

# 1. Streszczenie

## Wstęp

Allogeniczny przeszczep komórek hematopoetycznych (allo-HSCT) jest szeroko stosowaną metodą terapeutyczną w przypadku wielu chorób. U dzieci, allo-HSCT przeprowadza się najczęściej w chorobach nowotworowych, jak białaczki, ale również w chorobach nienowotworowych, jak wrodzone niedobory odporności lub choroby metaboliczne. Postęp medycyny, który dokonał się w ciągu 50-letniej historii przeszczepiania komórek hematopoetycznych, doprowadził zarówno do poprawy bezpieczeństwa, zwiększenia skuteczności, a także ograniczenia skutków ubocznych i powikłań powstałych w trakcie terapii. Pomimo tego, nadal wyzwaniem pozostają powikłania w postaci oportunistycznych infekcji wirusowych oraz choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD), znacząco wpływające na śmiertelność okołoprzeszczepową.

Jednym z elementów postępowania w trakcie allo-HSCT jest monitorowanie i w razie konieczności modyfikowanie przebiegu odnowy immunologicznej, zwłaszcza w układzie limfocytów T i komórek NK. W początkowym okresie po przeszczepie główną rolę układu immunologicznego pełni odporność wrodzona. Jej skuteczność wynika m.in. z możliwości rozpoznawania utrwalonych ewolucyjnie struktur molekularnych (PAMP), obecnych we wszystkich rodzajach patogenów. Za rozpoznawanie tych wzorców odpowiadają receptory, wśród których najważniejszą grupę stanowią receptory TLR, które po związaniu liganda, uruchamiają kaskadę sygnałową prowadzącą do reakcji odpornościowej.

Związki pomiędzy działaniem receptorów TLR w komórkach układu immunologicznego, a ochroną przeciwwirusową lub patogenezą GvHD u pacjentów poddanych allo-HSCT są słabo poznane. Dotychczasowe badania, opierające się na określeniu wzorca ekspresji TLRów lub ich zmienności genetycznej (polimorfizmy SNP), pozwalają przypuszczać, że istnieje taka zależność.

## Cel pracy

Celem pracy było ustalenie wzorca ekspresji receptorów TLR2/3/4/7/8/9 w limfocytach T i komórkach NK u dzieci po allo-HSCT, a także określenie, czy istnieje zależność pomiędzy występowaniem poszczególnych receptorów TLR w tych komórkach, a

zapadalnością na infekcje wirusowe pacjentów z grupy badanej. Dodatkowo, podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy istnieje korelacja pomiędzy ekspresją TLR, a występowaniem choroby GvHD u pacjentów po przeszczepie allogenicznym. Ostatnim badanym zagadnieniem było zweryfikowanie, czy u badanych pacjentów istnieje korelacja pomiędzy wybranymi wariantami polimorficznymi w obrębie genów kodujących receptory TLR, a zapadalnością na infekcje wirusowe.

### Materiały i metody

Badania mające na celu ustalenie wzorca ekspresji receptorów TLR w trakcie odnowy immunologicznej oraz w przebiegu infekcji wirusowych prowadzono prospektywnie przy wykorzystaniu cytofluorymetrii przepływowej w grupie 55 dzieci poddanych zabiegowi allo-HSCT w Klinice w latach 2016-2017. W 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 270 i 365 dniu po przeszczepie wykonywano ocenę odnowy limfocytarnej w zakresie limfocytów T i komórek NK pochodzących z krwi obwodowej oraz ekspresji receptorów TLR w tych komórkach.

Polimorfizmy SNP dla genów kodujących TLR oznaczono retrospektywnie, metodą Real Time-PCR z wykorzystaniem specyficznych, znakowanych fluorescencyjnie sond nukleotydowych u 92 dzieci poddanych allo-HSCT w Klinice w latach 2014-2017.

### Wyniki

W trakcie całego okresu obserwacyjnego u pacjentów po allo-HSCT potwierdzono ekspresję wszystkich badanych receptorów TLR, zarówno w limfocytach T, jak i komórkach NK. Limfocyty T wykazywały dziesięciokrotnie wyższą ekspresję TLR w porównaniu do komórek NK.

Częstość ekspresji receptorów TLR w limfocytach T i komórkach NK zmieniała się w ciągu całego okresu obserwacji, zmiany te były istotne statystycznie. Na liczbę odnawiających się limfocytów T oraz obecnych na nich receptorów TLR wpływ miało zastosowanie globuliny antytymocytarnej w kondycjonowaniu. Efektu tego nie obserwowano w przypadku komórek NK. Pochodzenie materiału przeszczepowego (komórki krwi obwodowej lub szpik kostny) nie miało wpływu na odnowę limfocytarną, ani na częstość występowania TLRów w limfocytach T i komórkach NK.

Częstość ekspresji receptora TLR2 była istotnie wyższa u pacjentów wolnych od zakażeń adenowirusowych (ADV), w porównaniu z grupą wykazującą replikację tego wirusa.

Obserwowano również istotną statystycznie, słabą korelację ujemną pomiędzy ekspresją TLR7, a wiramią i wirurią wirusów polyoma BK (BKV). W przypadku pozostałych badanych receptorów nie obserwowano istotnych zależności pomiędzy ekspresją TLR, a zapadalnością na infekcje wirusowe.

U pacjentów, wśród których wystąpiła choroba GvHD obserwowano istotnie wyższą ekspresję receptorów TLR4 i TLR9 w limfocytach T i komórkach NK.

Badania zmienności genetycznej w obrębie genów kodujących receptory TLR wykazały, że obecność wariantów G w miejscu A1G (rs3764880) oraz G-129C (rs3764879) dla genu TLR8, jest związana ze zwiększoną zapadalnością na infekcje CMV i ADV w obserwowanej grupie pacjentów.

### Wnioski

1. Zróżnicowana i zmienna w czasie ekspresja poszczególnych receptorów TLR w układzie limfocytów T i komórek NK jest elementem rekonstrukcji immunologicznej oraz wskazuje w okresie poprzyszczepowym na zmienną wrażliwość układu odpornościowego na aktywujące go antygeny, w tym niespecyficzne struktury PAMP.
2. Ekspresja receptorów TLR na komórkach układu odpornościowego po allo-HSCT stanowi element mechanizmów obronnych przed infekcjami, w tym ADV (TLR2) oraz BKV (TLR7).
3. Ekspresja receptorów TLR (TLR4 i TLR9) może zwiększać ryzyko wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi w mechanizmie wrażliwości na niespecyficzną aktywację układu odpornościowego przez antygeny zawierające struktury PAMP.
4. Polimorfizmy genetyczne osłabiające funkcję receptorów TLR (A1G oraz G-129C obniżające ekspresję TLR8) wiążą się ze zwiększoną zapadalnością na infekcje oportunistyczne (CMV i ADV), ale nie mają wpływu na wystąpienie i nasilenie objawów aGvHD.

## 2. Abstract

### Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a widely used therapeutic option for many diseases. In children allo-HSCT is most often performed in malignant diseases such as leukaemia but also in non-malignant diseases such as congenital immunodeficiencies or metabolic diseases. Advances in medicine over the 50-year history of HSCT have led both to improved safety, efficacy and to reduction in adverse events and complications during therapy. Despite this, opportunistic viral infections and graft versus host disease (GvHD), significantly affecting transplant related mortality still remain a challenge.

An important element of the allo-HSCT procedure is monitoring and if necessary modifying the course of immune reconstitution (IR), especially of the T-lymphocytes and NK cells. In the initial phase after transplantation, innate immunity plays an essential role in the immune system. The effectiveness of innate immunity results from the ability to recognize evolutionary conserved molecular structures (pathogen associated molecular patterns, PAMP) presents in all types of pathogens. The toll-like receptors (TLR) are the most important receptor group responsible for recognition of these patterns. Expressed on different cells, TLR receptors after ligand binding trigger a signalling cascade leading to the activation of an immunological response.

The relationship between the activity of TLR receptors in the cells of the immune system and the antiviral immunity or GvHD pathogenesis in patients undergoing allo-HSCT are poorly understood. Published studies, based on the TLRs expression pattern analysis or their genetic variability (single nucleotide polymorphisms, SNP polymorphisms) suggest such connections.

### The aim of this study

The aim of the study was to determine the expression pattern of TLR2/3/4/7/8/9 receptors in T lymphocytes and NK cells in children after allo-HSCT, as well as to determine whether there is a relationship between the presence of TLR receptors in these cells and the incidence of viral infections in the study group. Additionally, a correlation between TLR expression and the GvHD incidence in paediatric patients after allogeneic transplantation was

studied. The last issue was to analyse an association between the selected polymorphic variants within the genes encoding TLR receptors and the incidence of viral infections.

### Materials and methods

To determine the expression pattern of TLR receptors during IR and in the course of viral infections, flow cytofluorimetric analysis was prospectively conducted in a group of 55 children who underwent allo-HSCT in 2016-2017. On 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 270 and 365 days after transplantation, lymphocytic reconstitution and expression of TLR receptors were assessed in T lymphocytes and NK cells isolated from peripheral blood.

SNP polymorphisms for TLR-encoding genes were determined retrospectively, using the Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method with specific fluorescently labelled nucleotide probes in the group of 92 children who underwent allo-HSCT at the Clinic in 2014-2017.

### Results

Throughout the observation period, the expression of all tested TLRs was confirmed in patients after allo-HSCT, both in T-lymphocytes and NK cells. T lymphocytes showed ten times higher TLR expression compared to NK cells.

The expression frequency of TLR receptors in T lymphocytes and NK cells was changing throughout the observation period, and these differences were statistically significant. The conditioning with anti-thymocytic globulin decreased the number of produced T lymphocytes and the TLRs expression on them, but not to the NK cells. The origin of the graft material (peripheral blood cells or bone marrow) did not affect the lymphocytic reconstitution or the expression of TLRs in T lymphocytes and NK cells.

The TLR2 expression was significantly higher in adenovirus (ADV)-free patients compared to the group showing ADV replication. A statistically significant, weak negative correlation was also observed between TLR7 expression and polyoma BK viruses (BKV) viremia or viruria. No statistically significant correlation was observed between other TLR expression and viral infection incidence.

Significantly higher expression of TLR4 and TLR9 receptors in T lymphocytes and NK cells, respectively, was observed in patients with GvHD.

Polymorphism studies in the genes encoding TLR receptors have shown that the presence of G variants in the A1G (rs3764880) and G-129C (rs3764879) sites for the TLR8 gene is associated with an increased incidence of CMV and ADV infections in the studied patients.

### Conclusions

1. The differential and time-changing expression of TLRs in the T lymphocyte and NK cells is an element of IR. In the post-transplant period, these changes indicate variable sensitivity of the immune system to unspecific antigens like PAMPs.
2. Expression of TLR receptors on the cells of the immune system after allo-HSCT is an element of defence mechanisms against viral infections, including ADV (TLR2) and BKV (TLR7).
3. Expression of TLR receptors (TLR4 and TLR9) may increase the risk of GvHD through the mechanism of non-specific activation of the immune system by antigens containing PAMP structures.
4. Genetic polymorphisms impairing the function of TLR receptors (A1G and G-129C lowering TLR8 expression) are associated with an increased incidence of opportunistic infections (CMV and ADV) but they do not influence the incidence or severity of aGvHD.