



Doctoral Thesis

Heterogeneity of Allergen-Reactive Human T Lymphocytes

Author(s):

Natali, Sara

Publication Date:

2018

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000270825> →

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 NO. 25181

HETEROGENEITY OF ALLERGEN-REACTIVE HUMAN T LYMPHOCYTES

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

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

SARA NATALI

MSc. Molecular and Cellular Biology
University of Bologna, Italy

Born on 18.01.1989
in Forlì, Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Federica Sallusto (examiner)
Prof. Dr. Antonio Lanzavecchia (co-examiner)
Prof. Dr. Christian Münz (co-examiner)
Prof. Dr. Manfred Kopf (co-examiner)

2018

1. Summary

Allergic reactions have been linked to a subset of T helper lymphocytes, termed Th2, characterized by the secretion of interleukin-4 (IL-4), IL-5 and IL-13. In the last decade, increasing evidences supported the existence of phenotypically different subpopulations within the Th2 subset, which might play distinct functions in the immune response to allergens.

This thesis aims to characterize human T lymphocyte responses against allergens by investigating the heterogeneity among allergen-reactive CD4⁺ T cells. Fifteen allergic and four non-allergic donors were involved in the study and the T cell response to three seasonal allergens (timothy grass, ragweed and European white birch) and to one non-seasonal allergen (house dust mite) was analyzed.

First, CD4⁺ T lymphocytes were sorted into four memory subsets, on the basis of chemokine receptor expression: CCR4⁺ CRTh2⁺, CCR4⁺ CCR10⁺, CCR4⁺ CRTh2⁻ CCR10⁻ (defined as CCR4⁺ DN) and CCR4⁻. The distribution and frequency of allergen-reactive T cells within each subset were assessed by the analysis of T cell libraries and confirmed by *ex vivo* stimulation. Highest frequencies of T cells reactive to all the allergens tested were found in the CCR4⁺ CRTh2⁺ subset of allergic donors. CCR4⁺ DN T cells also responded to all allergens, but allergen-reactive T cells were rarer than in the CCR4⁺ CRTh2⁺ subset. Interestingly, CCR4⁺ CCR10⁺ T cells were found to react only against house dust mite.

Then, allergen-reactive T cells from each subset were analyzed for expression of effector cytokines. We found that CCR4⁺ CRTh2⁺ T cells secreted high amounts of IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13, while CCR4⁺ CCR10⁺ T cells produced mainly IL-22 and CCR4⁺ DN T cells released low doses of IL-4 together with some IL-17 and IL-22. These results demonstrate the existence of two subpopulations of Th2 cells, characterized by different effector functions, which are both involved in allergic reactions. CCR4⁺ CRTh2⁺ T cells secrete high levels of type 2 cytokines and represent a population of inflammatory Th2 cells, while the CCR4⁺ DN subset comprises Th2 cells with reduced effector functions. In addition, CCR4⁺ CRTh2⁺ T cells express higher level of PPAR γ , a transcription factor involved in Th2 cell differentiation and effector functions.

TCR β repertoire analysis revealed that allergic reactions to house dust mite are coordinated by few CCR4⁺ CRTh2⁺ and CCR4⁺ CCR10⁺ clones highly expanded. Allergen-reactive T

cells in the CCR4⁺ DN subset are more diverse and relatively lower expanded. Extensive TCR β clonotype sharing was observed between the CCR4⁺ DN subset and the CCR4⁺ CRTh2⁺ or the CCR4⁺ CCR10⁺ subsets. Conversely, few TCR β clonotypes were shared between the CCR4⁺ CRTh2⁺ and the CCR4⁺ CCR10⁺ subsets. These data suggest that initial allergen sensitization might induce a pool of allergen-reactive CCR4⁺ DN T cells which, upon repeated allergen exposure, acquire CRTh2 or CCR10 expression, depending on the initial site of antigen priming.

In conclusion, this study reveals that CCR4⁺ CRTh2⁺ T cells contribute most to allergic reactions. These cells are characterized by enhanced cytokine production and expression of PPAR γ and may represent a pathogenic Th2 population which differentiates from non-pathogenic Th2 cells upon repeated allergen exposure. CCR4⁺ CCR10⁺ skin-homing T cells participate to responses against specific allergens, like house dust mite, and exert effector functions typical of Th2 cells.

Riassunto

Le reazioni allergiche sono state associate ad un subset di linfociti T helper, chiamato Th2, il quale è caratterizzato dalla produzione di interleuchina 4 (IL-4), IL-5 e IL-13. Negli ultimi anni, crescenti evidenze sperimentali hanno dimostrato l'esistenza di popolazioni fenotipicamente distinte all'interno del subset Th2, che potrebbero svolgere funzioni diverse nel contesto di una risposta allergica.

Questa tesi ha lo scopo di caratterizzare le risposte allergiche mediate da linfociti T nell'uomo, attraverso lo studio della diversità fenotipica e funzionale di cellule T reattive agli allergeni. Quindici donatori allergici e quattro donatori non allergici sono stati coinvolti nello studio in cui è stata analizzata la risposta dei linfociti T a tre allergeni stagionali (*Phleum pratense*, ambrosia e betulla) e ad un allergene non stagionale (acaro della polvere).

Inizialmente, i linfociti T CD4⁺ sono stati separati in quattro subset, sulla base dell'espressione di recettori per le chemochine: CCR4⁺ CRTh2⁺, CCR4⁺ CCR10⁺, CCR4⁺ CRTh2⁻ CCR10⁻ (definito come CCR4⁺ DN) e CCR4⁻. La distribuzione e la frequenza di cellule T reattive agli allergeni in ciascun subset sono state determinate mediante l'analisi di "library" di cellule T e sono state confermate attraverso stimolazione *ex vivo*. La maggiore frequenza di cellule T reattive a tutti gli allergeni testati è stata trovata nel subset CCR4⁺ CRTh2⁺ di donatori allergici. Anche cellule T CCR4⁺ DN hanno risposto a tutti gli allergeni, ma con frequenza minore che nel subset CCR4⁺ CRTh2⁺. Invece, cellule T CCR4⁺ CCR10⁺ hanno risposto solo all'acaro della polvere.

Successivamente, le cellule T reattive agli allergeni nei diversi subset sono state analizzate per l'espressione di citochine. Abbiamo osservato che cellule T CCR4⁺ CRTh2⁺ secernono elevate quantità di IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, mentre cellule T CCR4⁺ CCR10⁺ producono principalmente IL-22 e cellule T CCR4⁺ DN esprimono bassi livelli di IL-4, IL-17 e IL-22. Questi risultati dimostrano l'esistenza di due popolazioni di cellule Th2, caratterizzate da diverse funzionalità, entrambe coinvolte nelle reazioni allergiche. Cellule T CCR4⁺ CRTh2⁺ secernono dosi elevate di citochine di tipo 2 e rappresentano una popolazione di cellule Th2 infiammatorie, mentre il subset CCR4⁺ DN comprende cellule Th2 con ridotte funzionalità. Inoltre, cellule T CCR4⁺ CRTh2⁺ esprimono elevati livelli di PPAR γ , un fattore di trascrizione che è stato coinvolto nel differenziamento e nella funzionalità delle cellule Th2.

L'analisi delle sequenze TCR β espresse dalle cellule T reattive all'acaro della polvere ha rilevato che le reazioni immunitarie a questo allergene sono coordinate da pochi cloni CCR4⁺ CRTh2⁺ e CCR4⁺ CCR10⁺ molto espansi. Le cellule T reattive agli allergeni nel subset CCR4⁺ DN sono più diversificate e relativamente meno espanse. Abbiamo inoltre osservato che un elevato numero di sequenze TCR β era condiviso dal subset CCR4⁺ DN con il subset CCR4⁺ CRTh2⁺ o con il subset CCR4⁺ CCR10⁺. Al contrario, poche sequenze TCR β erano condivise dai subset CCR4⁺ CRTh2⁺ e CCR4⁺ CCR10⁺. Questi risultati suggeriscono che l'iniziale sensitizzazione agli allergeni potrebbe indurre un pool di cellule T CCR4⁺ DN che, dopo successive esposizioni allo specifico allergene, acquisiscono l'espressione di CRTh2 o di CCR10, a seconda dell'organo in cui è avvenuto il priming.

In conclusione, questo studio dimostra che cellule T CCR4⁺ CRTh2⁺ contribuiscono maggiormente alle reazioni allergiche. Queste cellule sono caratterizzate da un'elevata produzione di citochine Th2 e dall'espressione di PPAR γ e potrebbero rappresentare una popolazione di cellule Th2 infiammatorie che differenziano in seguito a successive esposizioni agli allergeni. Cellule T CCR4⁺ CCR10⁺ partecipano alle risposte a specifici allergeni, come l'acaro della polvere, ed esercitano funzioni caratteristiche di cellule Th2.