



Doctoral Thesis

Dissecting the role of T helper cells in autoimmune myocarditis

Author(s):

Nindl, Veronika

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007300489> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH Nr. 19718

**DISSECTING THE ROLE OF T HELPER CELLS
IN AUTOIMMUNE MYOCARDITIS**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels

DOKTORIN DER WISSENSCHAFTEN

der
ETH ZÜRICH

vorgelegt von
VERONIKA NINDL

Mag.Biol.
Leopold-Franzens-Universität Innsbruck

geboren am 04.06.1983

von Österreich

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Manfred Kopf

Prof. Dr. Burkhard Ludewig

Prof. Dr. Salomé Leibundgut

2011

1 Summary

Inflammatory heart diseases such as myocarditis and dilated cardiomyopathy (DCM) are a frequent cause of mortality in humans with DCM being the most common reason for heart failure in young adults. Viral infections can trigger an acute inflammation of the heart muscle which is followed by an autoimmune response against cardiac autoantigens. The chronic inflammation of the heart muscle can lead to death of cardiomyocytes, fibrotic transformation of the myocardium, and eventually to DCM. Since myocarditis is still difficult to diagnose it is important to study the underlying autoimmune processes uncoupled from various exogenous factors. Furthermore, the involvement of different T helper (Th) cell subsets and cytokines in the initiation of autoimmune myocarditis and in the progression to DCM is still ill-defined, mainly due to the lack of appropriate tools. To fill this analytical gap, we have generated a T cell receptor (TCR) transgenic mouse recognizing the immunodominant epitope of the cardiac myosin heavy chain alpha (myhca₆₁₄₋₆₂₉).

In the first part of the presented work we characterized this novel animal model of spontaneous autoimmune myocarditis and assessed the impact of cytokines on disease pathogenesis. In TCR-M mice, over 95% of peripheral CD4⁺ T cells expressed the functional transgenic TCR, proliferated and developed into effector cells following stimulation with the myhca₆₁₄₋₆₂₉ peptide. Most importantly, TCR-M mice developed spontaneous autoimmune myocarditis with a prevalence of 100%. The acute cardiac disease in TCR-M mice is characterized by severe infiltration with Th1/Th17-polarized Th cells. Following restimulation with the myhca peptide, heart-resident T cells produced massive amounts of IFN- γ and modest levels of IL-17. Moreover, above 50% of all TCR-M mice developed DCM around the age of 3 months characterized by enlargement of the heart ventricle, fibrosis of heart tissue and thinning of the muscle wall. To evaluate the impact of IL-6, IL-17A and interferon γ receptor (IFN- γ R) on disease induction and progression, TCR-M mice were crossed on cytokine deficient backgrounds. We observed that the lack of IL-17A was dispensable for myocarditis induction but derogated DCM, indicating a crucial role in the remodelling of the

Summary

heart. Deficiency of IL-6 tempered disease outcome significantly thus, confirming a crucial role of IL-6 in heart diseases. Most importantly, genetic ablation of IFN- γ R substantially weakened myocarditis and increased survival of TCR-M mice, thus underlining the pathogenic role of IFN- γ in autoimmune myocarditis. Overall, this novel model of spontaneous autoimmune myocarditis and DCM provides not only the possibility to analyze with highest resolution the contribution of Th cell subsets and Th cell-derived cytokines, but permits as well to study mechanisms underlying autoimmune diseases in general.

In the second part of the thesis we aimed to study central tolerance mechanisms in context of a natural occurring autoantigen, the myosin alpha chain. During negative selection, two mechanisms limit autoreactivity before naïve T cells enter the peripheral T cell pool, i.e. clonal deletion and differentiation into regulatory T (Treg) cells. However, the detailed contribution of thymic antigen presenting cells (APCs) in tolerance induction to tissue restricted antigens has remained elusive. Since the myhca protein is not expressed in medullary thymic epithelial cells (mTECs), we have generated a knock-in mouse by introducing the myhca peptide into the ROSA locus. Due to a cre-loxP system, the expression of the myhca peptide in context of major histocompatibility complex (MHC) class II can be directed to dendritic cells (DCs), B cells or thymic epithelial cell (TECs) subsets. By using the TCR-M mouse we are able to assess the impact of myhca presentation by thymic APCs on the mechanisms of negative selection of antigen-specific T cells. Analysis of mice expressing the myhca₆₁₄₋₆₂₉ on all thymic MHC class II positive cells revealed substantial negative selection of antigen-specific T cells reflected by reduced numbers of double positive (DP) and CD4 single positive (SP) T cells in the thymus. Furthermore, the frequency of FoxP3⁺ Treg cells was significantly increased in these mice. Likewise, directing the myhca peptide expression exclusively to DCs or B cells induced extensive negative selection of myhca-specific thymocytes, though to a lesser extent compared to the pan-MHCII situation. Furthermore, the conversion of autoreactive CD4⁺ T cells into Treg cells was significantly reduced in mice expressing the autoantigen solely on thymic DCs or B cells. So far we can conclude that re-expression of a naturally occurring peripheral autoantigen on thymic APCs

efficiently eliminates autoreactive T cells. In this system hematopoietic APCs preferentially mediate clonal deletion. The role of different TECs in these processes will be analyzed using mTEC versus cortical thymic epithelial cell (cTEC) promoter-driven antigen presentation.

2 Zusammenfassung

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, wie Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie (DCM) sind vielfach auftretende Todesursachen, wobei DCM bei jungen Erwachsenen der häufigste Grund für Herzversagen ist. Virale Infektionen können eine akute Entzündung des Herzmuskels auslösen, die eine autoimmune Reaktion zur Folge haben kann. Die dadurch entstehende chronische Entzündung des Herzmuskels führt zur Zerstörung der Kardiomyozyten, zu fibrotischen Veränderung des Herzgewebes und letztendlich zur DCM. Auf Grund der nach wie vor bestehenden Schwierigkeiten Myocarditis zu diagnostizieren, ist es wichtig die autoimmunen Prozesse eigenständig zu untersuchen. Des Weiteren ist die Beteiligung der verschiedenen T Helfer (Th) Zell Typen und deren Zytokine an der Erkrankung nicht ausreichend aufgeklärt, hauptsächlich durch Mangel passender Tiermodelle. Auf Grund dessen haben wir eine T Zell Rezeptor (TCR) transgene Maus generiert, deren Th Zellen das immunodominante Epitop der alpha Kette des Herzmyosins (myhca₆₁₄₋₆₂₉) erkennen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das neue Tiermodell für autoimmune Myokarditis beschrieben und die Beteiligung der Th Zellen und der Zytokine an der Krankheitsentstehung erläutert. Im peripheren CD4⁺ T Zell Pool der TCR-M Mäuse exprimierten über 95% der Zellen den funktionellen transgenen TCR, proliferierten und entwickelten sich zu Effektorzellen nach Stimulation mit dem myhca₆₁₄₋₆₂₉ Peptid. Des Weiteren entwickelten 100% der TCR-M Mäuse spontane autoimmune Myokarditis, gekennzeichnet durch die Infiltration von Th1/Th17 polarisierten Zellen. Herz-infiltrierenden Zellen sezernierten große Mengen an IFN- γ und mäßig IL-17 nach Stimulation mit dem Antigen. In 50% der Tiere verschlimmerte sich die Erkrankung und die Mäuse entwickelten eine DCM, gekennzeichnet durch die Vergrößerung der Herzventrikel, Fibrose und die Abnahme der Herzwanddicke. Um den Einfluss von IL-17A, IL-6 und IFN- γ Rezeptor (IFN- γ R) auf den Krankheitsverlauf zu untersuchen, wurden die TCR-M Mäuse auf den entsprechenden Zytokin knock out (KO) Hintergrund gekreuzt. Die Ergebnisse zeigten, dass IL-17A unbedeutend für Myokarditis

jedoch wichtig für das Voranschreiten der Erkrankung zur DCM ist. Die Abwesenheit von IL-6 verminderte die Schwere der Erkrankung maßgeblich und bestätigte somit die Beteiligung von IL-6 an Herzerkrankungen. Am wichtigsten ist jedoch die Feststellung, dass die Entwicklung von Myokarditis und DCM erheblich verringert wurde, wenn der IFN- γ R nicht vorhanden war. Dieses Ergebnis unterstreicht die pathogene Rolle von IFN- γ in Herzmuskelentzündungen und dem Voranschreiten zur DCM. Zusammenfassend ermöglicht dieses neue Tiermodell für spontane Myokarditis und DCM nicht nur die detaillierte Analyse der beteiligten Th Zellen und deren Zytokine, sondern gewährleistet auch die Untersuchung von grundlegenden Mechanismen in Autoimmunerkrankungen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden zentrale Toleranz Mechanismen in Zusammenhang mit einem natürlich auftretenden Autoantigen, die Myosin alpha Kette, untersucht. Bevor naive T Zellen die Peripherie besiedeln, werden autoreaktive T Zellen entweder durch klonale Beseitigung oder Umwandlung zu regulatorischen T (Treg) Zellen aussortiert. Die Beteiligung der im Thymus vorhandenen Antigen präsentierenden Zellen (APCs) an diesen Prozessen ist nicht vollständig aufgeklärt. Auf Grund der fehlenden Expression des myhca Proteins im Thymus, wurde das myhca Peptid in den ROSA Locus einer Knock-in Maus integriert. Durch ein cre-loxP System kann die Expression des myhca Peptids, im Zusammenhang mit dem MHC Klasse II Molekül, auf Dendritische Zellen (DCs), B Zellen oder thymische Epithelialzellen (TECs) gelenkt werden. Die Verwendung der TCR-M Maus erlaubt uns den Einfluss der myhca Präsentation durch thymische APCs auf die negative Selektion der Antigen-spezifischen T Zellen zu untersuchen. Die Expression des myhca Peptids auf allen im Thymus residierenden MHC Klasse II positiven Zellen führte zu starker negativ Selektion, gekennzeichnet durch reduzierte Anzahl an doppelt positiven (DP) und CD4⁺ T Zellen und bedeutend erhöhter Frequenz von FoxP3⁺ Treg Zellen. Wurde das Antigen ausschließlich von DCs oder B Zellen exprimiert, wurden autoreaktive T Zellen aussortiert, jedoch zu einem geringeren Ausmaß. Die Frequenz der Treg Zellen war erheblich vermindert, wenn das Autoantigen nur von DCs und B Zellen exprimiert wurde. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Expression des Autoantigens durch APCs im Thymus autoreaktive T

Zusammenfassung

Zellen eliminiert und hämatopoetische APCs bevorzugt klonale Eliminierung vermitteln. Der Beitrag der unterschiedlichen TECs zur negativ Selektion von autoreaktiven T Zellen wird durch gerichtete Antigen Präsentation von medullären versus cortikalen TECs untersucht.