

DISS. ETH NO. 21895

**The role of IL-1 β and myeloid cells in the generation of
multifunctional pathogenic T helper cells in experimental
autoimmune encephalomyelitis**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZÜRICH

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

CAMILLA BASSO

born on 18.02.1984

citizen of Italy

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Antonio Lanzavecchia

Dr. Federica Sallusto

Prof. Dr. Annette Oxenius

Prof. Dr. Carole Bourquin

2014

1. Summary

IL-1 β is a pleiotropic cytokine that plays a role in several inflammatory disorders in humans and in experimental animal models, including mouse experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). IL-1 β is produced after pro-IL-1 β cleavage by IL-1 converting enzyme (caspase-1), which in turn is activated by a complex of proteins called inflammasome. IL-1 β drives human Th17 cells polarization and triggers the differentiation of mouse inflammatory Th17 cells characterized by the co-expression of IL-17 and IFN- γ .

In the study presented in this thesis, it is reported that mice deficient for IL-1 β production or for a component of the inflammasome (the apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, also known as ASC) do not develop EAE following immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA), and pertussis toxin (PT) administration. Autoreactive T cells were primed in both wild-type (wt), IL-1 β ^{-/-} and ASC^{-/-} mice. However, while in wt mice T cells proliferated extensively and acquired the capacity to produce inflammatory cytokines, such as IL-17, IL-22, IFN- γ and GM-CSF, in IL-1 β ^{-/-} and ASC^{-/-} mice, the T cells expanded poorly and showed reduced capacity to produce simultaneously several inflammatory cytokines, in particular GM-CSF.

Interestingly, generation of multifunctional (IL-17⁺, IL-22⁺, IFN- γ ⁺, GM-CSF⁺) T cells in wt mice required the presence of PT at the time of immunization. PT was found to rapidly induce IL-1 β secretion by CD11c⁺ and Gr1⁺ myeloid cells in secondary lymphoid organs *in vivo*, and by bone-marrow-derived dendritic cells (BM-DCs) *in vitro*. Moreover, in mice where Gr1⁺ myeloid cells were depleted or in mice with impaired migration of monocytes due to the deficiency in the chemokine receptor CCR2 (binding the monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), IL-1 β production was not induced by PT and multifunctional T cells priming was impaired.

When T cells were primed in mice deficient for myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) encoding gene, the PT-driven recruitment of inflammatory myeloid cells in the lymph node and the generation of multifunctional T cells were also impaired.

Moreover, selective deletion of MyD88 in T cells was sufficient to block the PT-induced differentiation of multifunctional Th17 cells.

Taking together, these data support the notion that the disease-inducing effect of PT is due to its ability to determine recruitment of myeloid cells, production of IL-1 β and differentiation of highly pathogenic multifunctional T cells.

2. Riassunto

L'interleuchina 1 β (IL-1 β) e' una citochina pleiotropica che riveste un ruolo importante in diverse patologie infiammatorie e in modelli sperimentali di malattie autoimmuni, come ad esempio nella encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) murina. L' IL-1 β viene sintetizzata come pro-IL-1 β , funzionalmente inattiva, e prodotta nella forma attiva a seguito del taglio enzimatico da parte dell'enzima caspasi-1, che viene attivato da un complesso di proteine che prende il nome di inflammasoma.

Studi *in vitro* nell'uomo hanno dimostrato che l' IL-1 β e' importante per indurre i linfociti T naive a differenziare in linfociti effector di tipo Th17. Nel topo, i linfociti T naive stimolati in presenza di IL-1 β acquisiscono un fenotipo Th17 infiammatorio, caratterizzato dalla produzione di IL-17 ed IFN- γ . Lo studio oggetto di questa tesi sperimentale dimostra che topi deficienti in IL-1 β o ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain), una proteina adattatrice dell'inflammasoma, non sviluppano EAE dopo immunizzazione con l'antigene MOG (una glicoproteina mielinica prodotta dagli oligodendrociti), in presenza dell'adiuvante CFA (complete Freund's adjuvant) e la somministrazione della tossina della pertosse (PT). L'analisi al giorno 5 del linfonodo drenante il sito di immunizzazione dimostra che nei tre gruppi di topi analizzati, wild-type (wt), IL-1 β ^{-/-} e ASC^{-/-}, le cellule T specifiche per l'antigene MOG sono stimulate e proliferano in modo comparabile. Pero', mentre nei topi wt le cellule T attivate acquisiscono un fenotipo infiammatorio caratterizzato dalla capacita' di produrre diverse citochine infiammatorie, come IL-17, IL-22, IFN- γ e GM-CSF, le cellule T attivate in topi IL-1 β ^{-/-} e ASC^{-/-} producono IL-17 e IL-10, una citochina con attivita' anti-infiammatoria. Inoltre, lo studio dimostra anche che la generazione di cellule T multifunzionali (IL-17⁺, IL-22⁺, IFN- γ ⁺, GM-CSF⁺) nei topi wt dipende dalla presenza della PT al momento dell'immunizzazione. Nel linfonodo la PT induce una rapida secrezione di IL-1 β da parte di cellule mieloidi CD11c⁺ e Gr1⁺. In topi nei quali le cellule mieloidi Gr1⁺ sono state depletate o in topi in cui la migrazione di cellule mieloidi e' difettiva a seguito della delezione del gene che codifica per il recettore per chemochine CCR2, il trattamento con PT non induce produzione di IL-1 β e, di conseguenza, l'attivazione e differenziazione di cellule T multifunzionali. Il reclutamento di cellule mieloidi e la differenziazione di linfociti Th17 multifunzionali e' anche difettiva in topi

deficienti per la molecola MyD88 responsabile della trasduzione del segnale dai recettori TLR e dal recettore per l' IL-1 (IL-1R). La mancanza di MyD88 nelle sole cellule T e' sufficiente per bloccare la differenziazione a cellule Th17 multifunzionali.

Questi dati, nel loro insieme, sono consistenti con un modello nel quale l'effetto patogenetico della PT nel modello di EAE e' dovuto alla capacita' di agire nelle prime fasi di induzione della malattia attraverso il reclutamento negli organi linfoidi secondari di cellule mieloidi, la produzione di IL-1 β e la differenziazione di linfociti infiammatori T multifunzionali altamente patogenetici.