s omezenými přírodními zdroji mají promořenost vyšší a se stoupající věkem jedince se pravděpodobnost získání infekce zvyšuje (Staras et al., 2006). HCMV se velice snadno v populaci přenáší. Infekční virus byl vyizolován ze slin, slz, mateřského mléka, spermatu, děložního sekretu, moči a krevních produktů (Sia and Patel, 2000). Dalším důležitým faktorem, proč je HCMV tak úspěšný v promoření populací je, že jedinec zůstává nakažlivým ještě dlouho po primární infekci, která u něj nastane. Navíc si virus vyvinul strategii perzistence v člověku bez nutnosti mít nějaký zvířecí rezervoár.

Přenos z matky na dítě během těhotenství je velice nebezpečný, protože může způsobit neurologické postižení plodu (Fowler et al., 1992). Matka může přenést HCMV na dítě i kojením, v mateřském mléce se nachází významné množství infekčního viru. Malé děti pak začínají být velkým rezervoárem infekce pro populaci, od nich se HCMV může šířit dál, nejen na další děti, se kterými se stýkají, ale i na dosud neinfikované dospělé. Kromě dětského věku

je další výrazný nárůst séroprevalence HCMV v období adolescence, což značí přenos sexuálním kontaktem.

Infekce jedním kmenem HCMV bohužel neznamena, že by byl jedinec chráněn i proti primární infekci jiným kmenem cytomegaloviru. Imunitní systém nevytváří dostačující jednotnou obranu vůči různým kmenům HCMV, jeden člověk tak může být současně nakažen několika odlišnými kmeny HCMV. Pro zdravého člověka ale HCMV infekce nepředstavuje nebezpečí, problém nastává u jedinců s poškozeným imunitním systémem.

Transplantace orgánů a poskytování krevních produktů jsou také zdrojem infekce HCMV, u pacientů po transplantaci se však jedná o životu nebezpečnou infekci (viz dále).

2.5 Latence a reaktivace

Po primární infekci, ke které dochází po vstupu viru do organismu, následuje latentní fáze životního cyklu HCMV. Fáze latence není plně prozkoumaná, ale víme, že k ní dochází nejvíce v buňkách myeloidní linie CD34⁺ (Sinclair and Sissons, 2006). Avšak genomová virová DNA může být detekovaná v různých typech buněk včetně monocytů a makrofágů (Soderberg et al., 1993), lymfocytů (Schrier et al., 1985), CD4⁺ buněk v kostní dřeni (Mendelson et al., 1996), nezralých dendritických buněk (Sénéchal et al., 2004) a endotelových buněk (Sinzger et al., 1995). Exprese genů IE1 a IE2 je v době latence potlačena a virová replikace je zastavená, exprimují se jen určité geny, např. alternativní forma cytomegalovirového interleukinu IL-10 (produkt genu UL111.5A; Jenkins et al., 2004).

Reaktivace HCMV z latence je klíčovým krokem v patogenezi infekcí HCMV. Když dojde ke snížení imunity psychickým či fyzickým stresem, jinou infekcí (např. rozvinutí AIDS u HIV pozitivních pacientů), nebo imunosupresí v rámci transplantace, dochází k reaktivaci viru.

Přesný mechanismus, který vede k reaktivaci, nebyl objasněn, ale tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) je považován za klíčový mediátor (Prösch et al., 2000). Na opětovné aktivaci IE genů se podílejí cytokiny a transkripční faktory jako NF- κ B, který je aktivován přes TNF receptor.

Reaktivace HCMV může být dosaženo prostřednictvím katecholaminů, epinefrinu, norepinefrinu a zvýšené koncentrace cAMP, což vede ke stimulaci IE promotoru/enhancer (Prösch et al., 2000).

3 Interakce HCMV s imunitním systémem

3.1 Patogeneze

Primární infekce HCMV má většinou u zdravých jedinců asymptomatický průběh, ale v některých případech může mít infekce za následek mononukleózu, která bývá také projevem primární infekce virem Epstein a Barrové. Jejimi symptomy jsou: horečka (obvykle trvá 2 – 3 týdny, ale může přetrvat až 5 týdnů), svalová bolest, zvětšení lymfatických uzlin a zvětšení jater. Dalšími vzácnými, ale dokumentovanými příznaky jsou: hepatitida, myokarditida, pneumonitida a aseptická meningitida (Sissons and Carmichael, 2002).

Vrozená HCMV infekce je příčinou nemocí a smrti novorozenců, může způsobit hluchotu (Fowler and Boppana, 2006) a mentální postižení dítěte (Fowler et al., 1992). Ke kongenitálnímu přenosu může dojít, když je virus reaktivován viru v průběhu těhotenství, nebo když matka prochází primární infekcí v průběhu prvního trimestru, kdy HCMV infekce představuje nebezpečnou komplikaci pro vývoj plodu. Kongenitálně HCMV nakažené děti představují přibližně 0,64 % z živých novorozeňat (Kenneson and Cannon, 2007). Riziko primární infekce u séronegativní matky v těhotenství je 1 – 4 %, to představuje vysoké riziko kongenitální infekce 30 – 40 % (Sissons and Carmichael, 2002; Stagno S., 1986).

Naštěstí většina kongenitálně nakažených dětí je asymptomatická při narození, ale přibližně 10 až 15 % dětí jsou symptomatické. Mohou mít následující symptomy: hepatitida, hepatosplenomegalie, pneumonie, petechie, poškození CNS, růstová retardace u předčasně narozených dětí a nedoslýchavost. Tyto symptomatické děti mají úmrtnost asi 30 % (Malm and Engman, 2007).

Později až kolem 6. roku života může dojít k viditelným následkům kongenitální nákazy HCMV, kdy se u asymptomatických i symptomatických dětí může projevit ztráta sluchu (Malm and Engman, 2007).

HCMV je vážnou infekcí u imunokompromitovaných jedinců, jako jsou pacienti s virem lidské imunodeficiencie (HIV). Před zavedením vysoce aktivní antiretrovirální terapie (HAART), tj. kombinace nejméně 3 antiretroviálních léků z různých tříd, přibližně 40 % pacientů infikovaných HIV trpělo projevy HCMV infekce v průběhu života (Steininger et al., 2006). S dostupností HAART léčby HIV pozitivních pacientů HCMV infekce poklesla

(Palella et al., 1998). Bohužel i přes tento pokrok poznatky naznačují, že infekce může stále přímo a/nebo nepřímo urychlit progresi k AIDS a smrti (Griffiths, 2006). Nejčastějším projevem onemocnění HCMV u HIV pozitivních pacientů je retinitida neboli zánět sítnice. Mezi další projevy patří: enterokolitida, gastritida, ezofagitida, hepatitida a encefalitida (Steininger et al., 2006).

Další nebezpečí HCMV infekce hrozí pacientům, kteří podstoupili transplantaci – viz Kapitola 5.

3.2 Imunitní odpověď zdravého člověka na HCMV

HCMV je perzistentní virus a jako všechny takovéto viry musí přežít tvář v tvář imunitnímu systému hostitele. Mezi obranné mechanismy hostitele patří vrozená imunita i adaptivní imunita: porucha adaptivní T-buněčné odpovědi bývá spojena s HCMV infekcí. Virus sám o sobě může ovlivnit imunitní odpověď, ale také může ustanovit latenci v buňkách imunitního systému.

3.2.1 Přirozená imunita

Vrozený imunitní systém hraje důležitou roli v obraně hostitele proti HCMV a také připravuje adaptivní imunitu na odpověď proti infekci. HCMV a jiné patogeny např. bakterie stimulují receptory podobné Toll (TLR) a tím spouští aktivaci signálních drah. Ty vyvolávají sekreci zánětlivých cytokinů, které rekrutují buňky vrozeného imunitního systému, a expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86, které jsou důležité pro aktivaci adaptivní imunity (Compton et al., 2003). U HCMV se také prokázala aktivace a signalizace prostřednictvím interakce gB/gH a TLR2, který aktivuje tvorbu pro obranu hostitele velmi důležitých cytokinů (Compton et al., 2003).

Nedílnou součástí vrozené imunity jsou tzv. NK buňky, o jejich funkci v HCMV infekci u lidí mnoho nevíme. Avšak máme k dispozici stále přesvědčivější důkazy o tom, že NK buňky hrají klíčovou roli v hostitelské obraně proti virové infekci. U pacientů po transplantaci ledvin se aktivita NK buněk při primární infekci a reaktivaci viru zvýšila, to naznačuje jejich přispění k zotavení z HCMV infekce (Venema et al., 1994).

3.2.2 Adaptivní imunita

Adaptivní imunita reaguje na antigeny prostřednictvím specifických molekul. Sem patří humorální a buněčně zprostředkované mechanismy a podstatou této imunity je imunologická paměť.

3.2.2.1 Humorální odpověď

Adaptivní dlouhodobá imunita slouží k ovládnutí reaktivace HCMV v hostiteli a je důležitá pro prevenci nekontrolovatelné replikace viru. Humorální odpověď imunitního systému je důležitá především pro omezení šíření viru a pro zmírnění závažnosti onemocnění (Jonjić et al., 1994).

Hlavním cílem neutralizačních protilátek proti HCMV je glykoprotein gB, který se podílí na vstupu viru do buňky (Britt et al., 1990). Dále jsou protilátky produkovány i proti gH (Rasmussen et al., 1991). U lidí bylo prokázáno, že dochází k přenosu protilátek z HCMV séropozitivní matky na plod a to chrání plod před transplacentárním přenosem infekce a rozvoji CMV onemocnění (Nigro et al., 2005).

3.2.2.2 Buněčná imunita

Buněčná imunitní odpověď je převládajícím mechanismem v boji proti HCMV. Její vývoj je zapotřebí, aby došlo k ovládnutí primární HCMV infekce, po které virus vstoupí do fáze latence. Zřízení trvalé adaptivní imunity je u zdravých jedinců důležité pro udržení HCMV v latenci a zabraňuje tím lytické fázi infekce.

3.2.2.2.1 CD8⁺ T-lymfocyty

Vývoj HCMV-specifických cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů koreluje s ochranou proti viru (Reusser et al., 1991) a se zotavením z HCMV onemocnění (Quinnan et al., 1982). Specifické CD8⁺ T-lymfocyty, které produkují IFN γ , se podle výsledků studií zdají být ochranným prvkem proti s HCMV spojenému zánětu sítnice u pacientů s AIDS (Jacobson et al., 2004). Dále údaje o transplantacích kostní dřeně vypovídají rovněž o klíčové roli těchto buněk při kontrole HCMV infekce (Reusser et al., 1991).

Až 40 % $CD8^+$ T-lymfocytů v krvi starších jedinců může být specifických pro HCMV antigeny (Crough and Khanna, 2009). Celoživotní reaktivace jsou důvodem, proč je HCMV tak imunogenním a způsobuje tak rozsáhlou imunitní odpověď. Imunitní reakce na virové proteiny je rozsáhle zkoumaná. Specifická aktivita těchto buněk je nejčastěji namířena proti antigenům pp65 a IE1, ale odpovídají také na další antigeny jako IE2, pp150, pp50, gB, gH a další (Elkington et al., 2003).

3.2.2.2 $CD4^+$ T-lymfocyty

Nejen $CD8^+$ T-lymfocyty jsou zdrojem imunitní odpovědi, ale i $CD4^+$ T-lymfocyty jsou nedílnou součástí obrany hostitele a pokles jejich počtu koreluje s citlivostí na infekční komplikace HCMV (Sester et al., 2005). Analýza specifičnosti HCMV-specifických $CD4^+$ T-lymfocytů ukázala, že rozpoznají mnoho antigenů a hodně pacientů odpovídá na tyto genové produkty: gB, gH, TRL14, UL16 (Beninga et al., 1995).

$CD4^+$ T-lymfocyty ukazují svou důležitost i ve fázi latence HCMV, kdy pomáhají hostiteli v obraně, tyto buňky pomáhají tvořit specifické protilátky B-lymfocytů (Davignon et al., 1996) a mají svou zásluhu i na narůstajícím počtu HCMV-specifických $CD8^+$ T-lymfocytů (Einsele et al., 2002). Dalším důkazem je snížení virové nálože u pacientů po SCT, při které došlo k přenosu HCMV-specifických $CD4^+$ T-lymfocytů, a dále byl zaznamenán zvyšující se počet HCMV-specifických $CD8^+$ T-lymfocytů (Einsele et al., 2002).

3.3 Únik HCMV imunitnímu systému

Podobně jako jiné viry si HCMV vyvinul velké množství strategií s cílem ubránit se imunitnímu systému hostitele. Hlavní mechanismus úniku je inhibice MHC I komplexů, to znamená omezení prezentace antigenu. HCMV kóduje pět proteinů (kódované geny: US2, US3, US6, US10, US11), které blokují tvorbu a export MHC I komplexů a navozuje rychlé snížení exprese MHC I (Furman et al., 2002). Prezentaci antigenu pomocí MHC II rovněž brání HCMV produkt genu US2, který tyto molekuly cílí na degradaci do proteazomu (Crough and Khanna, 2009).

NK buňky ale rozpoznávají a ničí takové buňky, kterým chybí na povrchu MHC I molekuly, nebo jsou naopak utlumeny při rozpoznání buněk prezentujících své peptidy na HLA E, které jsou v organismu přítomny na tzv. imunologicky privilegovaných tkáních.

Proto si HCMV vyvinul taktiku, jak se uchránit před útokem NK buněk tím, že exprimuje své virem kódované homology MHC I, které napodobují funkci hostitelských proteinů (Mocarski Jr, 2002). Například produkt UL40 genu obsahuje sekvenci, jež je homologní k signálním peptidům, které se váží na povrch HLA E molekul. Navázáním těchto peptidů na HLA E brání infikované buňky aktivaci NK buněk, protože se připojí na jejich inhibiční receptor CD94/NKG2A (Tomasec et al., 2000).

Dalšími mechanismy na vyhnutí se NK buňkám jsou například pp65 inhibice receptoru NKp30, který aktivuje NK buňky (Arnon et al., 2005), nebo produkce UL141 genu, který zprostředkovává blokaci exprese povrchových CD155, které slouží jako ligandy pro receptory k aktivaci NK buněk (Tomasec et al., 2005). HCMV také kóduje homolog (gen UL111a) imunosupresního cytokinu IL-10 (Kotenko et al., 2000), virový TNF receptor (UL144; Benedict et al., 1999) a různé genové produkty (UL36, UL37), které zabrání apoptóze (Goldmacher et al., 1999).

4 Rekonstituce imunitního systému po transplantaci kostní dřeně

Obnova plně funkčního imunitního systému je pomalý proces, zatímco přirozená imunita se rekonstruuje rychle, adaptivní může být postižena ještě léta po transplantaci. Rekonstituce T-lymfocytů se spoléhá na rozšíření zralých T-lymfocytů dárce, proliferace je řízena cytokiny a přítomností allo-reaktivních antigenů. Tento mechanismus může mít za následek různé klinické projevy, může dojít například k reakci štěpu proti hostiteli (GvH).

4.1 Rekonstituce přirozené imunity

Vrozený imunitní systém se skládá z mnoha krevních faktorů a souboru buněk, které rozpoznávají patogen a prezentují antigen. Takovými buňkami jsou NK buňky, neutrofilové, monocytové, dendritické buňky (DCs) a makrofágy. Již měsíc po transplantaci obíhají v krvi NK buňky na normální úrovni a poskytují určitý stupeň ochrany (Achdout et al., 2001)

Stejně jako u NK buněk je obnova neutrofilů a monocytů po transplantaci rychlá, avšak dlouho to trvá u DCs (Achdout et al., 2001). Ty mohou být v krvi detekovány po několika prvních týdnech, ale jejich počet nemusí být na normální hladině ještě více než rok po zákroku (Klanginsirikul et al., 2002).

4.2 Adaptivní imunitní rekonstituce

Na rozdíl od buněk vrozeného imunitního systému trvá tato rekonstituce dlouho, což je způsobeno poruchou diferenciací lymfocytů v thymu. Cirkulující B-lymfocyty nemusí dosáhnout normálních hladin po dobu minimálně roku po transplantaci a rekonstituce T-buněk může trvat i více než 2 roky (Petersen et al., 2003).

4.2.1 B-lymfocyty

B-lymfocyty jsou buňky generované v kostní dřeni z běžných lymfoidních kmenových buněk. B-lymfocyty mají imunoglobulinové receptory, které se vytváří somatickou rekombinací. Naivní zralé B-lymfocyty vycestují z kostní dřeně s povrchovými IgM a IgD receptory a poté migrují do sekundárních lymfatických struktur. Jakmile tyto buňky narazí

na antigen, jsou aktivovány pomocí interakcí s $CD4^+$ T-lymfocyty nebo DCs a dochází k uvolnění IgM. Aktivovaná buňka následně zpracuje antigen pro prezentaci T-lymfocytům, po stimulaci T-lymfocytů produkují B-lymfocyty vysoce avidní IgG, IgA a IgE (Williams and Gress, 2008).

Po alogenní transplantaci krvevorných buněk se rekapituluje vývoj jako při normální ontogenezi, kdy dochází k početnímu růstu B-lymfocytů v batolecím věku a následnému poklesu počtu na úroveň normální u dospělého člověka. V prvních několika měsících po transplantaci je počet B-lymfocytů cirkulujících v organismu velmi malý a asi po 1 – 2 letech se početnost blíží hladinám normálním u novorozenců (Williams and Gress, 2008).

Správná funkce B-lymfocytů je snížena asi 1 – 2 roky po transplantaci. Na počátku se objevují naivní B-lymfocyty a tvorba IgM se u nich objevuje nejdříve až po 2 – 6 měsících (Hajdu et al., 2003). Tvorba IgG dosahuje normálních hodnot kolem 3 – 18. měsíce a IgA rekonstituce může trvat až 3 roky (Williams and Gress, 2008).

4.2.2 T-lymfocyty

Thymus je primárním místem pro vývoj T-lymfocytů, které sem migrují po svém vzniku v kostní dřeni. Thymus opouštějí dvě hlavní populace T-lymfocytů: prekurzor pomocných T-buněk s receptorem CD4 a prekurzor cytotoxických T-buněk s receptorem CD8. Oba prekurzory se po setkání s antigenem na povrchu vhodných buněk prezentujících antigen diferencují na zralé lymfocyty.

IL-7 je cytokin podstatný pro stimulaci naivních T-lymfocytů a k jejich přežití (Fry et al., 2003; Tan et al., 2001). Podobně také IL-15 může působit jako homeostatický cytokin a také zvyšuje proliferaci lidských $CD8^+$ paměťových buněk (Williams and Gress, 2008).

Krátce po transplantaci se zvyšuje hladina IL-7 a IL-15 a v organismu se šíří zbytkové hostitelské a dárcovské T-buňky: diferenciace v thymu je výrazně snížena. Dokonce až 20 let po transplantaci přetrvávají nedostatky $CD4^+$ T-lymfocytů u pacientů s nedostatečnou diferenciací lymfocytů v thymu (Williams and Gress, 2008).

5 Posttransplantační ohrožení života při infekci HCMV

5.1 Význam HCMV při orgánové transplantaci

HCMV je považován za nejvýznamnější infekční patogen u pacientů po transplantaci orgánů (SOT) a je spojován i se snížením přežití štěpu či jeho odmítnutím. Na tom se podílí imunosupresní léčba a také záleží na sérostatutu příjemce (R) a dárce (D) orgánu, zda infekce propukne. U více než 50 % pacientů po SOT byla viditelná HCMV infekce, z nichž se u 10 – 50 % pacientů objevilo symptomatické onemocnění (Rubin, 2007).

Dárci se vyšetřují, zda nesou stopy po infekci HCMV, což vede ke snižování případů infekce u příjemce např. při transplantaci kostní dřeně (Bowden, 1995). Bohužel ale velké množství dárců prodělalo HCMV infekci, to snižuje množství dárců pro séronegativní příjemce a limituje dostupnost vhodných krevních produktů. Avšak i jedinec, který je sérologicky vyšetřen na infekci a má výsledek negativní, mohl infekci prodělat, protože zvolený test nebyl dostatečně citlivý. Citlivější ověření se dá udělat pomocí PCR (Drew et al., 2003).

Největší riziko infekce, vzhledem k absenci hostitelovy specifické imunitní odpovědi proti HCMV, je u kombinace sérologicky negativního pacienta, který obdrží orgán od sérologicky pozitivního jedince (R^-/D^+ ; Limaye et al., 2002). Ideální by bylo, kdyby byli dárce i příjemce séronegativní, ale to je vzhledem k promořenosti populace skoro nemožné. Kromě toho stupeň virové zátěže v transplantovaném orgánu může být úměrný riziku onemocnění HCMV v důsledku velkého množství buněk, které si nesou latentní nebo replikující se virus.

Klinicky akutní HCMV infekce u SOT pacientů se sníženou obranyschopností může být charakterizovaná následujícími symptomy: horečka, leukopenie, malátnost, bolest kloubů, hepatitida, pneumonie, enterokolitida, encefalitida, nefritida, cystitida, myokarditida, nebo pankreatitida (Humar et al., 2006).

5.2 Transplantace hematopoetických kmenových buněk

Dalším typem transplantací jsou alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (allo-SCT). K HCMV infekci dochází častěji kvůli reaktivaci latentního viru

u séropozitivního příjemce, než k primární infekci u séronegativního pacienta (Broers et al., 2000). Primární HCMV infekce se vyvíjí u cca 30 % séronegativních příjemců, zatímco reaktivace se po transplantaci se vyskytuje u 80 % séropozitivních recipientů (Ljungman, 2007). V tuto chvíli ještě není zcela ověřené, jestli záleží na tom, zda je dárce séropozitivní nebo séronegativní. Některé studie ukázaly, že záleží, a některé tuto skutečnost nepotvrdily (Kollman et al., 2001; Ljungman et al., 2003).

Kromě D/R sérologického statutu je riziko HCMV infekce ovlivněno dalšími faktory: věk pacienta, zdroj dárcovských kmenových buněk, rozdíl hlavních lidských antigenů (HLA) mezi D a R, deplece T-lymfocytů nebo anti-T-lymfocytární protilátky, posttransplantační imunosuprese, doba zhojení a reakce štěpu proti hostiteli (Boeckh et al., 2003a).

Během prvních 100 dní po allo-SCT je nejčastější komplikací pneumonitida a enterokolitida (Boeckh et al., 2003a). Naštěstí zavedení antivirové terapie proti HCMV výrazně snížilo výskyt této infekce a dopomohlo k přežití rizikových příjemců (Reusser et al., 2002). K nástupu pozdní HCMV infekce dochází více jak 100 dnů po transplantaci, to se ukázalo jako další ohrožení pacienta na životě (Boeckh et al., 2003b). Pozdní HCMV onemocnění se vyskytuje u 17,8 % pacientů přibližně 169 dnů po transplantaci s úmrtností 46 % (Boeckh et al., 2003a). Pozdní HCMV infekce se vyznačuje zánětem sítnice a encefalitidou, tyto příznaky se mohou vzácně vyskytnout i u v časně infekci HCMV (Boeckh et al., 2003a).

6 Možnosti léčby či utlumení HCMV chemickou a biologickou léčbou

U zdravého jedince je rovnováha mezi HCMV a imunitním systémem, HCMV infekce je asymptomatická, latentní virus je skrytý v buňkách a hostiteli neškodí. Problémy nastávají při oslabení imunity, proto je nutná prevence, nebo léčba cytomegalovirové infekce.

V souvislosti s transplantacemi a HCMV infekcí se používají dva způsoby léčby: profylaktická a preemptivní. Profylaktická léčba je použita u všech pacientů, kteří byli séropozitivní na HCMV před transplantací. Preemptivní léčba se nasazuje pacientům po transplantaci při prvních pozitivních testech na přítomnost viru v organismu.

6.1 Antivirotika – profylaktická léčba

Ganciclovir (GCV) je analog deoxyguanosinu a byl v roce 1988 schválen jako první antivirotikum používané k léčbě a prevenci HCMV (Gilbert and Boivin, 2005). Díky tomuto léku dochází k inhibici replikace virové DNA (Biron et al., 1985). Při profylaktické léčbě je účinný při potlačování infekce, ale neutropenie a zvýšené riziko bakteriální infekce jsou bohužel značným nežádoucím účinkem (Goodrich et al., 1993).

Maribavir je lék, který se váže na protein kinázu UL97 (Sellar and Peggs, 2012) a způsobuje inhibici enkapsidace a uvolnění virionů z jádra (Marty et al., 2011; Winston et al., 2008). Tento lék byl studován jako potenciální adept pro profylaxi, ve 2. fázi klinické studie byly výsledky slibné (Winston et al., 2008), ale později 3. fáze studie ukázala jen mírné antivirové účinky v prevenci reaktivace viru (Marty et al., 2011).

6.2 Antivirotika – preemptivní léčba

Preemptivní léčba je častěji praktikovaná metoda. Jako léčivo se používá Valganciklovir (VGCV), který je velmi rychle hydrolyzován na GCV (Jung and Dorr, 1999) a oba léky mají stejnou účinnost v redukování HCMV infekce po transplantaci (Einsele et al., 2006). Stále je riziko nežádoucích účinků např. neutropenie a méně často odmítnutí štěpu. Virus je schopen i rezistence proti GCV mutací v UL54 nebo UL97 (Braud et al., 2004).

Když dojde ke zjištění rezistence vůči VGCV, může být nasazena jiná efektivní alternativa, Foscarnet (PFA). Tento lék je spojen s nižším počtem pacientů trpících vedlejšími účinky léčby a to rozvojem závažné neutropenie (Reusser et al., 2002). PFA způsobuje stejně jako GCV inhibici replikace (Sellar and Peggs, 2012).

Dalším alternativně užívaným lékem je Cidofovir (CDV), který je ovšem toxický pro ledviny. Lze ho použít jako probenecid, tzn. lék užívaný ke zvýšení koncentrace léčiv v krvi. Komplikací je, že kvůli mutaci ve virové polymeráze může dojít k rezistenci pro PFA a CDV (Scott et al., 2007).

Největší úskalí s vysokým rizikem HCMV infekce a jeho léčby přinášejí pacienti, kteří jsou séropozitivní, avšak štěp dostali od séronegativního dárce, a také pacienti, co obdrželi štěp s deplecí T-lymfocytů. Pro obě skupiny pacientů by byla nejlepší alternativní léčba s nižší toxicitou, aby se zvýšilo procento jejich přežití. Různé studie se snaží vytvořit alternativy k výše zmíněným lékům a snížit jejich toxicitu a další vedlejší účinky.

6.3 Buněčná terapie

Adoptivní buněčná terapie je nejfyziologičtější metodou, jak vyřešit problém s HCMV infekcí. V tuto chvíli je snaha o adoptivní imunoterapii CMV-specifickými cytotoxickými T-lymfocyty (Bao et al., 2012). Mnoho studií však ukazuje, že máme před sebou ještě dlouhý výzkum. Jsme limitováni různými výzkumnými technikami, i když selekční techniky jsou stále dokonalejší. Např. multimerní selekční technologií lze získat zatím pouze cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty a ne CD4⁺ T-lymfocyty, které jsou důležité pro vývoj a udržení imunologické paměti v těle příjemce (Sellar and Peggs, 2012).

I přes problémy s výzkumnými technikami se zdá tato cesta léčby jedinou možnou. Někteří pacienti po transplantaci si proti antivirotikům vyvinuli rezistenci a z důvodu snížené imunity nejsou schopni množení viru potlačit. Dále je buněčná terapie významná z pohledu toxicity léčiv, vzhledem k nežádoucím účinkům antivirotik není vhodné, aby je pacient dlouhodobě užíval, užívání antivirotik totiž významně snižuje dobu přežívání pacientů.

6.4 Profylaktická vakcinace

Vyvinutí efektivní profylaktické vakcíny je opravdovou výzvou. Počáteční vývoj byl směřován na využití atenuované vakcíny (Plotkin et al., 1991). Tento zájem se vyvinul v rozvoj rekombinačních technologií k vytvoření chimérického viru, který by mohl být více imunogenní než původní mateřský virový kmen (Heineman et al., 2006).

Závěr

Lidský cytomegalovirus dokáže být silným protivníkem pro imunitní systém hostitele. Postupem času se objevují nové postupy, jak pomoci těm, kterým HCMV nejvíce škodí např. pacientům po transplantaci SOT nebo SCT. Je snaha o zvýšení přeživších a snížení nemocnosti, kterou HCMV infekce způsobuje.

Vyvíjí se i nové metody a laboratorní techniky, aby mohl výzkum probíhat rychleji a účinněji. Produkují se také nová léčiva, která by ohroženým skupinám mohla pomoci a neměla by takové vedlejší účinky jako ta již existující.

V této práci je shrnut životní cyklus HCMV a interakce viru s imunitním systémem hostitele. Dále se zde nacházejí informace o rekonstituci imunitního systému po transplantaci a odpověď na otázku, proč je HCMV tak nebezpečný pro pacienty po transplantaci.

Seznam použité literatury

Achdout, H., Tiberghien, P., Ferrand, C., Lienard, A., Duperrier, A., Cahn, J.Y., Braud, V., Saas, P., Kuentz, M., Blaise, D., et al. (2001). Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation results in less alteration of early T cell compartment homeostasis than bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 27, 167–175.

Anders, D.G., Kacica, M.A., Pari, G., and Punturieri, S.M. (1992). Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication. *J. Virol.* 66, 3373–3384.

Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., et al. (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* 6, 515–523.

Bao, L., Cowan, M., Dunham, K., Horn, B., McGuirk, J., Gilman, A., and Lucas, K.G. (2012). Adoptive Immunotherapy with CMV Specific Cytotoxic T Lymphocytes for Stem Cell Transplant Patients with Refractory CMV Infections. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 35, 293–298.

Benedict, C.A., Butrovich, K.D., Lurain, N.S., Corbeil, J., Rooney, I., Schneider, P., Tschopp, J., and Ware, C.F. (1999). Cutting Edge: A Novel Viral TNF Receptor Superfamily Member in Virulent Strains of Human Cytomegalovirus. *J. Immunol.* 162, 6967–6970.

Beninga, J., Kropff, B., and Mach, M. (1995). Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *J. Gen. Virol.* 76, 153–160.

Biron, K.K., Stanat, S.C., Sorrell, J.B., Fyfe, J.A., Keller, P.M., Lambe, C.U., and Nelson, D.J. (1985). Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 2473–2477.

Boeckh, M., Nichols, W.G., Papanicolaou, G., Rubin, R., Wingard, J.R., and Zaia, J. (2003a). Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: current status, known challenges, and future strategies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 9, 543–558.

Boeckh, M., Leisenring, W., Riddell, S.R., Bowden, R.A., Huang, M.-L., Myerson, D., Stevens-Ayers, T., Flowers, M.E.D., Cunningham, T., and Corey, L. (2003b). Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* *101*, 407–414.

Bowden, R.A. (1995). Transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *9*, 155–166.

Braud, V., Turrière, C., Diafouka, F., Abraham, B., Lastere, S., and Segondy, M. (2004). Ganciclovir resistance mutations in UL97 and UL54 genes of Human cytomegalovirus isolates resistant to ganciclovir. *Acta Virol.* *48*, 51–55.

Britt, W.J., and Boppana, S. (2004). Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum. Immunol.* *65*, 395–402.

Britt, W.J., Vugler, L., Butfiloski, E.J., and Stephens, E.B. (1990). Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J. Virol.* *64*, 1079–1085.

Broers, A.E.C., Holt, R. van der, Esser, J.W.J. van, Gratama, J.-W., Henzen-Logmans, S., Kuenen-Boumeester, V., Löwenberg, B., and Cornelissen, J.J. (2000). Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* *95*, 2240–2245.

Compton, T., Kurt-Jones, E.A., Boehme, K.W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D.T., and Finberg, R.W. (2003). Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. *J. Virol.* *77*, 4588–4596.

Crough, T., and Khanna, R. (2009). Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 76–98.

Davignon, J.L., Castanie, P., Yorke, J.A., Gautier, N., Clement, D., and Davrinche, C. (1996). Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4⁺ T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro. *J. Virol.* *70*, 2162–2169.

Davison, A.J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D.J., Alcendor, D.J., McGeoch, D.J., and Hayward, G.S. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* *84*, 17–28.

Drew, W.L., Tegtmeier, G., Alter, H.J., Laycock, M.E., Miner, R.C., and Busch, M.P. (2003). Frequency and duration of plasma CMV viremia in seroconverting blood donors and recipients. *Transfusion (Paris)* *43*, 309–313.

Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Löffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H.-G., Kanz, L., et al. (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)–specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* *99*, 3916–3922.

Einsele, H., Reusser, P., Bornhäuser, M., Kalhs, P., Ehninger, G., Hebart, H., Chalandon, Y., Kröger, N., Hertenstein, B., and Rohde, F. (2006). Oral valganciclovir leads to higher exposure to ganciclovir than intravenous ganciclovir in patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* *107*, 3002–3008.

Elkington, R., Walker, S., Crough, T., Menzies, M., Tellam, J., Bharadwaj, M., and Khanna, R. (2003). Ex Vivo Profiling of CD8⁺-T-Cell Responses to Human Cytomegalovirus Reveals Broad and Multispecific Reactivities in Healthy Virus Carriers. *J. Virol.* *77*, 5226–5240.

Fowler, K.B., and Boppana, S.B. (2006). Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J. Clin. Virol.* *35*, 226–231.

Fowler, K.B., Stagno, S., Pass, R.F., Britt, W.J., Boll, T.J., and Alford, C.A. (1992). The Outcome of Congenital Cytomegalovirus Infection in Relation to Maternal Antibody Status. *N. Engl. J. Med.* *326*, 663–667.

Fry, T.J., Moniuszko, M., Creekmore, S., Donohue, S.J., Douek, D.C., Giardina, S., Hecht, T.T., Hill, B.J., Komschlies, K., Tomaszewski, J., et al. (2003). IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates. *Blood* *101*, 2294–2299.

Furman, M.H., Dey, N., Tortorella, D., and Ploegh, H.L. (2002). The Human Cytomegalovirus US10 Gene Product Delays Trafficking of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *J. Virol.* *76*, 11753–11756.

- Gilbert, C., and Boivin, G. (2005). Human Cytomegalovirus Resistance to Antiviral Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 873–883.
- Goldmacher, V.S., Bartle, L.M., Skaletskaya, A., Dionne, C.A., Kedersha, N.L., Vater, C.A., Han, J., Lutz, R.J., Watanabe, S., McFarland, E.D.C., et al. (1999). A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12536–12541.
- Goodrich, J.M., Bowden, R.A., Fisher, L., Keller, C., Schoch, G., and Meyers†, J.D. (1993). Ganciclovir Prophylaxis To Prevent Cytomegalovirus Disease after Allogeneic Marrow Transplant. *Ann. Intern. Med.* 118, 173–178.
- Griffiths, P.D. (2006). CMV as a cofactor enhancing progression of AIDS. *J. Clin. Virol.* 35, 489–492.
- Hajdu, M., Puskás, E., Sipos, A., Barta, A., Pálóczi, K., and Uher, F. (2003). Homogeneous Immunoglobulins following Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Acta Haematol.* 109, 124–128.
- Heineman, T.C., Schleiss, M., Bernstein, D.I., Spaete, R.R., Yan, L., Duke, G., Prichard, M., Wang, Z., Yan, Q., Sharp, M.A., et al. (2006). A Phase 1 Study of 4 Live, Recombinant Human Cytomegalovirus Towne/Toledo Chimeric Vaccines. *J. Infect. Dis.* 193, 1350–1360.
- Humar, A., Michaels, M., and Monitoring, on behalf of the A.I.W.G. on I.D. (2006). American Society of Transplantation Recommendations for Screening, Monitoring and Reporting of Infectious Complications in Immunosuppression Trials in Recipients of Organ Transplantation. *Am. J. Transplant.* 6, 262–274.
- Chen, D.H., Jiang, H., Lee, M., Liu, F., and Zhou, Z.H. (1999). Three-Dimensional Visualization of Tegument/Capsid Interactions in the Intact Human Cytomegalovirus. *Virology* 260, 10–16.
- Isaacson, M.K., and Compton, T. (2009). Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Is Required for Virus Entry and Cell-to-Cell Spread but Not for Virion Attachment, Assembly, or Egress. *J. Virol.* 83, 3891–3903.

- Jacobson, M.A., Maecker, H.T., Orr, P.L., D'Amico, R., Natta, M.V., Li, X.-D., Pollard, R.B., and Bredt, B.M. (2004). Results of a Cytomegalovirus (CMV)-Specific CD8⁺/Interferon- γ ⁺ Cytokine Flow Cytometry Assay Correlate with Clinical Evidence of Protective Immunity in Patients with AIDS with CMV Retinitis. *J. Infect. Dis.* 189, 1362–1373.
- Jenkins, C., Abendroth, A., and Slobedman, B. (2004). A Novel Viral Transcript with Homology to Human Interleukin-10 Is Expressed during Latent Human Cytomegalovirus Infection. *J. Virol.* 78, 1440–1447.
- Jonjić, S., Pavić, I., Polić, B., Crnković, I., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1994). Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J. Exp. Med.* 179, 1713–1717.
- Jung, D., and Dorr, A. (1999). Single-dose pharmacokinetics of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 39, 800–804.
- Kenneson, A., and Cannon, M.J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* 17, 253–276.
- Klangsinsirikul, P., Carter, G.I., Byrne, J.L., Hale, G., and Russell, N.H. (2002). Campath-1G causes rapid depletion of circulating host dendritic cells (DCs) before allogeneic transplantation but does not delay donor DC reconstitution. *Blood* 99, 2586–2591.
- Kollman, C., Howe, C.W.S., Anasetti, C., Antin, J.H., Davies, S.M., Filipovich, A.H., Hegland, J., Kamani, N., Kernan, N.A., King, R., et al. (2001). Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 98, 2043–2051.
- Kotenko, S.V., Saccani, S., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., and Pestka, S. (2000). Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1695–1700.
- Limaye, A.P., Raghu, G., Koelle, D.M., Ferrenberg, J., Huang, M.-J., and Boeckh, M. (2002). High Incidence of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infection among Lung Transplant Recipients Receiving Preemptive Therapy. *J. Infect. Dis.* 185, 20–27.

Ljungman, P. (2007). Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* *20*, 209–217.

Ljungman, P., Brand, R., Einsele, H., Frassoni, F., Niederwieser, D., and Cordonnier, C. (2003). Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood* *102*, 4255–4260.

Malm, G., and Engman, M.-L. (2007). Congenital cytomegalovirus infections. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* *12*, 154–159.

Marty, F.M., Ljungman, P., Papanicolaou, G.A., Winston, D.J., Chemaly, R.F., Strasfeld, L., Young, J.-A.H., Rodriguez, T., Maertens, J., Schmitt, M., et al. (2011). Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Infect. Dis.* *11*, 284–292.

McMahon, T.P., and Anders, D.G. (2002). Interactions between human cytomegalovirus helicase–primase proteins. *Virus Res.* *86*, 39–52.

Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P., and Sinclair, J. (1996). Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34⁺ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.* *77*, 3099–3102.

Mocarski Jr, E.S. (2002). Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol.* *10*, 332–339.

Nigro, G., Adler, S.P., La Torre, R., and Best, A.M. (2005). Passive Immunization during Pregnancy for Congenital Cytomegalovirus Infection. *N. Engl. J. Med.* *353*, 1350–1362.

Palella, F.J., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J., and Holmberg, S.D. (1998). Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* *338*, 853–860.

Pari, G.S., and Anders, D.G. (1993). Eleven loci encoding trans-acting factors are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA replication. *J. Virol.* *67*, 6979–6988.

Paulus, C., Krauss, S., and Nevels, M. (2006). A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3840–3845.

Petersen, S.L., Ryder, L.P., Björk, P., Madsen, H.O., Heilmann, C., Jacobsen, N., Sengeløv, H., and Vindeløv, L.L. (2003). A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leucocyte antigen identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant.* *32*, 65–72.

Plotkin, S.A., Starr, S.E., Friedman, H.M., Brayman, K., Harris, S., Jackson, S., Tustin, N.B., Grossman, R., Dafoe, D., and Barker, C. (1991). Effect of Towne Live Virus Vaccine on Cytomegalovirus Disease after Renal Transplant—A Controlled Trial. *Ann. Intern. Med.* *114*, 525–531.

Prösch, S., Wendt, C.E.C., Reinke, P., Priemer, C., Oppert, M., Krüger, D.H., Volk, H.-D., and Döcke, W.-D. (2000). A Novel Link between Stress and Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection: Sympathetic Hyperactivity Stimulates HCMV Activation. *Virology* *272*, 357–365.

Quinnan, G.V., Kirmani, N., Rook, A.H., Manischewitz, J.F., Jackson, L., Moreschi, G., Santos, G.W., Saral, R., and Burns, W.H. (1982). Cytotoxic T Cells in Cytomegalovirus Infection — HLA-Restricted T-Lymphocyte and Non-T-Lymphocyte Cytotoxic Responses Correlate with Recovery from Cytomegalovirus Infection in Bone-Marrow-Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* *307*, 7–13.

Rasmussen, L., Matkin, C., Spaete, R., Pacht, C., and Merigan, T.C. (1991). Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *J. Infect. Dis.* *164*, 835–842.

Reeves, M.B., MacAry, P.A., Lehner, P.J., Sissons, J.G.P., and Sinclair, J.H. (2005). Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 4140–4145.

Reusser, P., Riddell, S.R., Meyers, J.D., and Greenberg, P.D. (1991). Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern

of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78, 1373–1380.

Reusser, P., Einsele, H., Lee, J., Volin, L., Rovira, M., Engelhard, D., Finke, J., Cordonnier, C., Link, H., and Ljungman, P. (2002). Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation Presented in part at the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, September 1999 (abstract H144). *Blood* 99, 1159–1164.

Rubin, R.H. (2007). The pathogenesis and clinical management of cytomegalovirus infection in the organ transplant recipient: the end of the “silo hypothesis.” *Curr. Opin. Infect. Dis.* 20, 399–407.

Scott, G.M., Weinberg, A., Rawlinson, W.D., and Chou, S. (2007). Multidrug Resistance Conferred by Novel DNA Polymerase Mutations in Human Cytomegalovirus Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 89–94.

Sellar, R.S., and Peggs, K.S. (2012). Therapeutic strategies for the prevention and treatment of cytomegalovirus infection. *Expert Opin. Biol. Ther.* 12, 1161–1172.

Sénéchal, B., Boruchov, A.M., Reagan, J.L., Hart, D.N.J., and Young, J.W. (2004). Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood* 103, 4207–4215.

Sester, U., Gärtner, B.C., Wilkens, H., Schwaab, B., Wössner, R., Kindermann, I., Girndt, M., Meyerhans, A., Mueller-Lantzsch, N., Schäfers, H.-J., et al. (2005). Differences in CMV-Specific T-Cell Levels and Long-Term Susceptibility to CMV Infection after Kidney, Heart and Lung Transplantation. *Am. J. Transplant.* 5, 1483–1489.

Schrier, R.D., Nelson, J.A., and Oldstone, M.B. (1985). Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science* 230, 1048–1051.

Sia, I.G., and Patel, R. (2000). New Strategies for Prevention and Therapy of Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 83–121.

Sinclair, J., and Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 87, 1763–1779.

Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S.H., The, T.H., and Jahn, G. (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J. Gen. Virol.* 76, 741–750.

Sissons, J.G.P., and Carmichael, A.J. (2002). Clinical Aspects and Management of Cytomegalovirus Infection. *J. Infect.* 44, 78–83.

Soderberg, C., Larsson, S., Bergstedt-Lindqvist, S., and Moller, E. (1993). Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 67, 3166–3175.

Stagno S., P.R.F. (1986). Primary cytomegalovirus infection in pregnancy: Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* 256, 1904–1908.

Staras, S.A.S., Dollard, S.C., Radford, K.W., Flanders, W.D., Pass, R.F., and Cannon, M.J. (2006). Seroprevalence of Cytomegalovirus Infection in the United States, 1988–1994. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1143–1151.

Steininger, C., Puchhammer-Stöckl, E., and Popow-Kraupp, T. (2006). Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J. Clin. Virol.* 37, 1–9.

Stinski, M.F. (1978). Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J. Virol.* 26, 686–701.

Tan, J.T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K.I., and Surh, C.D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8732–8737.

Tandon, R., and Mocarski, E.S. (2012). Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends Microbiol.* 20, 392–401.

Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J., and Wilkinson, G.W.G. (2000). Surface

Expression of HLA-E, an Inhibitor of Natural Killer Cells, Enhanced by Human Cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287, 1031–1033.

Tomasec, P., Wang, E.C.Y., Davison, A.J., Vojtesek, B., Armstrong, M., Griffin, C., McSharry, B.P., Morris, R.J., Llewellyn-Lacey, S., Rickards, C., et al. (2005). Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. *Nat. Immunol.* 6, 181–188.

Varnum, S.M., Streblow, D.N., Monroe, M.E., Smith, P., Auberry, K.J., Paša-Tolić, L., Wang, D., Camp, D.G., Rodland, K., Wiley, S., et al. (2004). Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: the HCMV Proteome. *J. Virol.* 78, 10960–10966.

Venema, H., van den Berg, A.P., van Zanten, C., van Son, W.J., van der Giessen, M., and The, T.H. (1994). Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.* 42, 188–192.

Williams, K.M., and Gress, R.E. (2008). Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 21, 579–596.

Winston, D.J., Young, J.-A.H., Pullarkat, V., Papanicolaou, G.A., Vij, R., Vance, E., Alangaden, G.J., Chemaly, R.F., Petersen, F., Chao, N., et al. (2008). Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant recipients: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Blood* 111, 5403–5410.