

Autoimmunity and effect of ageing

Citation for published version (APA):

Crisi, G. M. (1999). *Autoimmunity and effect of ageing*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19990129gc>

Document status and date:

Published: 01/01/1999

DOI:

[10.26481/dis.19990129gc](https://doi.org/10.26481/dis.19990129gc)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Thesis summary

A lack of anti-self T and/or B cell reactivity or “self-tolerance” in the normal adult may be the result of clonal deletion, clonal anergy or peripheral suppression. Disregulation of these processes can be secondary to thymic involution, lack of appropriate cell-to-cell contact, and/or decreased immunoregulatory function of the lymphoid cells.

The aim of this study is to identify mechanisms at play in the ageing immune system that may lead to autoimmunity. In chapter 2, *in vitro* work on T-B cell interaction in the ageing human is presented. The model used is a pokeweed mitogen (PWM) induced, T-cell-mediated suppression of Ig-secreting cell (ISC) formation by *Staphylococcus aureus* and IL-2. Unlike CD8⁺ T cells from young individuals, CD8⁺ T cells from aged individuals lack this immunoregulatory activity on autologous T-independently activated B cells. Dimaprit, a histamine type 2 receptor agonist, and intracellular cAMP raising agents, induce a similar T-cell mediated suppression of ISC formation in cells from young but not from aged individuals. Evaluation for an intracellular defect showed no age related decrease in cAMP upregulation by forskolin or dimaprit in peripheral blood T cells. TGF- β is shown to play a role in mediating the suppressive effect of T cells on the ISC response in this model. PWM-activated T cells from young individuals show a significant increase in mRNA for TGF- β , while T cells from aged individuals do not. This suggests that the decrease in immunoregulatory activity in peripheral blood from the elderly may partially be due to a decrease in TGF- β production by certain activated T cell subset(s).

Ageing is associated with a change in the immune responses and an increase in autoimmune reactivity. In chapter 3 we turned to animal models to investigate whether potential self-reactive T cells appear in aged animals and if so, to address the likely origin of these cells. Antibodies to the β chain of the T cell receptor were used to identify the presence of T cells bearing potentially self-reactive TCR in the peripheral lymphoid tissues and blood of young, aged, and aged thymectomized (at 4-6 month of age; TX) mice. The study shows that obvious escape from the normal thymic deletion is seen only in very old (30 to 36 month old) euthymic mice. Responsiveness of forbidden T cells to anti-V β stimulation was detectable in 20-to-24 month old mice and particularly in aged TX mice, as compared to young mice. Therefore it seems most likely that the functionally responding “forbidden” T cells in the 20-to-24 month old mice are not of recent thymic origin.

Not all auto-antigens are presented within the thymus, such that self-reactive T cells can be released to the periphery and only then encounter for the first time the self-antigen. In such cases autoimmune responses can be induced and anti-self tolerance may be manipulated. In chapter 4 different mechanisms to prevent autoimmune disease in animals are studied. Resistance to experimental allergic encephalomyelitis (EAE) induction by homogenized myelin (MSCH) in complete adjuvant and pertussigen in SJL mice is obtained one week after intravenous injection of PLP 139-151 coupled to spleen cells. Immunoregulation is a mechanism which is important in this form of resistance as tolerance can be induced by transferring spleen cells enriched for CD8⁺ T cells. Anergy is probably the main mechanism in inducing this resistance to EAE induction

because administration of IL-2 can reverse the tolerance, but only when given starting three days after the PLP-coupled spleen cells. Changes in the cytokine profile of the response to antigen is an important aspect of the tolerance induced by antigen-coupled spleen cells. Immunomodulation by cytokines that affect the Th1/Th2 cell ratio shows that short (1-2 weeks) daily pretreatment with IL-2 or TGF- β 2 slightly decreases the susceptibility to subsequent EAE induction. IL-4 has only an effect if administered for a long period of time (8 weeks) prior to immunization, while IL-10 and IL-12 have no effect under these conditions. When administered after immunization with MSCH (day 0), TGF- β 2 protects against development of EAE when given on days 5-9 after immunization, IL-4 protects when given specifically on days 0-4 and less so when given later or for a prolonged period of time. IL-12 significantly increases the severity and mortality of EAE when given on days 0-4, while IL-10 has no effect under these conditions. Thus, it appears that the severity of EAE can be altered through the promotion of Th2 or Th1 cell development during the immune response to encephalitogenic auto-antigen by IL-4 and IL-12, respectively.

Autoimmune diseases may present clinically with spontaneous remissions and relapses. As presented in chapter 5, the superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB) can induce relapses in 50% of animals that have partially or completely recovered from acute EAE. This capacity of SEB is presumably a result of reactivation of myelin reactive and SEB responsive T cells, which vary according to the mouse strain used. TNF- α also induces EAE relapses in recovered mice. IL-10 and TGF- β lower the incidence of EAE relapses when given simultaneously with TNF- α or SEB, respectively. In this model, it appears that endogenous IL-10 limits the susceptibility to induction of EAE relapses, as anti-IL-10 increases both the incidence and severity of such relapses.

Conclusions

These studies suggest that in the Th1 cell mediated organ specific form of autoimmunity studied here, EAE, protective effects may be obtained by IL-4, IL-10 and TGF- β depending on the temporal relationship between the administration of the cytokine and the induction of the autoimmune disease. IL-4 has to be given early during induction to be effective, TGF- β during development of lesions, and IL-10 may prevent TNF- α induced as well as spontaneous relapses.

Two reasons for deregulation of B cell activation in aged subjects were uncovered: Firstly, while no evidence was found that "forbidden" anti-self reactive CD4⁺ T cells escaped from the thymus, some anti-self responsive CD4⁺ cells, probably of extrathymic origin, did appear in the periphery of aged mice. Such cells could potentially promote syngeneic B cell activation. Secondly, it was found that defective production of TGF- β by T cells from aged individuals may play a role in the loss of B cell suppression by autologous PWM activated CD8⁺ T cells.

Future prospects

The interesting effect of TGF- β on autoimmunity and, in particular, the role of TGF- β production by T cells themselves, needs to be explored in more detail.

Samenvatting

In de gezonde volwassene wordt de afwezigheid van T of B lymfocyt reactiviteit tegen zelfantigenen, c.q. "zelftolerantie", toegeschreven aan clonale vernietiging, clonale anergie of perifere onderdrukking. Involutie van de thymus, onvoldoende dan wel onjuiste cel-cel interactie, en/of een verminderde immunoregulatorische functie van lymfocyten kan één of meer van bovenbeschreven mechanismen, die ter grondslag liggen aan zelftolerantie, beïnvloeden waarna autoimmuniteit kan ontstaan.

De opzet van deze dissertatie was om in de ouder wordende mens, en in het muis proefdier model, processen te identificeren die een rol spelen in autoimmuniteit.

Hoofdstuk 2 is een studie die de T-B lymfocyt interactie van het verouderende immuunsysteem van de mens analyseert in een *in vitro* model waarbij B lymfocyten van jonge of oudere mensen op een T lymfocyt onafhankelijke wijze worden geactiveerd door hen te kweken met staphylococcus aureus en interleukine 2; hierdoor ontstaan immunoglobuline uitscheidende B cellen ("ISC"). Aan dit kweekstelsel worden T cellen toegevoegd al of niet gestimuleerd met "Pokeweed Mitogen" (PMW) een extract uit Noord Amerikaanse kruiden, dat immunoregulatorische activiteit in CD8 T cellen genereert en waarvan bekend is dat het de "ISC" onderdrukt. In tegenstelling tot CD8 T cellen van jonge mensen, missen de CD8⁺ T cellen van ouderen het immunoregulatorische effect op de ISC differentiatie. Een histamine type 2 receptor agonist die tevens de intracellulaire concentratie van cAMP verhoogd, nl. "Dimaprit", induceert eveneens een T cel veroorzaakte onderdrukking van "ISC" formatie in jonge maar niet in oude mensen. Deze verschillen tussen jong en oud kunnen niet verklaard worden door een leeftijdsafhankelijke afname van het vermogen van perifere bloedlymfocyten om intracellulair cAMP aan te maken. Van "transforming growth factor β " (TGF- β) kon echter wel aangetoond worden dat het een rol speelt, nl. (mede)verantwoordelijk voor het onderdrukkende effect van T cellen op de ISC activatie, in bovenbeschreven *in vitro* model. Immers "PWM" geactiveerde T cellen van jonge, maar niet van oudere mensen, vertoonden significante toename van boodschapper RNA ("mRNA") voor TGF- β . Deze bevindingen suggereren dat de afname van immunoregulatorische (T) cel activiteit bij de oudere mens een gevolg zou kunnen zijn van de afname van TGF- β productie in bepaalde geactiveerde T cellen. Veroudering gaat enerzijds samen met veranderingen in immuunreactiviteit (zie boven) en anderzijds met een toename van autoimmunereacties.

In hoofdstuk 3 beschreven wij dierexperimenteel onderzoek waarbij de vraag werd gesteld of (in potentie) autoreactieve T cellen aantoonbaar zijn bij oudere muizen; en zo ja wat was dan de herkomst van deze cellen. De proefopzet berust op het gegeven dat van antilichamen gericht tegen het variabele deel (V β regio) van de T lymfocyt receptor (TCR) gebruik kan worden gemaakt om dit T cel repertoire te toetsen, inbegrepen die TCR receptoren dragende cellen die normaliter door de thymus vernietigd worden omdat zij een interactie kunnen aangaan met zelfantigenen. Deze worden derhalve normaliter niet in het perifere bloed en lymfoïde weefsel aangetroffen.

Met deze antilichamen, gericht tegen “verboden” TCR (nl. antizelf) receptor, werd vervolgens nagegaan bij jonge als ook bij oude muizen zonder of na voorafgaande verwijdering van de thymus bij een leeftijd van 4 tot 6 maanden, of zulke autoreactieve T cellen aantoonbaar waren. Bij jonge muizen waren ze niet aantoonbaar. Twee jaar oude muizen, met name na voorafgaande thymectomie, lieten soms wel zulke autoreactieve cellen in de periferie zien die bovendien geactiveerd konden worden (deling) wanneer hun lymfocyten in kweek werden gebracht met bovenbeschreven antilichamen. Driejarige muizen vertoonden meer autoreactieve T cellen in de periferie vergeleken met tweejarige muizen. De slotsom van deze experimenten is dat de autoreactieve T cellen aantoonbaar in tweejarige muizen niet “recent” vanuit de thymus naar de periferie zijn gemigreerd.

Aangezien niet alle autoantigenen in de thymus aanwezig zijn volgt daaruit dat bepaalde autoreactieve T cellen niet door de thymus kunnen worden geëlimineerd en worden doorgelaten naar de periferie waar zij dan een autoantigeen (voor het eerst) kunnen ontmoeten. Dit impliceert dat autoimmuunziekten kunnen worden opgewekt en tolerantie tegen zelf kan worden gemanipuleerd zoals beschreven wordt in Hoofdstuk 4. In dit hoofdstuk worden verschillende manieren beschreven om autoimmuunziekten te verhinderen in het dierexperimentele model van de “experimentele allergische encephalomyelitis” (EAE). In dit model - wat wel als proefdier equivalent voor multiple sclerose wordt gebruikt - worden muizen geïmmuniseerd met “ruggemerg” specifieke antigenen zoals “Myelin Basic Protein” (MBP) en proteolipide eiwit (PLP) in een emulsie van Freund Compleet Adjuvans wat bestaat uit oliën met gedode mycobacteriën. Na immunisatie van antigeen in deze emulsie worden autoreactieve CD4 T cellen geactiveerd die vervolgens een immunologische ontstekingsreactie veroorzaken in hersenen en ruggemerg. In het werk beschreven in hoofdstuk 4 werd nagegaan of muizen beschermd konden worden tegen EAE op de volgende manier. EAE werd opgewekt door muizen te immuniseren met een ruggemerg homogenaat of PLP in Freund Compleet Adjuvans; na 1 à 2 dagen werd nog een additioneel adjuvans (nl. een eiwit extract van Bordetella Pertussis) intraveneus toegediend om de immuunrespons te verhogen: zulke muizen krijgen na 10 tot 15 dagen EAE. Wanneer nu het antigeen (PLP) gekoppeld wordt aan miltcellen en 1 week vóór bovenstaande immunisaties intraveneus wordt toegediend krijgen zij geen EAE - noch jonge noch oude muizen - d.w.z. zij zijn tolerant of resistent geworden. Deze resistentie kan worden overgebracht op andere muizen door het overbrengen van CD8⁺ T cellen. Waarschijnlijk is T cel anergie het voornaamste mechanisme hier omdat toediening van interleukine 2 de PLP-milt cel geïnduceerde tolerantie te niet doet mits het 3 dagen na toediening van de PLP-milt cel suspensie wordt gegeven. Een tweede manier om resistentie tegen EAE op te wekken bestaat uit het veranderen van de balans tussen T helper 1 / T helper 2 cellen (Th1/Th2), die verscheidene cytokines produceren o.a. interleukine 4 en 10 (Th2) en interleukine 2, tumor necrosis factor en interferon γ (Th1). Vóórbehandeling met interleukine 2 of TGF- β 2 14 dagen lang vóór het opwekken van EAE geeft een geringe afname aan het proefdier voor het ontwikkelen van EAE; interleukine 10 (remt de productie van Interferon γ) en interleukine 12 toediening heeft geen effect; interleukine 4 toediening wel, mits 8 weken lang toegediend vóór de immunisatie. Indien toegediend na de immunisatie, beschermt TGF- β tegen EAE mits toegediend op dag 5 tot 9 na de immunisatie, en interleukine 4 wanneer toegediend op de dag van de immunisatie en de daarop volgende 4 dagen. Interleukine 12 wat de Th helper 1 response (en Interferon γ productie) stimuleert verergert de

ernst van de EAE wanneer toegediend op de dag van de immunisatie en de eerstvolgende 4 dagen; onder deze omstandigheden heeft interleukine 10 geen effect. Kortom toediening van deze cytokines vóór immunisatie heeft een gering effect maar behoeft de aanwezigheid van autoreactieve T cellen opgewekt door de immunisatie; de paradoxale effecten van IL4 (Th2 produkt) en interleukine 12 (bevordert Th1) suggereren dat (modulatie van) de Th1/Th2 "balans" de ernst van de EAE bepaalt. Autoimmuun ziekten, waaronder multiple sclerose, worden klinisch gekarakteriseerd door spontane remissies en rechutes. De wijze waarop dit gebeurt is niet bekend en onderwerp van discussie waarbij onder meer is gesuggereerd dat het superantigeen Staphilococcus enterotoxine B (SEB) een rechute autoimmuun ziekte kan veroorzaken door stimulatie van autoreactieve T cellen. Deze hypothese werd getoetst door na te gaan of toediening van SEB aan muizen die een partiële dan wel complete remissie hadden van EAE een rechute opwekt. Hierbij werd gevonden dat in 50% van de (SJL) muizen SEB een milde rechute EAE kon opwekken wanneer toegediend 1 à 2 maanden na remissie van EAE; tenminste één van de V β /TCR's die proteolipide (PLP) herkennen in deze muizen reageert ook met SEB. Het vermogen van SEB om een rechute op te wekken blijkt derhalve bepaald door het vermogen autoreactieve T cellen tegen PLP (of MBP) te reactiveren. Tumor necrosis factor α (TNF α) toegediend aan muizen in remissie van EAE veroorzaakte eveneens een rechute. Toediening van IL10 verminderde de frequentie van rechutes van EAE na toediening van TNF α en toediening van TGF β verminderde SEB geïnduceerde rechutes. Tenslotte bleek dat endogeen IL10 de gevoeligheid voor rechutes van EAE verminderde omdat na toediening van antilichamen tegen IL10 zowel de frequentie als de ernst van de rechutes toenam.

Conclusies

Deze studie toont aan dat in het Th1 model van autoimmunitet, nl. EAE, IL4, IL10 en TGF β beschermend werken en dat deze bescherming afhangt van het tijdstip van toedienen in relatie tot de inductie van EAE. IL4 moet vroeg na inductie worden gegeven, TGF β moet worden toegediend tijdens de effector fase wanneer de lesies zich ontwikkelen, en IL10 kan TNF α geluxeerde dan wel spontane rechutes verhinderen.

Twee oorzaken voor ontregelde B cel activiteit werden aangetoond bij veroudering. Hoewel er geen ontsnapping van "verboden" antizelf reactieve T cellen uit de thymus aantoonbaar was bleken antizelf reactieve CD4 T cellen aantoonbaar in de periferie van de oudere muizen; deze cellen lijken van extrathymale oorsprong. Zulke cellen kunnen in theorie syngene B cel activatie veroorzaken. Een tweede observatie was dat deficiënte productie van TGF β door T cellen van oudere mensen een rol kan spelen in het verlies van B cel suppressie door autologe, door PWM geactiveerde, CD8⁺ T cellen.

Toekomst

De rol van TGF β bij autoimmuun ziekten, in het bijzonder de rol van TGF β productie door T cellen verdient nader onderzocht te worden.