



rijksuniversiteit  
 groningen

faculteit wiskunde en  
 natuurwetenschappen

levenswetenschappen

# **Immunosenescence en de rol van de verminderde CD28 expressie bij het ontstaan van auto-immuunziektes**

E.C.S. de Boer

Supervisor: B.J. Kroesen

Juni, 2010

## Abstract

Immunosenescence is het immuunsysteem-specifieke verouderingsproces, wat leidt tot veranderingen in het fenotype en de functie van zowel het aangeboren als het verworven immuunsysteem. Een belangrijke verandering in de immunosenescence is de verminderde thymopoiesis, wat leidt tot een afname van het aantal naïeve T-cellen. Daarnaast is er bij immunosenescence een verminderde CD28 expressie in de T-cel subset. CD28 is een belangrijke costimulatie receptor, die betrokken is bij de activatie van T-cellen. Daarnaast is CD28 essentieel voor de ontwikkeling van regulatoire T-cellen (Tregs) in de periferie vanuit CD4<sup>+</sup> non-Tregs. Deze functies gaan gedeeltelijk verloren bij immunosenescence. Daarnaast gaat de verminderde CD28 expressie gepaard met een toegenomen cytotoxiciteit, pro-inflammatoire eigenschappen, en een verminderde gevoeligheid voor apoptose inductie van deze T-cellen. De meeste van de uitgedifferentieerde CD28<sup>-</sup> T-cellen hebben hun capaciteit voor celdeling verloren. De verminderde CD28 costimulatie heeft gevolgen voor de gezondheid van ouderen en wordt onder andere verantwoordelijk gehouden voor het ontstaan van auto-immuunziekten op latere leeftijd. Door de verminderde CD28 costimulatie vindt er minder tolerantie inductie plaats tegen auto-antigenen mogelijk door een verminderde aanmaak van Tregs. Herstel van CD28 zou mogelijk kunnen bijdragen aan het voorkomen van immunosenescence en de daarmee gepaard gaande pathologie. Echter, het is gebleken dat herstel van de CD28 expressie niet genoeg is om auto-immuunziekten te voorkomen. CD28 kan zelfs de al bestaande immuunpathologie verergeren doordat het verlies van CD28 een beschermingsmechanisme is van het lichaam. Door de replicatie senescence neemt het aantal auto-reactieve CD28<sup>-</sup> T-cellen niet toe maar als deze cellen hun capaciteit voor celdeling terugkrijgen door herstel van CD28 nemen ze toe in aantal. Daarnaast zal de CD28 costimulatie leiden tot meer activatie van T-cellen waardoor de bestaande ontstekingsreactie kan verergeren. Een goede therapie zal de oorzaak van immunosenescence moeten aanpakken en niet alleen CD28, omdat het immuunsysteem een ingewikkeld en zeer sterk gereguleerd proces is.

# Inhoudsopgave

<b>Abstract</b>	2
<b>Inhoudsopgave</b>	3
<b>1. Inleiding</b>	4
<b>2. Oorzaken Immunosenescence</b>	
2.1 Oxidatieve stress	4-5
2.2 Telomeerlengte	5
2.3 DNA schade	5
<b>3. Immunosenescence veranderingen in het immuunsysteem</b>	
3.1 Aangeboren immuunsysteem	5-6
3.2 Verworven immuunsysteem	6
<b>4. Klinische veranderingen ten gevolge van immunosenescence</b>	
4.1 Inflammaging	7
4.2 Vaccinaties	7-8
4.3 Transplantatie	8
<b>5. Expressie en functie van CD28</b>	
5.1 CD28	8
5.2 CTLA-4	8
5.3 Regulatorische T-cellen	8-9
<b>6. Verminderde CD28 expressie tijdens immunosenescence</b>	
6.1 CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> T-cellen	9-10
6.2 CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> T-cellen	10
6.3 Memory T-cellen	10
6.4 Oorzaken verminderde CD28 expressie	11
<b>7. Immunosenescence en het ontstaan van auto-immuunziektes, rol van CD28</b>	
7.1 Occupatie immunologische niche	12
7.2 Afnomen aantal functionerende Tregs	12
7.3 Verminderde gevoeligheid voor apoptose inductie	12
7.4 Telomeerlengte	12-13
7.5 Rol van CD28 bij reumatoïde artritis	13
<b>8. Therapie voor immunosenescence, herstel van CD28 expressie</b>	
8.1 IL-12 herstelt initiatie complex van CD28 en upreguleert CD161	13-14
8.2 Anti-TNF $\alpha$ therapie normaliseert CD28 expressie	14
8.3 CD28 costimulatie verhogen	14
8.4 Abatacept remt accumulatie CD28 <sup>-</sup> T-cellen	15
<b>9. Discussie</b>	15-16
<b>Referenties</b>	17-20

## 1. Inleiding

Ouderen hebben een afgenomen resistentie tegen infecties en daarnaast een verhoogde vatbaarheid voor auto-immuunziekten en kanker. Dit is met name een probleem in de Westerse wereld aangezien de levensverwachting daar erg hoog is (75-83 jaar) [1]. Het verouderen wordt gekenmerkt door een degeneratief proces van biologische systemen. Het immuunsysteem is onderhevig aan deze algemene biologische veroudering. Daarnaast is er sprake van een immuunsysteem-specifiek verouderingsproces waardoor fenotype en functie van het immuunsysteem in de loop van de tijd verandert. Het immuunsysteem-specifiek verouderingsproces wordt immunosenescence genoemd. Er vinden zowel veranderingen plaats in de functie van het aangeboren als het verworven immuunsysteem. Goed functionerende T-cellen, natural killer (NK) cellen en fagocyterende cellen hebben een positief effect op de levensverwachting maar deze cellen zijn door de immunosenescence aan veranderingen onderhevig [2-6]. Een groot percentage van de T-cellen verliest hun CD28 expressie, dit leidt tot een verminderde immuniteit tegen antigenen maar ook tot een verminderde tolerantie tegen de auto-antigenen. Maar of dit de primaire oorzaak is van het ontstaan van meer auto-immuunziekten op latere leeftijd is nog maar de vraag. Er zijn namelijk meerdere oorzaken die leiden tot immunosenescence. Daarnaast leidt immunosenescence tot meer veranderingen dan alleen de verminderde CD28 expressie op T-cellen. Om een goed beeld te krijgen van de rol van CD28 bij immunosenescence en het ontstaan van auto-immuunziekten, zal eerst globaal ingegaan worden op de oorzaken van immunosenescence en de gevolgen voor de gezondheid. Vervolgens zal verder ingegaan worden op de rol van CD28 expressie in een 'gezonde' individu en de gevolgen van het verlies van CD28 expressie. Daarbij zal gekeken worden of CD28 verantwoordelijk gehouden kan worden voor het ontstaan van auto-immuunziekten op latere leeftijd.

## 2. Oorzaken veroudering

Er zijn meer dan 300 theorieën over het verouderingsproces [7]. Veroudering wordt in het algemeen beschreven als het totale effect van intrinsieke veranderingen die in een organisme optreden bij het ouder worden en die de vitaliteit en het functioneren van het organisme negatief beïnvloeden [8]. Hierdoor wordt het organisme ontvankelijker voor ziektes, die uiteindelijk tot de dood kunnen leiden. Er bestaan verschillende theorieën over de oorzaak van het algemene verouderingsproces.

### 2.1 Oxidatieve stress

Oxidatieve stress is een belangrijke oorzaak die leidt tot veroudering van het lichaam. Het leidt tot een opeenhoping van schade in biomoleculen, veroorzaakt door de hoge reactiviteit van vrije radicalen en reactieve zuurstof moleculen (ROS). Deze worden geproduceerd in lichaamscellen als een gevolg van het gebruik van zuurstof. Het lichaam heeft verschillende antioxidant mechanismen, die de formatie van ROS voorkomen of deze neutraliseren als ze eenmaal geproduceerd zijn. Het lichaam ondervindt minder schade van de ROS formatie als deze gebalanceerd wordt door eenzelfde hoeveelheid anti-oxidanten. Door een verstoring van deze balans raken als eerste de mitochondriën beschadigd. Het is bekend dat tijdens de veroudering een chronische oxidatieve stress conditie ontstaat doordat er meer oxidanten zijn

dan antioxidanten [1]. De oxidanten tasten alle cellen aan, waardoor het aantal T-lymfocyten afneemt, maar er wordt juist een toename in sommige fagocyterende cellen gemeld. Deze fagocyterende cellen vormen radicalen om pathogenen aan te vallen, maar daarnaast activeren ze ook de transcriptiefactor NF- $\kappa$ B. Als NF- $\kappa$ B een bepaald niveau van activatie bereikt stimuleert deze de ontstekingsreactie [1]. Als dit proces niet goed gereguleerd wordt ontstaat er een vicieuze cirkel waardoor de oxidatieve stress toeneemt en het verouderingsproces wordt versneld.

## 2.2 Telomeerlengte

Een ander proces, wat zowel een gevolg als een oorzaak van veroudering wordt gezien, is de afgenomen telomeerlengte. Telomeren bestaan uit enkelstrengs DNA en zitten aan de uiteinden van een chromosoom. Zo beschermen ze de chromosoom uiteinden tegen degradatie. De telomeerlengte is belangrijk voor het replicatie potentie van cellen [9]. Cel replicatie leidt tot telomeer verlies wat in sommige cellulaire systemen, zoals in het immuunsysteem, gecompenseerd wordt door telomerase activiteit. Echter, als T-cellen vaak gestimuleerd worden, worden ze ongevoelig voor telomerase inductie en raken ze hun telomeersequenties kwijt en kunnen ze uiteindelijk niet meer delen, met als eindstadium replicatie senescence [9]. In een studie van Valenzuela et al. is gebleken dat zolang de T-cellen CD28<sup>+</sup> zijn, ze zelfs na de derde antigeen stimulatie nog hoge telomerase activiteit vertonen [10]. De afgenomen telomerase activiteit bij ouderen kan mede verklaard worden door het toegenomen aantal CD28<sup>-</sup> T-cellen.

## 2.3 DNA schade

Veroudering van het lichaam gaat gepaard met accumulatie van schade aan het DNA en dit leidt tot een aanschakeling van DNA schade signaalroutes. De tumorsupressorgenen p53 en p16<sup>INK4a</sup> worden onder andere aangeschakeld bij DNA schade om zo kanker te voorkomen [11]. Deze tumorsupressorgenen bevorderen het proces van veroudering door apoptose en een arrest van de celgroei, echter activatie van p53 kan ook door een tijdelijk arrest van de celgroei en DNA reparatie het verouderingsproces vertragen [11].

Al deze oorzaken hangen met elkaar samen zo kan oxidatieve stress ook schade toebrengen aan de telomeren waardoor deze korter worden [1]. Deze verkorte telomeren leiden op hun beurt weer tot ‘uncapped’ chromosomen waardoor p53 en p16 worden aangeschakeld [9, 11]. Dus geen van de theoriën staat op zichzelf en hebben allemaal hun effect op de lichaamsfuncties, zoals op het immuunsysteem.

# 3. Immunosenescence veranderingen in het immuunsysteem

## 3.1 Aangeboren immuunsysteem

In cellen van het aangeboren immuunsysteem vinden er zowel veranderingen plaats in het fenotype van deze cellen als in hun functie. Zo is bekend dat de natural killer (NK) cellen een verminderde cytotoxiciteit hebben in ouderen. [12-15]. Andere NK cel functies zoals de secretie van chemokines of interferon (IFN)- $\gamma$  in respons op interleukine (IL)-2 zijn ook afgenomen in de ouderen [16]. Dendritische cellen (DC) daarentegen behouden hun antigeen presenterende functie, maar er is een reductie in het aantal DC's [17,18]. In andere studies van

dendritische cellen zijn leeftijdsafhankelijke veranderingen in MHC II en andere oppervlakte moleculen aangetoond en ziet men juist een potentiële dysfunctie van DC's bij hogere leeftijd. Regulatorische T-cellen (Tregs) leveren hier een bijdrage aan door co-stimulatie moleculen zoals CD40 en B7-2 (CD86) op DC's te laten afnemen [19, 20]. Het aantal macrofagen neemt niet af in de ouderen maar er is wel een significante afname in het aantal macrofaag voorloper cellen en in het aantal macrofagen in het beenmerg van ouderen. [21]. Er vindt ook een verandering plaats in de functie van macrofagen. De capaciteit van macrofagen om microben door middel van fagocytose en door vorming van ROS te vernietigen neemt namelijk af bij ouderen [21]. Ook in de neutrofielen ziet men bij ouderen een afname in de fagocytose capaciteit. Daarnaast is er ook een afname in de Fc-receptor gemedieerde superoxide productie. Het aantal neutrofielen en hun voorloper cellen blijven daarentegen wel goed intact bij ouderen, net zoals het proces van chemotaxis en adhesie naar de plaats van infectie [21]. Vergeleken met het verworven immuunsysteem blijft het aangeboren immuunsysteem nog redelijk intact.

### *3.2 Verworven immuunsysteem*

Het verworven immuunsysteem is opgebouwd uit CD4<sup>+</sup> T-cellen (helper T-cellen), CD8<sup>+</sup> T-cellen (cytotoxische T-cellen) en B-lymfocyten. Één van de kenmerken van immunosenescence in het verworven immuunsysteem is inkrimping van de thymus. Deze verandering wordt gekenmerkt door een verlies van thymus epitheel cellen en een afgenomen thymopoiesis [22]. Hierdoor worden er minder naïeve T-cellen aangemaakt. Er treden zowel veranderingen op in de CD8<sup>+</sup> T-cellen als in de CD4<sup>+</sup> T-cellen. De CD8<sup>+</sup> T-cellen nemen eerder in aantal af dan de CD4<sup>+</sup> T-cellen, maar uiteindelijk draagt de afname van de productie van beide T-cel populaties bij aan een afname van het T-cel repertoire. De grootte van het T-cel repertoire kan gemeten worden door middel van de analyse van het aantal T-cel receptor excisie cirkels (TRECs). Dit zijn cirkelvormige stukjes DNA die ontstaan bij het T-cel rijpingsproces in de thymus, tijdens de vorming van de antigeen receptor van de T-cel. De frequenties van deze TRECs nemen exponentieel af bij toenemende leeftijd [22]. Daarnaast is er een verminderde IL-2 productie en een afgenomen expansie en differentiatie in effector T-cellen in vergelijking met naïeve T-cellen van jonge mensen [23]. Er bevinden zich op latere leeftijd veel meer 'oude' gedifferentieerde geheugen en effector T-cellen in het lichaam. De accumulatie van deze T-cellen zorgt voor een bezetting van immunologische niches [24]. De andere T-cellen krijgen daardoor minder tot geen stimulatie signalen van cytokines en/of oppervlakte ligands. Daarnaast hebben T-cellen een verminderde CD28 expressie, dit leidt onder andere tot meer antigeen-experienced memory T-cellen en een afgenomen aantal naïeve T-cellen en een verminderd aantal CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-cellen [25, 26]. Naast de veranderingen in de T-cel populatie zijn er ook veranderingen waar te nemen in de B-cel populatie. De memory B-cellen vertonen een afgenomen gevoeligheid voor apoptose en dit leidt tot een verdere accumulatie van specifieke B-cellen [27,28]. Hierdoor neemt de diversiteit van het B-cel repertoire af en zijn er meer antigeen-experienced memory cellen dan naïeve B-cellen in ouderen [21]. De serum immunoglobuline niveaus zijn daarentegen stabiel tijdens de veroudering maar de antilichamen vertonen wel een afgenomen affiniteit doordat er minder shift van antilichaam isotype IgM naar IgG plaatsvindt [29].

## 4. Klinische veranderingen ten gevolge van immunosenescence

De veranderingen in zowel het aangeboren als het verworven immuunsysteem hebben gevolgen voor de gezondheid van ouderen. Vanuit een evolutionair perspectief gezien leidt de afgenomen productie van lymfocyten tot het behoud van energie voor andere biologische processen. Er worden heel veel primaire lymfocyten gevormd maar er zijn maar enkele die slagen in het productief recombineren van antigeen-receptor genen, de meeste primaire lymfocyten ondergaan apoptose. Daarnaast is de recombinatie van antigeenreceptor genen afhankelijk van het knippen en liggen van DNA; dit proces maakt de lymfoïde progenitors extra gevoelig voor chromosoom translocatie. Chromosoom translocatie kan leiden tot acute lymfoblastische leukemie, deze vorm van leukemie komt minder voor bij ouderen [30]. De afgenomen lymfocyten productie kan dus ook gezien worden als een positief gevolg van immunosenescence, maar immunosenescence heeft vooral negatieve gevolgen. Er is onder andere een positieve relatie gevonden tussen verhoogde cytokine niveaus bij chronische ontstekingen en het ontstaan van depressies [31].

### 4.1 Inflammaging

Immunosenescence kan leiden tot een staat van chronische ontsteking: inflammaging. Dit leidt tot een verminderde kwaliteit van leven door een opeenstapeling van ziektebeelden. Een acute ontsteking leidt tot een verminderde serum albumine productie voor de productie van acute fase eiwitten. Bij een chronische ontsteking worden er aminozuren uit de skeletspieren onttrokken omdat er geen grote voorraad is van intracellulair albumine [32]. Dit leidt tot een afname van de spiermassa. Daarnaast worden de ontstekings signaalroutes gedeeltelijk verantwoordelijk gehouden voor het ontstaan van neurodegeneratie op oudere leeftijd [33]. In een studie van Giunta et al. wordt beschreven dat IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  de productie van het A $\beta$  peptide kunnen veroorzaken. Het A $\beta$  peptide is een pathologisch kenmerk van de ziekte van Alzheimer. In deze studie wordt gesuggereerd dat inflammaging, vanwege verhoogde IFN- $\gamma$  en pro-inflammatoire cytokine productie, een voorbode is voor het ontstaan van de ziekte van Alzheimer [34]. Een ander gevolg van inflammaging is dat er tijdens een ontsteking meer IL-6 en IL-1 geproduceerd wordt. Deze interleukines kunnen de erythroid progenitor cellen inhiberen en stimuleren daarnaast de erythrocyt fagocytose door macrofagen, waardoor het aantal rode bloedcellen afneemt [31]. Dit alles kan aanleiding geven tot het ontstaan van bloedarmoede bij ouderen. Naast de gevolgen van inflammaging voor de gezondheid van ouderen leidt immunosenescence in het algemeen tot een verhoogde kans op het krijgen van infectieziekten en tot een verhoogde mortaliteit onder ouderen.

### 4.2 Vaccinaties

Immunosenescence leidt er toe dat vaccinaties minder effectief zijn bij oudere mensen. Dit komt onder andere door de verminderde antigeenpresentatie in antigeen presenterende cellen (APC's). Daarnaast zijn er minder naïeve T-cellen door inkrimping van de thymus waardoor een minder goede primaire immunoreactie is tegen het antigeen van de vaccinatie. Daarnaast is er een gereduceerde B-cel productie, verminderde isotype switching en somatische hypermutatie wat er toe leidt dat er een zwakkere en lagere affiniteit is van de antilichamen tegen het antigeen. Er wordt dus geen goede adaptieve immunorespons ontwikkeld [21]. Voor

ouderen zijn betere vaccinatie strategieën nodig met nieuwe adjuvanten en vaccins die specifiek het verouderde immuunsysteem als doel hebben.

#### *4.3 Transplantatie*

Immunosenescence levert daarnaast problemen op bij transplantatie. Men zou verwachten dat een transplantatie minder problemen oplevert bij ouderen aangezien hun immuunsysteem minder goed werkt waardoor er minder snel afstoting van het transplantaat zou optreden. Maar het immuunsysteem is ook belangrijk bij het ontstaan van tolerantie [35]. Hierbij spelen de co-stimulatie signaalroutes van allogene herkenning een belangrijke rol, deze zijn bij immunosenescence verzwakt. Zowel de CD28-CTLA4 en CD40-CD40L pathways worden dysfunctioneel met veroudering [21].

### **5. Expressie en functie van CD28**

#### *5.1 CD28*

CD28 is een disulfide-linked homodimeer, waarvan elk subunit één extracellulair Ig domein heeft. Het CD28 molecuul wordt bij mensen op 90% van alle CD4<sup>+</sup> T-cellen en op 50% van alle CD8<sup>+</sup> T-cellen tot expressie gebracht. Het zorgt voor costimulatie naast het signaal dat geleverd wordt door de binding van de T-cel receptor (TCR) en CD4 of CD8 coreceptor aan het peptide-MHC complex. CD28 geeft een costimulatoir signaal doordat het een binding aan gaat met het costimulatoir molecuul B7-1 (CD80) of B7-2 (CD86). Deze moleculen komen voor op dendritische cellen, macrofagen en B-lymfocyten. CD28 co-stimulatie stimuleert de productie van groeifactoren en andere cytokines. Dit leidt tot een verhoogde T-cel proliferatie en differentiatie. CD28 gemedieerde signalen zijn met name belangrijk voor de productie van de groeifactor IL-2. Dit komt waarschijnlijk door een combinatie van verhoogde transcriptie en stabilisatie van het IL-2 messenger RNA. Daarnaast leidt costimulatie tot een signaal naar de T-cellen voor expressie van anti-apoptotische eiwitten door verhoogde expressie van het anti-apoptotische eiwit Bcl-x<sub>L</sub> [36].

#### *5.2 CTLA-4*

Naast activerende co-stimulatie receptoren is er ook een receptor die structureel gelijk is aan CD28 maar een remmend effect heeft: CTLA-4. Deze wordt tot expressie gebracht op recent geactiveerde CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen en zijn functie is om de T-cel activatie te inhiberen door tegenovergestelde signalen te geven aan het TCR complex en CD28. CTLA-4 is dus betrokken bij het beëindigen van de T-cel respons en zorgt voor anergie tegen weefsel antigenen. Opvallend is dat zowel CTLA-4 als CD28 aan dezelfde B7 moleculen binden, B7-1 en B7-2 [36]. Beide concurreren om de B7 costimulatoire moleculen maar CTLA-4 heeft een hogere affiniteit voor B7 dan CD28. Dit zorgt ervoor dat T-cellen minder snel geactiveerd worden. Daarnaast is beschreven dat CTLA-4 remmende biochemische signalen afgeeft, die actief de signalen van de TCR en/of CD28 blokkeren [40].

#### *5.3 Regulatorische T-cellen*

Een belangrijke functie van de B7-CD28 pathway is dat het zorgt voor de ontwikkeling van regulatorische T-cellen (Tregs). Tregs zijn CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen welke de functie van effector T-cellen kunnen onderdrukken. Hierdoor zorgen ze ervoor dat, na een immunoreactie, het



immuunsysteem weer naar een ruststaat gaat om zo verdere schade te voorkomen aan eigen weefsels. Daarnaast spelen deze T-cellen een belangrijke rol bij het beschermen van het lichaam tegen zelf-reactieve lymfocyten, welke de selectie tegen autoreactieve immuuncellen hebben overleefd. Tregs worden niet alleen ontwikkeld in de thymus (nTregs) maar kunnen ook gegenereerd worden vanuit naïeve T-cellen in de periferie (iTregs). *In vitro* hangt de ontwikkeling van Tregs vanuit perifere T-cellen af van TCR complex signaal en TGF- $\beta$ 1 [37], terwijl *in vivo* costimulatie nodig is via B7-1 of B7-2 en CD28 als costimulator molecuul dus essentieel is [38]. In het onderzoek van Guo et al. komt naar voren dat CD28 essentieel is doordat het de ontwikkeling van Tregs in de periferie vanuit CD4<sup>+</sup> non-Tregs controleert via de IL-2 productie [39]. CD28 deficiënte muizen hebben een afgenomen aantal Tregs [37].

## 6. Verminderde CD28 expressie tijdens immunosenescence

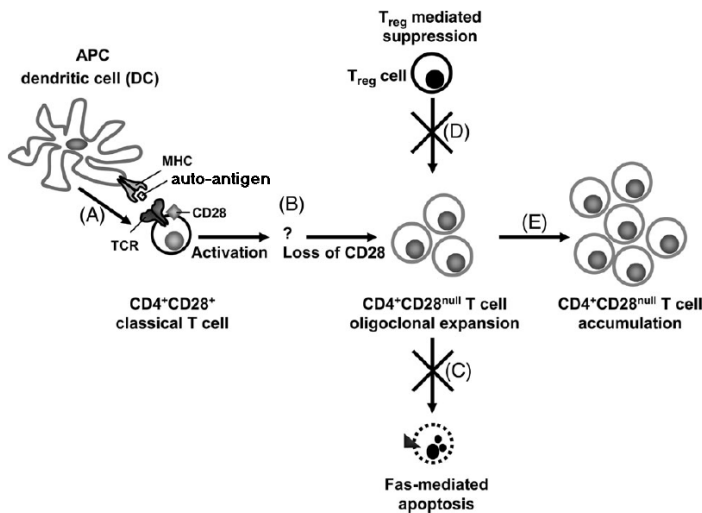
Het verlies van de CD28 expressie heeft gevolgen voor de functie van T-cellen. CD28<sup>-</sup> T-cellen hebben een gebrekkige antigeen-geïnduceerde proliferatie, en een korte replicatie levensduur, maar wel een verhoogde cytotoxiciteit. Daarnaast hebben ze een verminderde antigeen receptor diversiteit maar dit wordt mede veroorzaakt door inkrimping van de thymus. Hierdoor neemt het aantal nieuwe naïeve T-cellen af en daarnaast differentiëren sommige naïeve T-cellen, na herhaalde antigeen stimulatie, tot geheugen T-cellen waardoor de antigeen receptor diversiteit verder afneemt.

### 6.1 CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen

CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen verschillen van de gewone CD28<sup>+</sup> helper T-cellen in zowel fenotype als functie [41]. CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen zijn chronisch geactiveerde cellen, die hun klassieke helper functie hebben verloren. Ze hebben pro-inflammatoire eigenschappen door productie van hoge niveaus van IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  [42]. Daarnaast zijn ze cytotoxisch, dit wordt gemedieerd door cytolytische enzymen, zoals perforine, granzyme A en granzyme B, welke tot expressie worden gebracht door CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen [43, 44]. Deze cytolytische enzymen zijn normaal aanwezig in cytotoxische CD8<sup>+</sup> T-lymfocyten (CTLs) en NK cellen, waar de klassieke CD4<sup>+</sup> T-cellen deze niet hebben. Daarnaast brengen CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen de C-type lectin receptor NKG2D tot expressie en een aantal andere NK cel gerelateerde receptoren, welke behoren tot de killer immunoglobuline receptoren (KIR) familie [45].

De CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen zijn resistent tegen apoptotische celdood ondanks normale expressie van apoptose inducerende receptoren zoals CD95 (Fas), zoals te zien is in figuur 1 [46]. Deze resistentie tegen apoptose is gemedieerd door upregulatie van anti-apoptotische eiwitten zoals B-cel leukemie/lymfoom 2 (Bcl-2) [47]. Daarnaast zijn CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen maar gedeeltelijk vatbaar voor de regulatoire capaciteiten van Treg cellen. Volledige competente Treg cellen kunnen de productie van IFN- $\gamma$  door CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen onderdrukken maar kunnen hun expansie niet voorkomen, zoals te zien is in figuur 1. De proliferatie en cytokine productie worden onafhankelijk van elkaar gereguleerd. In mensen lijkt de target van Treg suppressie de transcriptie van IL-2 in effector cellen te zijn [48]. Echter, de productie van IL-2 is verminderd bij immunosenescence waardoor de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen gedeeltelijk resistent zijn tegen de regulatoire capaciteiten van de Tregs [48]. De resistentie tegen zowel apoptose als Treg suppressie van de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen kan uiteindelijk leiden tot een accumulatie van autoreactieve CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen, zoals te zien is in figuur 1. In gezonde individuen zijn

0.1-2,5% van de  $CD4^+$  T-cellen  $CD28^-$  T-cellen [49]. Het verouderingsproces en chronische ontstekingsziektes leiden tot een toename van deze T-cel populatie [50].



Dumitri et al, 2009 (adapted)

**Figuur 1** Een auto-antigen wordt gepresenteerd door antigeen-presenterende cellen (APCs) zoals dendritische cellen (DCs) aan  $CD4^+CD28^+$  T-cellen (A). Na herhaalde activatie door de DCs verliezen sommige van de  $CD4^+CD28^+$  T-cellen hun CD28 expressie en ondergaan oligoclonale expansie (B).  $CD4^+CD28^-$  T-cellen zijn resistent tegen apoptose inductie (C) en zijn relatief ongevoelig voor suppressie gemedieerd door Tregs (D). Deze factoren leiden tot een expansie en accumulatie van  $CD4^+CD28^-$  T-cellen, die autoreactief zijn.

## 6.2 $CD8^+CD28^-$ T-cellen

Het verouderingsproces heeft invloed op de  $CD8^+$  T-cel subset.  $CD8^+$  T-cellen spelen een belangrijke rol in het verworven immuunsysteem tegen intracellulaire pathogenen en uitgroei van kanker. Echter op hogere leeftijd neemt de CD28 expressie af in de  $CD8^+$  T-cellen. Bij mensen boven de 80 jaar zijn 60-80% van de  $CD8^+$  T-cellen  $CD28^-$  T-cellen [26]. De meeste van deze zijn uitgedifferentieerde effector lymfocyten, die hun capaciteit om celdeling te ondergaan hebben verloren. In een studie van Vallejo et al. wordt beschreven dat replicatieve senescence een overlevingsmechanisme is voor oude  $CD8^+CD28^-$  T-cellen vanwege hun al erg verkorte telomeren [51]. Daarnaast kunnen ze niet hun eigen IL-2 produceren [51]. Desondanks kunnen ze nog wel door IL-15 gestimuleerd worden om te prolifereren [26]. De  $CD8^+$  T-cellen bij ouderen hebben een grotere capaciteit om IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  te produceren. Daarnaast behouden  $CD8^+CD28^-$  T-cellen hun cytotoxiciteit of deze neemt toe als gevolg van een hoge expressie van granzyme B en perforine [52]. Net zoals in de  $CD4^+$  T-cellen brengen de  $CD8^+CD28^-$  T-cellen de NK gerelateerde receptoren KIR en NKG2D tot expressie [51].

## 6.3 Memory T-cellen

Naast de gevolgen voor de primaire immunreactie, heeft de verminderde CD28 expressie ook effect op de secundaire immunreactie. Een toegenomen aantal  $CD28^-$  T-cellen correleert met een afgenomen aantal functioneel actieve  $CD8^+$  centrale memory T-cellen in gevaccineerde ouderen [20]. Daarnaast neemt de CTLA-4 expressie toe in ouderen, dit leidt tot een verminderde CD28 costimulatie aangezien CTLA-4 een hogere affiniteit heeft voor B7 dan CD28 [20]. Terwijl de CD28 costimulatie van memory T-cellen van belang is voor een goede secundaire T-cel respons.

#### 6.4 Oorzaken verminderde CD28 expressie

CD28 expressie is gereguleerd door een specifiek CD28 initiatie complex, deze bevat de kerneiwitten nucleolin en hnRPD. Replicatieve senescence en chronische blootstelling aan TNF- $\alpha$  leiden tot een verlies van dit initiatie complex in T-cellen [41, 53]. De herhaalde antigeen stimulatie, die leidt tot replicatieve senescence, wordt onder andere bewerkstelligd door het Cytomegalovirus (CMV), wat een persisterende infectie veroorzaakt in mensen [21]. T-cellen zijn essentieel voor het controleren van de virus infecties. Een CMV infectie leidt tot veranderingen in het CD8<sup>+</sup> T-cel repertoire en tot een accumulatie van CD8<sup>+</sup> T-cellen met een CD28<sup>-</sup> fenotype [21]. Deze T-cellen zijn specifiek voor de Cytomegalovirus (CMV) antigenen [24]. Maar het verlies van CD28 komt niet alleen door herhaalde TCR activatie. Zo leidt chronische blootstelling aan TNF- $\alpha$  tot de onderdrukking van de transcriptie activiteit van de gen promotor door de binding van nucleaire eiwitcomplexen te voorkomen [53]. Daarnaast hebben recente studies bewezen dat IL-2, IL-7, IL-15 en type I IFN (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ ) het verlies van CD28 versnellen in CD8<sup>+</sup> T-cellen, die al geactiveerd zijn door de TCR [54,55]. Een andere mogelijke oorzaak van de verminderde CD28 expressie is dat CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen al hoog gedifferentieerde T-cellen zijn [56]. In de studie van Noiciari et al. vond men niet alleen CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen met expressie van CD45RO<sup>+</sup>, maar ook met expressie van CD45RA<sup>+</sup>. CD45RO<sup>+</sup> is een marker voor memory lymfocyten en CD45RA<sup>+</sup> is een marker voor naïeve lymfocyten. De gevonden T-lymfocyten waren al antigeen ervaren, ondanks hun CD45RA<sup>+</sup> fenotype. Waarschijnlijk zijn deze cellen ontstaan door een omkeer van CD45RO<sup>+</sup> naar CD45RA<sup>+</sup> en zijn daarom al antigeen ervaren. Daarnaast was in de studie van Noiciari et al. het telomeerverlies niet geassocieerd met CD28 verlies aangezien de CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> T-cellen het laagste aantal telomeer sequenties hadden. Het verlies van CD28 expressie *in vivo* lijkt dus eerder het resultaat te zijn van differentiatie dan van herhaalde antigeen stimulatie [56]. Naast het verlies van de CD28 expressie vindt er ook een accumulatie plaats van CD28<sup>-</sup> T-cellen. Een oorzaak van de accumulatie van CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen kan de afgenomen expressie van TGF- $\beta$  genen zijn [57]. De TGF- $\beta$  signaalroute is betrokken bij een aantal cellulaire processen in CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen zoals celdgroei, celdifferentiatie, apoptose inductie en cellulaire homeostase. In een studie van Cao et al. bleken verschillende genen van de TGF- $\beta$  receptor downgereguleerd op hogere leeftijd, zoals Tgfb1 en Tgfb2 en hun substraten Smad2, Smad4, en de transcriptie factor Sp1. Waardoor er minder CD28<sup>-</sup> T-cellen tot apoptose worden geïnduceerd en minder geblokkeerd worden in hun replicatie [57].

### **7. Immunosenescence en het ontstaan van auto-immuunziektes, rol van CD28**

De incidentie van auto-immuunziektes is hoger bij oudere mensen. In een studie van Weyand et al. blijkt dat reumatoïde artritis, een auto-immuunziekte, toeneemt bij hogere leeftijd en een piek heeft op 70-jarige leeftijd [58]. Immunosenescence wordt hier verantwoordelijk voor gehouden want met immunosenescence neemt de effectiviteit van het immuunsysteem af. Zo neemt de expressie van CD28 op de naïeve T-cellen af, dit heeft gevolgen voor de T-cel tolerantie voor de auto-antigenen. T-cel tolerantie wordt verkregen en niet overgeërfd. Voor de inductie en het onderhoud van tolerantie is het belangrijk dat het immuunsysteem nog

functioneel competent is. CD28<sup>-</sup> T-cellen worden veel aangetroffen bij auto-immuunziektes en lijken dus een belangrijke rol te spelen bij het falen van het zelftolerantie mechanisme. Er bestaan verschillende theorieën over de betrokkenheid van CD28 bij het ontstaan van auto-immuunziektes.

### *7.1 Occupatie immunologische niche*

Bij 33% van de patiënten met reumatoïde artritis is er een toename van het aantal CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen en bij 24% van de MS patiënten worden ook meer CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen gevonden [48]. Volgens een studie van Thewissen et al. lijken deze CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen niet autoreactief, maar aan de verhoging te zien bij deze patiënten met een auto-immuunziekte spelen ze wel een rol bij de pathologie van auto-immuunziektes [48]. In sommige individuen neemt de CD28<sup>-</sup> T-cel populatie namelijk meer dan de helft van de totale CD4<sup>+</sup> T-cel populatie in. Dit leidt tot een opvulling van de immunologische ruimte, waardoor functionele T-cellen minder signalen ontvangen, waaronder overlevingssignalen. Dit geldt ook voor de Treg cel subsets.

### *7.2 Afgenomen aantal functionerende Tregs*

Doordat de Tregs minder signalen ontvangen, is er een aantal Tregs die sub-optimaal geactiveerd is, deze hebben IL-2 nodig voor volledige suppressie van effector T-cellen [59]. Bovendien neemt tijdens immunosenescence de productie van IL-2 door CD8<sup>+</sup> T-cellen af door de verminderde expressie van CD28. Daardoor is er een afgenomen aantal functionerende Tregs bij ouderen, wat dus een mogelijke oorzaak is voor het ontstaan van meer auto-immuunziektes. Er is immers een aantal perifere CD4<sup>+</sup> T-cellen die de potentie hebben om autoreactief te zijn. Tregs voorkomen normaal dat deze cellen eigen weefsels kunnen aanvallen [60]. Daarnaast zijn de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen door de immunosenescence minder vatbaar voor de onderdrukkende effecten van Treg cellen [48]. Dit draagt mogelijk bij aan de ongecontroleerde expansie van CD28<sup>-</sup> T lymfocyten in auto-immuunziektes.

### *7.3 Verminderde gevoeligheid voor apoptose inductie*

Oligoklonale memory CD8<sup>+</sup> T-cellen zonder CD28 expressie zijn meer resistent tegen apoptose dan naïeve en centrale memory T-cellen [57]. Daarnaast zijn ook de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen resistent tegen apoptose. CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen brengen meer Bcl-2 tot expressie, wat ervoor zorgt dat deze T-cellen minder gevoelig zijn voor het terugtrekken van groeifactoren. Ook zijn deze T-cellen resistent tegen de Fas-gemedieerde apoptose. Ze falen in het degraderen van FLIP door T-cel activatie en/of IL-2 stimulatie, daardoor vindt er geen apoptose inductie plaats na Fas-ligand contact. De resistentie tegen apoptose leidt tot een accumulatie van oligoklonale T-cellen, waardoor expansie kan optreden van autoreactieve cellijnen [61,62]. Deze veranderingen in apoptose gevoeligheid van T-cellen is dus een mogelijke oorzaak van het toegenomen aantal auto-immuunziektes.

### *7.4 Telomeerlengte*

Er is een verband gevonden tussen telomeerverlies en auto-immuunziektes. Enkele theorieën gaan er vanuit dat de verminderde CD28 expressie hieraan bijdraagt doordat de CD28<sup>-</sup> T-cellen bij een chronische ontsteking perforine/granzym cytotoxiciteit en IFN- $\gamma$  secretie

vertonen [63]. Het chronische ontstekingsproces verstoort het telomeer onderhoud en dit leidt tot premature senescence. Daarnaast weerspiegelt het telomerase verlies, bij chronische T-cel stimulatie, de verminderde CD28 expressie volgens een studie van Andrews et al. In deze studie wordt beschreven dat door het verlies van CD28 costimulatie er minder serine/treonine-eiwit kinase (Akt) naar de T-cel synaps wordt aangetrokken, waardoor er minder telomerase activiteit is [63]. Akt zorgt voor een vergrote telomerase activiteit door fosforylatie van de telomerase reverse transcriptase subunit. Desondanks werd er in een onderzoek van Valenzuela et al. gevonden dat ook in de CD28<sup>+</sup> T-cel populatie er een afname is in de telomerase activiteit, afhankelijk van het aantal herhaalde antigeenstimulatie. De CD8<sup>+</sup> T-cellen verliezen hun telomerase capaciteit bij de derde antigeen stimulatie [10]. CD28 kan dus het proces van telomeerlengte verlies remmen via Akt maar niet volledig.

### *7.5 Rol van CD28 bij reumatoïde artritis*

Een voorbeeld van een auto-immuunziekte is reumatoïde artritis waarbij er ontstekingen zijn in de gewrichten. Bij reumatoïde artritis zijn er verschillende kenmerken die overeenkomen met immunosenescence. Zo zijn er grote populaties van CD4<sup>+</sup> oligoklonale T-cellen, welke geen expressie van CD28 meer hebben [64]. Deze CD28<sup>-</sup> T-cellen zijn daarnaast autoreactief en verliezen versneld hun telomeer sequenties, brengen stimulatorische KIRs tot expressie en hebben een verhoogde productie van IFN- $\gamma$ . Ook zijn ze hyperreactief met expressie van NK- en CD8-markers bij een lage dosis van TCR stimulatie, terwijl er bij de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-cellen amper een respons wordt waargenomen [64]. Dit alles lijkt op een voortijdige immunosenescence van de T-cellen. Zo worden bij jonge patiënten met reumatoïde artritis al sterk verlaagde aantallen TRECS gevonden [58]. CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen komen dus veel voor bij reumatoïde artritis en dragen waarschijnlijk bij aan de ziektemanifestaties door de hoge secretie van cytokines.

## **8. Therapie voor immunosenescence, herstel CD28 expressie**

Immunosenescence heeft vooral negatieve gevolgen voor de gezondheid van ouderen. Een in het oog springende verandering tijdens immunosenescence is de verminderde CD28 expressie, welke mede verantwoordelijk wordt gehouden voor het ontstaan van auto-immuunziekten op latere leeftijd. Het is daarom interessant om te kijken hoe de CD28 expressie hersteld kan worden en wat dit voor implicaties heeft voor de gezondheid van ouderen en of het proces van immunosenescence hiermee vertraagd kan worden.

### *8.1 IL-12 herstelt initiatie complex van CD28 en upreguleert CD161*

IL-12 is een interleukine dat het verlies van het initiatie complex van CD28 gedeeltelijk kan herstellen, en daarmee de CD28 expressie [53]. Costimulatie van de T-cel en de IL-12 receptoren induceert de transcriptie van CD28 in ongeveer 50% van de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cel lijnen [65]. De herexpressie van CD28 is functioneel en leidt ertoe dat de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen weer CD25 en CD40 ligand tot expressie brengen. De CD28 restoratie lijkt geen verandering teweeg te brengen in de expressie van KIR en NKG2D of in de secretie van perforine van 'verouderde' CD4<sup>+</sup> T-cellen [51]. Daarnaast zorgt IL-12 voor een upregulatie van het gen CD161, waarvan gesuggereerd wordt dat deze zorgt voor een toename van de

transendothele migratie van cellen onafhankelijk van chemotactische stimuli [65]. Dit kan ervoor zorgen dat CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> autoreactieve T-cellen gemakkelijker weefsels kunnen binnendringen.

### 8.2 Anti-TNF $\alpha$ therapie normaliseert CD28 expressie

In een studie van Bryl et al. werd gekeken naar de gevolgen van TNF- $\alpha$  in patiënten met reumatoïde artritis. Het immuunsysteem van patiënten met reumatoïde artritis wordt gekenmerkt door accumulatie van CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen en een opregulatie van TNF- $\alpha$ . Er werd gevonden dat de CD28 expressie verhoogd werd bij patiënten die TNF- $\alpha$  neutraliserende therapie ondergingen. Na 3 maanden was de CD28 expressie in die patiënten gelijk aan die van de gezonde controles [66]. Dit komt doordat TNF- $\alpha$  leidt tot een verlies van het CD28 initiatie complex in T-cellen. Daarnaast is een hypothese in deze studie van Bryl et al. dat de anti-TNF- $\alpha$  therapie zorgt voor een beter werkend immuunsysteem doordat de CD154 expressie hersteld wordt en TNF- $\alpha$  niet langer CD3 $\zeta$ , één van de subunits van het TCR/CD3 complex, remt [66]. Of deze therapie daadwerkelijk zorgt voor een beter werkend immuunsysteem zal nog getest moeten worden door te kijken wat op lange termijn de therapeutische effecten zijn.

### 8.3 CD28 costimulatie verhogen

De CD28 costimulatie kan verhoogd worden door een superagonist van CD28: superagonistisch CD28-specifiek monoklonaal antilichaam (supCD28 mAb) toe te dienen [67]. SupCD28 mAb stimuleert alle T-cellen om te prolifereren zowel *in vitro* als *in vivo* in afwezigheid van een TCR signaal. Er vindt een shift plaats naar een Th2 cytokine profiel; verhoogde expressie niveau's van IL-4 en IL-10 en een verminderde IFN- $\gamma$  expressie. Daarnaast is er een afname in het transcriptie niveau van perforin en granzyme B. SupCD28 mAb zorgt daarnaast voor een toename van het aantal nTregs. Dit komt mede door de verhoogde expressie van de transcriptie factor Foxp3, wat er voor kan zorgen dat naïeve T-cellen differentiëren naar nTregs. De CD28-geactiveerde Tregs inhiberen de alloreactieve T-cel respons *in vivo* in ratten [67]. SupCD28 mAb heeft een gunstig effect op het verloop en het voorkomen van auto-immuunziektes in proefdieren [68]. Een ander superagonistisch CD28-specifiek monoklonaal antilichaam: TGN1412 werd getest op mensen en leidde in alle 6 gezonde mensen in een klinische fase-I trail tot desastreuze gevolgen. Ze kregen te maken met een heftige systemische inflammatoire reactie en lymfopenie wat leidde tot multipale orgaanuitval [69]. In een studie van Muller et al. werd gevonden dat er 2 verschillende T-cel activaties zijn. De eerste T-cel activatie, die tot een cytokine storm leidde in mensen, werd niet waargenomen in ratten, wel werd er een T-cel lymfopenie in de ratten waargenomen. Daarna vond er een tweede T-cel activatie plaats die zorgde voor een expansie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs. In een studie van Gogishvili et al. is gebleken dat als ratten een superagonist van CD28 toegediend krijgen dit onmiddellijk zorgt voor een toename van het aantal Tregs, mede door de verhoogde IL-2 productie van CD4<sup>+</sup> T-cellen. De Tregs domineren daarop heel snel de reactie van de effector T-cellen op de CD28 superagonist en voorkomen zo een cytokine storm. Bij mensen domineren de Tregs niet snel genoeg de reactie van de effector T-cellen en dit leidt tot een cytokine storm [70].

#### 8.4 Abatacept remt accumulatie CD28<sup>-</sup> T-cellen

Een medicijn om de gewrichtsontsteking enigszins af remmen is Abatacept. Abatacept is een humaan fusie eiwit, wat bestaat uit een Fc-domein van een immunoglobuline dat gefuseerd is met het extracellulaire domein van CTLA-4. Dit medicijn remt de CD28-gemedieerde costimulatie [71]. Het lijkt nu vooral effectief in de beginfase van de ziekte omdat CD28 dan een grote rol speelt door de activatie van naïeve T-cellen. Daarnaast is er in het begin van de ziekte een lage frequentie van autoreactieve memory T-cellen, die door de remming van de CD28 costimulatie minder snel in aantal toenemen [71]. In een recent onderzoek van Scarsi et al. is bewezen dat het aantal circulerende CD28<sup>-</sup> T-cellen en CD8<sup>+</sup> effector T-cellen afgenomen is bij patiënten met reumatoïde artritis die behandeld zijn met Abatacept [72].

### 9. Discussie

Immunosenescence leidt tot verschillende veranderingen in het immuunsysteem. In de T-cel subset vinden er belangrijke veranderingen plaats. Door inkrimping van de thymus is er een verminderde thymopoïesis en daardoor een afname van het aantal naïeve T-cellen. Daarnaast is er bij immunosenescence een verminderde CD28 expressie op zowel de CD4<sup>+</sup> als CD8<sup>+</sup> T-cellen. Dit heeft gevolgen voor de competentie van het immuunsysteem. Zo neemt de productie van IL-2 door CD8<sup>+</sup> T-cellen af door de verminderde CD28 expressie. IL-2 is nodig voor het behoud van nTregs en *de novo* inductie van Foxp3<sup>+</sup> Tregs vanuit naïeve T-cellen. Door de verminderde CD28 expressie zijn er dus minder nTregs en houdt men het verlies van CD28 expressie ook wel verantwoordelijk voor het ontstaan van auto-immuunziekten op latere leeftijd. nTregs spelen een belangrijke rol bij het inhiberen van alloreactieve T-cel proliferatie. Herstel van CD28 zou mogelijk kunnen bijdragen aan het voorkomen van immunosenescence en daarmee gepaard gaande pathologie. Echter, de verschillende therapieën die bedacht zijn om de CD28 expressie te herstellen hebben ook tot nadelige bijwerkingen geleid. Zo blijkt met IL-12 niet alleen het initiatie complex van CD28 gedeeltelijk hersteld te worden maar wordt ook de CD161 expressie verhoogd, waardoor autoreactieve T-cellen gemakkelijker weefsels kunnen binnendringen. Daarnaast leidt herstel van de CD28 expressie niet tot een verandering in de expressie van KIR, NKG2D of in de secretie van perforine van ‘verouderde’ CD4<sup>+</sup> T-cellen, terwijl herstel van de CD28 expressie wel ervoor zorgt dat er meer Akt naar de T-cel synaps wordt aangetrokken waardoor de telomerase activiteit toeneemt. Hierdoor herkrijgen de cellen hun proliferatieve capaciteit waardoor het aantal auto-reactieve T-cellen ook kan toenemen en er meer CD4<sup>+</sup> T-cellen zijn met NK-gerelateerde receptoren, perforine/granzym cytotoxiciteit en IFN- $\gamma$  secretie. Een andere studie uitgevoerd met een CD28 superagonist leidde zelfs tot desastreuze gevolgen in mensen [69]. CD28 kan dus de al bestaande immunopathologie verergeren daarom kan het verlies van CD28 ook wel beschouwd worden als een beschermingsmechanisme van het lichaam. Door het verlies van CD28 gaat het costimulatiesignaal verloren waardoor de T-cellen minder snel geactiveerd worden en daardoor minder immunoreacties plaatsvinden ook tegen de auto-antigenen. Voor reumatoïde artritis is er zelfs een medicijn op de markt: Abatacept, dat juist de CD28-gemedieerde costimulatie blokkeert. Het vermindert op lange termijn de gewrichtsontsteking bij reumatoïde artritis [71]. Dit kan mede verklaard worden doordat er minder circulerende CD28<sup>-</sup> T-cellen en CD8<sup>+</sup> effector T-cellen zijn bij patiënten met

reumatoïde artritis die vroeg behandeld zijn met Abatacept [72]. Er vindt minder accumulatie plaats van CD28<sup>-</sup> T-cellen, wat mogelijk één van de grootste oorzaken is van het ontstaan van auto-immuunziektes op latere leeftijd. De accumulatie zorgt voor een bezetting van de immunologische niche waardoor andere T-cellen minder signalen krijgen om te overleven of te prolifereren. Hierdoor is er een verminderd aantal naïeve T-cellen en Tregs beschikbaar, die voor de tolerantie inductie zorgt. Het is interessant om te volgen wat er gebeurt met het immuunsysteem van patiënten die met Abatacept behandeld worden om zo te kunnen beoordelen of de accumulatie van CD28<sup>-</sup> T-cellen een grote rol speelt bij het ontstaan en verloop van auto-immuunziektes. Desondanks zal een therapie gericht op het voorkomen van het ontstaan van auto-immuunziektes zich nu vooral moeten bezighouden met het vertragen of voorkomen van het hele immunosenescence proces. Een therapie tegen oxidatieve stress zal hieraan bijdragen doordat het algemene verouderingsproces vertraagd wordt en daarmee ook het proces van immunosenescence. Een therapie die alleen gericht is op CD28 herstel kan leiden tot verergering van de al bestaande immunopathologie omdat het immuunsysteem een ingewikkeld en zeer sterk gereguleerd proces is. De verminderde CD28 expressie is dus niet verantwoordelijk voor het ontstaan van auto-immuunziektes en kan beschouwd worden als een protectiemechanisme van het immuunsysteem.



## Referenties

1. De la Fuente M. Role of Neuroimmunomodulation in aging. 2008. *Neuroimmunomodulation* 15: 213-223.
2. Ferguson FG, A Wikby, P Maxson, J Olsson, B Johansson: Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people : a comparison between survivors and nonsurvivors. 1995. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50:B378–B382.
3. Ogata K, N Yokose, H Tamura, E An, K Nakamura, K Dan, et al: Natural killer cells in the later decades of human life. 1997 *Clin Immunol Immunopathol* 84: 269–275.
4. Guayerbas N, M Puerto, VM, Victor J Miquel, M de la Fuente: Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. 2002. *Exp Gerontol* 37: 249–256.
5. Guayerbas N, M Catalan, VM Victor, J Miquel, M de la Fuente: Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. 2002. *Behav Brain Res* 134: 41–48.
6. Guayerbas N, M de La Fuente: An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. 2003. *Dev Comp Immunol* 27: 339–350.
7. Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of aging. 1990 *Biol Rev* 65: 375–398.
8. Zwaan BJ. Genetical and environmental aspects of ageing in *Drosophila melanogaster* an evolutionary perspective. 1993. <http://irs.ub.rug.nl/ppn/109549120>.
9. Andrews, NP, H Fujii, JJ Goronzy, CM Weyand. Telomeres and immunological diseases of aging. 2009. *Gerontology* DOI: 10.1159/000268620.
10. Valenzuela HF, RB Effros. Divergent telomerase and CD28 expression patterns in human CD4 and CD8 T-cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus. 2002. *Clinical Immunology* 105 (2): 117-125.
11. Liu, Y, NE Scharless. Tumor suppressor mechanisms in immune aging. 2009. *Current opinion in Immunology* 21: 431-439
12. Bruunsgaard H, AN Pedersen, M Schroll, P Skinhoj, BK Pedersen: Decreased natural killer cell activity is associated with atherosclerosis in elderly humans. 2001. *Exp Gerontol* 37: 127–136.
13. Molling JW, Kolgen W, MF Boomsma, H Kruijzena, CH Smorenburg, BG Molenkamp, JA Langendijk, CR Leemans, BM von Blomberg RJ, Scheper, AJ van den Eertwegh. Peripheral blood IFN-  $\gamma$  -secreting V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ NKT-cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. 2005. *Int J Cancer* 116: 87–93.
14. Solana R, E Mariani. NK and NK/T-cells in human senescence. 2000. *Vaccine* 18: 1613–1620.
15. Ogata K, E An, Y Shioi, K Nakamura, S Luo, N Yokose, S Minami, K Dan. Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people. 2001. *Clin Exp Immunol* 124: 392–397.
16. Mariani E, A Meneghetti, S Neri, G Ravaglia, P Forti, L Cattini, A Facchini. Chemokine Production by natural killer cells from nonagenarians. 2002. *Eur J Immunol* 32: 1524–1529.
17. Lung TL, M Saurwein-Teissl, W Parson, D Schonitzer, B Grubeck-Loebenstein. Unimpaired dendritic cells can be derived from monocytes in old age and can mobilize residual function in senescent T-cells. 2000. *Vaccine* 18: 1606–1612.

18. Della Bella S, L Bierti, P Presicce, R Arienti, M Valenti, M Saresella, C Vergani, ML Villa. Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. 2007. *Clin Immunol* 122: 220–228.
19. Grewe M. Chronological ageing and photoageing of dendritic cells. 2001. *Clin Exp Dermatol* 26: 608–612.
20. Boesteanu A.C., P.D. Katsikis. Memory T-cells need CD28 costimulation to remember. 2009. *Seminars in Immunology* 21: 69-77.
21. Weiskopf D, B Weinberger, B Grubeck-Loebenstein. The aging of the immune system. 2009. *European Society for Organ Transplantation* 22: 1041-1050.
22. Ostan. R, L Bucci, M Capri, S Salvioli, M Scurti, E Pini, D Monti, C Franceschi. Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. 2008. *Neuroimmunomodulation* 15: 224-240.
23. Pfister G, W Savino. Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoendocrine therapeutic perspective. 2008. *Neuroimmunomodulation* 15: 351-364.
24. Weng, N, AN Akbar, J Goronzy. CD28<sup>-</sup> T-cells: their role in the age-associated decline of immune function. 2009. *Trends in Immunology* 30 (7): 306-312.
25. Tsaknaridis L, L Spencer, N Culbertson, et al. Functional assay for human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells reveals an agedependent loss of suppressive activity. 2003. *J Neurosci Res* 74: 296-308.
26. Godlove J, WK Chiu, N Weng. Gene expression and generation of CD28<sup>-</sup>CD8 T-cells mediated by interleukin 15. 2007. *Experimental gerontology* 42: 412-415.
27. Chong Y, H Ikematsu, K Yamaji, et al. CD27(+) (memory) B cell decrease and apoptosis-resistant CD27(-)(naive) B cell increase in aged humans: implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances. 2005. *Int Immunol* 17: 383-390.
28. Weksler ME, P Szabo. The effect of age on the B-cell repertoire. 2002. *J Clin Immunol* 20: 240-249.
29. Johnson SA, JC Cambier. Ageing, autoimmunity and arthritis: senescence of the B cell compartment - implications for humoral immunity. 2004. *Arthritis Res Ther* 6: 131-139.
30. Dorshkind K, E Montecino-Rodriguez, RAJ Signer. The ageing immune system: is it ever too old to become young again?. 2009. *Nature reviews Immunology* 9: 57-62.
31. Hunt KJ, M Walsh, D Voegeli, HC Robers. Inflammation in aging part 2: Implications for the health of older people and recommendations for nursing practise. 2010. *Biological Research for Nursing* 11 (3): 253-260.
32. Morley JE, RN Baumgartner, R Roubenoff, J Mayer, KS Nair. Sarcopenia. 2001. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 137: 231-243.
33. Atkinson, HH, M Cesari, SB Kritchevsky, BWJH Penninx, LP Fried, JM Guralnik et al. Predictors of combined cognitive and physical decline. 2005. *Journal of the American Geriatrics Society* 53: 1197-1202.
34. Giunta B, F Fernandez, WV Nikolic, D Obregon, E Rrapo, T Town, J Tan. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease 2008. *Journal of Neuroinflammation* 5:51.
35. Martins PN. Impact of donor and recipient age on allograft tolerance. 2009. *Exp Clin Transplant* 7 (2): 67-77.
36. Abbas AK, AH Lichtman, S Pillai. 2007. *Cellular and molecular immunology*. Elsevier. 6e druk. blz 147.

37. Chen W, W Jin, N Hardegen, KJ Lei, L Li, N Marinos, G McGrady, SM Wahl. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T-cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cells by TGF-β induction of transcription factor Foxp3. 2003. *J. Exp. Med.* 198: 1875–1886
38. Liang S, P Alard, Y Zhao, S Parnell, SL Clark, and MM Kosiewicz. Conversion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> cells into CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. 2005. *J. Exp. Med.* 201: 127–137.
39. Guo F, C Iclozan, W Suh, C Anasetti, X Yu. CD28 controls differentiation of regulatory T-cells from naïve CD4 T-cells. 2009. *The journal of Immunology* 181 (4): 2285 -2291.
40. Lohr J, B Knoechel, V Nagabhushanam, AK Abbas. T-cell tolerance and autoimmunity to systemic and tissue-restricted self-antigens. 2005. *Immunological reviews* 240: 116-127
41. Dumitri IE, ET Araguas, C Baboonian, JC Kaski. CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> T-cells in coronary artery disease: when helpers become killers. 2009. *Cardiovascular research* 81: 11-19.
42. Weyand CM, JC Brandes, D Schmidt, JW Fulbright, JJ Goronzy. Functional properties of CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T-cells in the aging immune system. 1998. *Mech Ageing Dev* 102:131–147.
43. Nakajima T, S Schulte, KJ Warrington, SL Kopecky, RL Frye, JJ Goronzy et al. T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. 2002. *Circulation* 105:570–575.
44. Namekawa T, UG Wagner, JJ Goronzy, CM Weyand. Functional subsets of CD4 T-cells in rheumatoid synovitis. 1998. *Arthritis Rheum*41:2108–2116.
45. Warrington KJ, S Takemura, JJ Goronzy, CM Weyand. CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. 2001. *Arthritis Rheum* 44:13–20.
46. Vallejo AN, M Schirmer, CM Weyand, JJ Goronzy. Clonality and longevity of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> T-cells are associated with defects in apoptotic pathways. 2000 *J Immunol* 165:6301–6307.
47. Schirmer M, AN Vallejo, CM Weyand, JJ Goronzy. Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cells from rheumatoid arthritis patients. 1998. *J Immunol* 161:1018–1025.
48. Thewissen M, V Somers, N Hellings, J Fraaussen, J Damoiseaux, P Stinissen. CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cells in autoimmune disease: Pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. 2007. *J. Immunol* 179: 6514-6523.
49. Morishita Y, H Sao, JA Hansen, PJ Martin. A distinct subset of human CD4<sup>+</sup> cells with a limited alloreactive T-cell receptor repertoire. 1989. *J Immunol* 143:2783–2789.
50. Vallejo AN, CM Weyand, JJ Goronzy. T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation persistent infection. 2004. *Trends Mol Med* 10: 119–124.
51. Vallejo AN. CD28 extinction in human T-cells: altered functions and the program of T-cell senescence. 2005. *Immunological reviews* 205: 158-169.
52. Azuma, M, Phillips, JH, Lanier, LL. CD28-T lymphocytes: antigenic and functional properties. 1993. *J. Immunol.* 150: 1147–1159.
53. Goronzy JJ, CM Weyand. T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity – catalyst of autoimmunity and chronic inflammation. 2003. *Arthritis Res Ther* 2003 5: 225-234.
54. Borthwick, NJ et al. Loss of CD28 expression on CD8(+) T-cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis. 2000. *Int. Immunol.* 12, 1005–1013.

55. Chiu, WK et al. Generation and Growth of CD28<sup>null</sup>CD8<sup>+</sup> memory T-cells mediated by IL-15 and its induced cytokines. 2006. *J. Immunol.* 177, 7802–7810.
56. Noiciari, MM, W Telford, C Russo. Postthymic development of CD28<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-cell subset: Age-associated expansion and shift from memory to naïve phenotype. 1999. *J. Immunol.* 162: 3327-3335.
57. Cao J, S Gollapudi, EH Sharman, Z Jia, S Gupta. Age-related alterations of gene expression patterns in human CD8<sup>+</sup> T-cells. 2010. *Aging cell* 9: 19-31.
58. Weyand, CM, JW Fulbright, JJ Goronzy. Immunosenescence, autoimmunity, and rheumatoid arthritis. 2003. *Experimental Gerontology* 38: 833-841.
59. Sakaguchi S, K Wing, Y Onishi, P Prieto-Martin, T Yamaguchi. Regulatory T-cells: how do they suppress immune responses?. 2009. *International Immunology*: 21 (10): 1105-1111.
60. Thewissen M, V Somers, K Venken, L Linsen, P van Paassen, P Geusens, J Damoiseaux, P Stinissen. Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease. 2007. *Clinical Immunology* 123: 209-218.
61. Hsu HC, Mountz JD. Origin of late-onset autoimmune disease. 2003. *Immunol Allergy Clin North Am* 23:65–82.
62. Ginaldi L, DeMartinis M, Monti D, Franceschi C. The immune system in the elderly: activation-induced and damage-induced apoptosis. 2004. *Immunol Res* 30:81–94.
63. Andrews, NP, H Fujii, JJ Goronzy, CM Weyand. Telomeres and immunological diseases of aging. 2009. *Gerontology* DOI: 10.1159/000268620.
64. Fath AER, D Cao, R van Vollenhoven, C Trollmo, V Malmström. CD28<sup>null</sup>CD4<sup>+</sup> T-cells- Characterization of an effector memory t-cell population in patients with rheumatoid arthritis. 2004. *Scandinavian journal of immunology* 60: 199-208.
65. Warrington KJ, AN Vallejo, CM Weyand, JJ Goronzy. CD28 loss in senescent CD4<sup>+</sup> T cells: reversal by interleukin-12 stimulation. 2003. *Blood* 101 (9): 3543-3549.
66. Bryl E, AN Vallejo, EL Matteson, JM Witkowski, CM Weyan, JJ Goronzy. Modulation of CD28 expression with anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  therapy in rheumatoid arthritis. 2005. *Arthritis & rheumatism* 52 (10): 2996-3003.
67. Kitazawa Y, M Fujino, X Li, L Xie, N Ichimaru, M Okumi, N Nonomura, A Tsujimura, Y Isaka, H Kimura, T Hünig, S Takahara. Superagonist CD28 antibody preferentially expanded Foxp3-expressing nTreg cells and prevented graft-versus-host diseases. 2009. *Cell transplantation* 18: 627-637.
68. Muller N, J van den Brandt, F Odoardi, D Tischner, J Herath, A Flügel, HM Reichardt. A CD28 superagonistic antibody elicits 2 functionally distinct waves of T cell activation in rats. 2008. *J. Clin. Invest* 118: 1405–1416
69. Hansel TT, H Kropshofer, T Singer, JA Mitchel, AJT George. The safety and side effects of monoclonal antibodies. 2010. *Nature reviews drug discovery* 9: 325-338
70. Gogishvili T, D Langenhorst, F Lühder, F Elias, K Elfein, KM Dennehy, R Gold, T Hünig. Rapid regulatory T-cell response prevents cytokine storm in CD28 superagonist treated mice. 2009. *PLoS ONE* 4(2): e4643. doi:10.371/journal.pone.0004643
71. Linsley PS, SG Nadler. The clinical utility of inhibiting CD28-mediated costimulation. 2009. *Immunological Reviews* 229: 307-321.
72. Scarsi M, T Ziglioli, P Airò. Decreased Circulating CD28-negative T cells in patients with rheumatoid arthritis treated with Abatacept are correlated with clinical response. 2010. *J Rheumatol* Mar 15 not yet published.