

DISS. ETH NO. 30181

***DISSECTING AUTOREACTIVE T CELLS
IN HUMAN NEUROLOGICAL DISORDERS***

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

LENKA SÚKENÍKOVÁ

MSc Immunology, Charles University

born on *03.06.1993*

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Federica Sallusto (Supervisor)
Dr. Daniela Latorre (Second Advisor)
Prof. Dr. Manfred Kopf (Co-Examiner)
Prof. Dr. Burkhard Becher (Co-Examiner)*

Abstract (English)

Autoreactive T cells play a pivotal role in the pathogenesis of various autoimmune diseases, yet their specific contributions and mechanisms remain not fully understood. In this thesis, we investigated the presence and characteristics of conventional and unconventional autoreactive T cells in various neurological disorders with respect to prior infection.

In patients with inflammatory peripheral neuropathy, Guillain-Barré syndrome (GBS), we identified autoreactive memory CD4⁺ T cells with a cytotoxic Th1-like phenotype, as well as rare CD8⁺ T cells targeting myelin of the peripheral nerves. Through comprehensive T cell screenings and sequencing techniques, we characterized over 1000 autoreactive T cell clones, revealing a polyclonal TCR repertoire with short CDR3 β lengths and preferential HLA-DR restrictions. Notably, autoreactive TCR β clonotypes were expanded in the blood across different disease stages and were shared in blood and cerebrospinal fluid exclusively between GBS patients, not with healthy donors. Additionally, myelin-reactive T cells were identified in nerve biopsy samples, indicating their direct involvement in disease pathology.

Similarly, in a patient with immune-mediated necrotizing myositis secondary to mild COVID-19, we observed a robust immune-mediated response characterized by pronounced lymphocytic infiltrates, including both CD4⁺ and CD8⁺ T cells in muscle biopsy sample. Using *in vitro* screening and TCR sequencing, we revealed muscle-infiltrating CD4⁺ T cells recognizing the SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen in an HLA-DR dependent manner. These T cells possessed polyclonal TCR V β repertoires that partially overlapped with those found in blood-circulating SARS-CoV-2-specific T cells, suggesting an antigen-driven recruitment to the muscle.

Finally, we implemented a protocol for in-house production of lipid-loaded CD1 tetramers to investigate sulfatide-reactive T cells in patients with various neurodegenerative disorders, such as multiple sclerosis (MS); since sulfatide is a prominent autoantigen within the central nervous system and exhibits metabolic changes in neurological disorders. We detected sulfatide-specific T cells in peripheral blood and for the first time in the cerebrospinal fluid of patients with various neurological disorders, including MS. Moreover, CD1a restricted sulfatide-reactive $\alpha\beta$ T cells seem to be enriched in MS patients, underscoring their potential involvement in neuroinflammatory processes. Additionally, we generated and functionally tested “universal antigen-presenting cells” using CD1-expressing cell lines serving as a useful tool for further *in vitro* investigation of lipid-reactive T cells from virtually all donors.

Abstract (German)

Autoreaktive T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen, doch ihre spezifischen Beiträge und Mechanismen sind noch nicht vollständig verstanden. In dieser Arbeit haben wir das Vorkommen und die Eigenschaften konventioneller und unkonventioneller autoreaktiver T-Zellen bei verschiedenen neurologischen Störungen im Zusammenhang mit früheren Infektionen untersucht.

Bei Patienten mit inflammatorischer peripherer Neuropathie, dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS), haben wir autoreaktive CD4⁺ T-Gedächtniszellen mit einem zytotoxischen Th1-ähnlichen Phänotyp sowie seltene CD8⁺ T-Zellen identifiziert, die sich gegen Myelin der peripheren Nerven richten. Durch umfassende T-Zell-Screenings und Sequenzierungstechniken haben wir über 1000 autoreaktive T-Zell-Klone charakterisiert und ein polyklonales TCR-Repertoire mit kurzen CDR3 β -Längen und bevorzugten HLA-DR-Restriktionen aufgedeckt. Bemerkenswerterweise waren autoreaktive TCR β -Klonotypen im Blut über verschiedene Krankheitsstadien hinweg expandiert und nur bei GBS-Patienten in Blut und Liquor zu finden, nicht aber bei gesunden Spendern. Darüber hinaus wurden Myelin-reaktive T-Zellen in Nervenbiopsieproben identifiziert, was auf ihre direkte Beteiligung an der Krankheitspathologie hinweist.

In ähnlicher Weise haben wir bei einem Patienten mit immungesteuerter nekrotisierender Myositis als Folge einer milden COVID-19-Infektion eine robuste immunvermittelte Reaktion beobachtet, die durch ausgeprägte lymphozytäre Infiltrate, einschließlich CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Muskelbiopsieprobe, gekennzeichnet war. Mittels *In-vitro*-Screening und TCR-Sequenzierung haben wir muskelinfiltrierende CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen, die das SARS-CoV-2-Nukleokapsidantigen auf eine HLA-DR-abhängige Weise erkennen. Diese T-Zellen, bestanden aus polyklonalen TCR-V β -Repertoires, die teilweise mit denen von im Blut zirkulierenden SARS-CoV-2-spezifischen T-Zellen übereinstimmten, was auf eine Antigen-getriebene Rekrutierung in den Muskel hindeutet.

Schließlich haben wir ein Protokoll zur hausinternen Herstellung von lipidbeladenen CD1-Tetrameren implementiert, um Sulfatid-reaktive T-Zellen bei Patienten mit verschiedenen neurodegenerativen Störungen wie Multipler Sklerose (MS) zu untersuchen; da Sulfatid ein prominentes Autoantigen im zentralen Nervensystem ist und metabolische Veränderungen bei neurologischen Störungen zeigt. Wir haben Sulfatid-spezifische T-Zellen im peripheren Blut und zum ersten Mal im Liquor von Patienten mit verschiedenen neurologischen Störungen,

einschließlich MS, nachgewiesen. Darüber hinaus scheinen CD1a-beschränkte Sulfatid-reaktive $\alpha\beta$ -T-Zellen bei MS-Patienten angereichert zu sein, was ihre potenzielle Beteiligung an neuroinflammatorischen Prozessen unterstreicht. Zusätzlich haben wir "universelle antigenpräsentierende Zellen" mittels CD1-expressierender Zelllinien generiert und funktionell getestet, die als nützliches Werkzeug für weitere *In-vitro*-Untersuchungen Lipid-reaktiver T-Zellen von nahezu allen Spendern dienen.