

Der Einfluss des koinhibitorischen Rezeptors PD-1  
(*Programmed death-1*) auf die Effizienz einer  
vakzine-induzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort

**Dissertation**

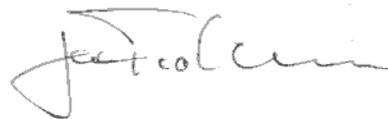
Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften,  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Kathrin Kuhlmann  
aus Herford

Hamburg, 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. T. JACOBS  
Weitere Gutachterin der Dissertation:  
Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS  
Tag der Disputation: 22. Februar 2013

Hamburg, den 07. Februar 2013

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Fromm', written in a cursive style.

Professor Dr. J. Fromm  
Vorsitzender des Promotionsausschusses  
Biologie

# EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

---

Kathrin Kuhlmann

## Danksagung

Herrn Prof. Fleischer möchte ich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Immunologie des Bernhard-Nocht-Instituts danken.

Herrn Dr. Thomas Jacobs danke ich für die gute Betreuung meiner Doktorarbeit und seine konstruktiven Anregungen sowie dafür, dass seine Tür immer offen stand.

Frau Prof. Iris Bruchhaus möchte ich für ihre Bereitschaft danken, diese Arbeit als Zweitgutachterin zu lesen und zu bewerten.

Ich möchte mich bei der ganzen Arbeitsgruppe Jacobs für das gute Arbeitsklima bedanken. Insbesondere Christiane Steeg und Iris Dethlefsen möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft danken und dafür, dass sie mich stets an ihrem gesammelten Wissen teilhaben ließen.

Dr. Susanne Tartz danke ich für das Korrekturlesen dieser Dissertation und fachlichen Rat während der Durchführung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Katja Rother, welche sich als Korrekturleserin nun zum wiederholten Male durch den Dschungel immunologischer Moleküle geschlagen hat.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem . . . . .	1
1.1.1	T-Zell-Aktivierung . . . . .	1
1.1.2	Kostimulation und Koinhibition . . . . .	4
1.1.2.1	CTLA-4 . . . . .	5
1.1.2.2	PD-1 . . . . .	6
1.1.3	<i>Memory</i> -T-Zellen . . . . .	11
1.1.4	Immunisierung durch ACT-OVA . . . . .	12
1.1.5	<i>Listeria monocytogenes</i> . . . . .	14
1.2	Fragestellung . . . . .	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Material . . . . .	17
2.1.1	Laborgeräte . . . . .	17
2.1.2	Glas- und Kunststoffware . . . . .	18
2.1.3	Chemikalien . . . . .	18
2.1.4	Material für zellbiologische Arbeiten . . . . .	19
2.1.5	Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen . . . . .	20
2.1.6	Antikörper . . . . .	22
2.1.7	Maus- und Listerienstämme . . . . .	23
2.2	Zellbiologische Methoden . . . . .	24
2.2.1	Isolation muriner Milzzellen . . . . .	24
2.2.2	Zellseparation von CD8 <sup>+</sup> OT-I WT und OT-I PD-1 ko T-Zellen . . . . .	24
2.2.3	Isolation muriner Leberlymphozyten . . . . .	25
2.2.4	Zellzählung . . . . .	25
2.2.5	Antigenspezifische Restimulation isolierter Milzzellen . . . . .	26

2.2.6	Zytotoxizitätstest . . . . .	27
2.2.7	Durchflusszytometrische Analyse . . . . .	29
2.2.8	Bestimmung des Bakterientiters . . . . .	30
2.2.9	Tierversuche . . . . .	30
2.2.9.1	Transfer von OT-I WT und OT-I PD-1 ko CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	30
2.2.9.2	Immunisierung mit ACT-OVA . . . . .	30
2.2.9.3	Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> (LmOVA) . . . . .	30
2.2.9.4	Statistische Auswertung . . . . .	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1	Transfer von OT-I PD-1 ko und OT-I WT CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in C57Bl/6-Mäuse mit anschließender Immunisierung durch ACT-OVA . . . . .	33
3.1.1	Entwicklung antigenspezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Milz im Zeitverlauf . . . . .	34
3.1.2	IFN- $\gamma$ -Sekretion restimulierter CD8 <sup>+</sup> Milzzellen nach Zelltransfer und Immunisierung . . . . .	37
3.1.3	Entwicklung antigenspezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Leber im Zeitverlauf . . . . .	39
3.1.4	Transfer von OT-I WT CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in PD-L1 ko Mäuse mit anschließender Immunisierung durch ACT-OVA . . . . .	41
3.1.5	Einfluß der PD-1-Defizienz auf die Apoptose der CD8 <sup>+</sup> T-Zell Population nach Immunisierung . . . . .	43
3.1.6	Phänotyp der CD8 <sup>+</sup> <i>Memory</i> -T-Zellen . . . . .	45
3.1.6.1	Phänotyp der CD8 <sup>+</sup> <i>Memory</i> -T-Zellen aus der Milz . . . . .	45
3.1.6.2	Phänotyp der CD8 <sup>+</sup> <i>Memory</i> -T-Zellen aus der Leber . . . . .	46
3.1.6.3	Multizytokinproduktion restimulierter CD8 <sup>+</sup> Milzzellen . . . . .	47
3.2	Funktionalität der persistierenden CD8 <sup>+</sup> <i>Memory</i> -Population . . . . .	48
3.2.1	Zytotoxizitätstest . . . . .	49
3.2.2	Infektion immunisierter C57Bl/6-Mäuse mit <i>Listeria monocytogenes</i>	51
3.2.2.1	Bestimmung der bakteriellen Last nach Listerieninfektion immunisierter Mäuse . . . . .	51
3.2.2.2	Bestimmung antigenspezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach Listerieninfektion immunisierter Mäuse . . . . .	53

3.3	Applikation eines anti-PD-1-Antikörpers mit nachfolgendem OT-I T-Zell-Transfer und Immunisierung . . . . .	55
3.3.1	Blockade von PD-1 durch einen anti-PD-1-Antikörper vor dem T-Zell-Transfer . . . . .	56
3.3.2	Blockade von PD-1 durch einen anti-PD-1-Antikörper an Tag 5 nach Immunisierung . . . . .	59
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1	Der Einfluss des Rezeptors PD-1 auf die vakzine-induzierte CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Antwort . . . . .	62
4.2	Einfluss der PD-1 Defizienz auf die Entstehung und Differenzierung des <i>Memory</i> -Kompartments . . . . .	66
4.3	Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> . . . . .	67
4.4	Blockade von PD-1 durch den Antikörper anti-PD-1 8A7 . . . . .	68
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
	<b>Abstract</b>	<b>73</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACT	<i>B. pertussis</i> Adenylatcyclase
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BcL-X <sub>L</sub>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BCR	B-Zell-Rezeptor ( <i>B cell receptor</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
BTLA	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)
CCR7	<i>C-C chemokine receptor type 7</i>
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene ( <i>cluster of differentiation</i> )
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester
cSMAC	Supramolekulares Aktivierungscluster
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
DCs	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DPC	Distaler Polkomplex
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
IRF-1	<i>IFN regulatory factor-1</i>
IS	Immunologische Synapse
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
ITSM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>
i.v.	Intravenös
kD	Kilodalton
ko	<i>Knockout</i>
Lck	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
L	Liter
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MTOC	Mikrotubuläres Organisationscenter
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PD-L2	<i>Programmed death-ligand 2</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an $\text{H}_3\text{O}^+$
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Protein-Kinase C
PP2A	Protein Phosphatase 2
pSMAC	Peripheres supramolekulares Center
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SH2	<i>Src homology 2</i>
SHP-1	<i>Src homology phosphatase-1</i>
SHP-2	<i>Src homology phosphatase-2</i>
SLE	Systemischer <i>Lupus erythematoses</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
$T_{CM}$	Zentrale <i>Memory</i> -Zellen
$T_{EM}$	Effektor- <i>Memory</i> -Zellen
Th	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TRM	<i>Resident memory T cells</i>
WT	Wildtyp
ZAP-70	Tyrosin-Phosphatase ( <i><math>\zeta</math>-associated protein of 70kD</i> )

# 1 Einleitung

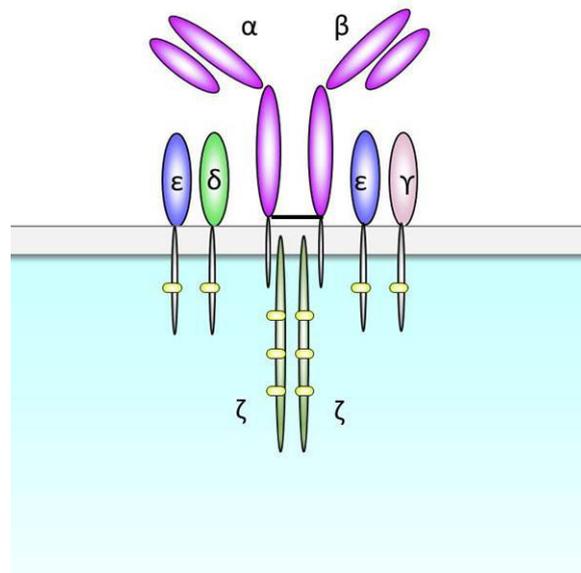
## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem dient sowohl der Abwehr extrinsischer Pathogene, deren Eindringen und Vervielfältigung eine Bedrohung für den menschlichen Organismus darstellt, als auch der Regulation intrinsischer Abläufe. Während die angeborene Immunantwort die erste Verteidigungslinie im Kampf gegen Eindringlinge darstellt, ist die adaptive Immunantwort in der Lage sowohl kurz- als auch langfristige Protektion bereitzustellen. Hierbei ist es essenziell, dass die Balance zwischen der Immunantwort gegen Pathogene einerseits und dem Auslösen von Immunpathologien andererseits gewahrt bleibt. Während der Immunantwort kommt es zu einem Zusammenspiel von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellpopulationen, welche sich in ihrer Wirkung ergänzen. Eine dieser Populationen ist die der  $CD8^+$  T-Zellen, deren Aktivierung und Differenzierung im Kontext der Koinhibition im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde.

### 1.1.1 T-Zell-Aktivierung

$CD8^+$  T-Zellen sind Teil der adaptiven Immunantwort und stellen eine der Hauptpopulationen der Immunzellen dar. Sie entstehen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks, durchlaufen in ihrer Entwicklung den Thymus und die dort stattfindende positive und negative Selektion um dann als naive reife T-Zelle in der Peripherie zu zirkulieren. Zur Aktivierung der T-Zelle wird die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) an den MHC-Klasse I Antigenkomplex auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ) benötigt. Der TCR ist ein Heterodimer, welches aus zwei transmembranständigen Polypeptidketten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) besteht, die kovalent durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Der TCR erkennt sowohl Epitope der MHC-Moleküle als auch das daran gebundene Antigen. Während

der Antigenerkennung kommt es zur Bildung des TCR-Komplexes, der neben dem TCR aus CD3 und  $\zeta$  besteht, welche nichtkovalent an das TCR- $\alpha\beta$ -Heterodimer assoziiert sind. CD3 besteht aus drei Proteinen ( $\gamma, \delta$  und  $\epsilon$ ), welche identisch in allen T-Zellen unabhängig von deren Spezifität vorliegen. Die zytoplasmatischen Domänen von  $\gamma, \delta$  und  $\epsilon$  weisen je ein, die zytoplasmatische Domäne von  $\zeta$  je drei ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) auf. Jeder T-Zell-Rezeptor-Komplex besteht aus einem  $\alpha\beta$ -Dimer, welches an jeweils ein CD3- $\gamma\epsilon$ -Heterodimer, ein CD3- $\delta\epsilon$ -Heterodimer und ein  $\zeta\zeta$ -Homodimer assoziiert ist.



**Abbildung 1.1.1: TCR-CD3-Komplex.** Der TCR-CD3-Komplex besteht aus einem TCR, welcher aus  $\alpha\beta$ -Kette besteht und an drei CD3-Dimere bindet. Diese sind ein CD3-Homodimer, bestehend aus zwei  $\zeta$ -Ketten, welche jeweils 3 ITAMS aufweisen (gelb markiert), sowie zwei CD3-Heterodimere ( $\delta\epsilon$ - und  $\gamma\epsilon$ -Heterodimer), welche jeweils ein ITAM tragen.

Neben dem TCR exprimiert die T-Zelle zusätzlich einen CD8-Rezeptor, welcher als Transmembranglykoprotein der Ig-Superfamilie angehört. Die meisten CD8-Moleküle liegen als Heterodimere vor. Sie bestehen aus durch Disulfidbrücken verbundener CD8 $\alpha$ - und CD8 $\beta$ -Kette. CD8 bindet während der T-Zell-Aktivierung an die nichtpolymorphe  $\alpha 3$ -Domäne der MHC-Klasse I Moleküle.

Die Erkennung des Peptid-MHC-Komplexes durch den TCR löst verschiedene strukturel-

le Reorganisationen in der T-Zelle aus. So kommt es zur Polarisierung der T-Zelle, indem das mikrotubuläre Organisationscenter (MTOC) in Richtung T-Zell/APZ-Kontaktregion rutscht. Dies scheint ein essenzieller Schritt zur Bildung der immunologischen Synapse (IS) zu sein. Diese entsteht in der Kontaktregion zwischen T-Zelle und APZ und bildet zwei konzentrische Regionen aus. Einerseits das TCR-reiche zentrale supramolekulare Aktivierungscluster (cSMAC), sowie das Integrin-reiche periphere SMAC (pSMAC), welches das cSMAC umgibt. Die genaue Bedeutung der Immunologischen Synapse ist noch unklar, jedoch wird vermutet, dass diese Region sowohl zur Verstärkung von TCR-Signalen als auch zur TCR-Degradation beiträgt. Als Drittes bildet sich der distale Polkomplex (DPC) gegenüber MTOC und IS. Vermutlich dient diese Region zur Sequestration von negativen Regulatoren um diese vom TCR-Komplex zu entfernen. Des Weiteren wird vermutet, dass der Komplex die Polarisierung von Signal-Molekülen beeinflusst, welche, in sich teilenden Zellen. Auswirkungen auf den weiteren Verlauf der T-Zell-Differenzierung haben könnten [Smith-Garvin et al., 2009].

Kommt es zur Peptid-MHC-Komplex-Erkennung durch den TCR sowie der simultanen Interaktion von CD8 mit dem MHC-Klasse I Molekül, führt dies zur Annäherung des Korezeptors CD8 inklusive seiner assoziierten Src-Kinase Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) an den TCR-Komplex. Die Kinase wird aktiviert und phosphoryliert daraufhin die Tyrosin-Reste in den ITAMS von CD3 und  $\zeta$  und startet so als frühes Signal die T-Zell-Aktivierungskaskade. Die phosphorylierten ITAMs bilden eine Andockstelle für die Tyrosin-Phosphatase ZAP-70 ( *$\zeta$ -associated protein of 70kD*). ZAP-70 hat zwei konservierte Domänen, *Src homology 2* (SH2), welche an Phosphotyrosine binden. ZAP-70 dient nun als Substrat für Lck, welches Tyrosin-Reste von ZAP-70 phosphoryliert. Die so aktivierte Tyrosin-Phosphatase aktiviert nun ihrerseits weitere zytoplasmatische Signalmoleküle. Dies führt zur Aktivierung weiterer Signalweg, welche letztendlich die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFAT, Fos, Jun und NF- $\kappa$ B bewirken und diese eine veränderte Gen-Expression in der T-Zelle induzieren [Abbas, 2010].

### **1.1.2 Kostimulation und Koinhibition**

Die Bindung des TCR-Komplexes an den MHC-Peptid-Komplex und die dadurch ausgelöste Signalkaskade würde alleine jedoch zu keiner T-Zell-Aktivierung führen. Dazu bedarf es eines weiteren Signals. Dieses wird durch die Bindung von CD28 an CD80 oder CD86 vermittelt. CD28 wird auf der T-Zelle exprimiert und ist ein membranständiges Homodimer mit einer Ig-ähnlichen Domäne. CD80 und CD86 werden auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und gehören der Ig-Superfamilie an. Sie können sowohl als Dimer als auch als Monomer vorliegen [Acuto and Michel, 2003]. CD28 kolokalisiert mit dem TCR in der zentralen Region der IS, im cSMAC, was zu einer Verstärkung der Phosphorylierung von Kinasen führt, die essenziell für die T-Zell-Aktivierung sind. Die Phosphorylierung des proximalen Motivs von CD28 via Src-Kinasen führt zur Bindung von PI3K, Grb2 und GADS, welche die Signalwege aktivieren die zur Kostimulation der T-Zell-Aktivierung führen. Ebenso kommt es zu einer Verstärkung der Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-XL [Bour-jordan et al., 2011]. Durch dieses zusätzliche zweite Signal im Zuge der Antigenerkennung kann eine sonst ausgelöste Anergie der T-Zelle vermieden und die T-Zell-Aktivierung stimuliert werden [Acuto and Michel, 2003]. Vermittelt durch diese beiden Signale tritt die T-Zelle in die Phase der klonalen Expansion ein, beginnt mit der Zytokin-Sekretion und entwickelt Effektor-Funktionen [Abbas, 2010].

Um jedoch eine angemessene Balance zwischen Toleranzinduktion einerseits und Immunpathologie andererseits zu gewährleisten, wird das Ausmaß und der Verlauf der T-Zell-Antwort durch eine Reihe weiterer Moleküle reguliert. Diese können sich sowohl stimulierend als auch inhibierend auf die betreffenden Zellen auswirken und bewirken eine weitere Modulation der T-Zell-Antwort. Zwei dieser Moleküle sind die koinhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 und PD-1, die beide der CD28-Familie angehören.

### 1.1.2.1 CTLA-4

CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) wird von T-Zellen nach deren Aktivierung exprimiert und ist ein weiterer Rezeptor für CD80 und CD86. Er weist jedoch eine höheren Affinität als CD28 für die beiden Liganden auf. Die Bindung von CTLA-4 an CD80 oder CD86 vermittelt ein negatives Signal, welches zur Inhibition oder Terminierung der T-Zell-Antwort führt [Krummel and Allison, 1995, Walunas et al., 1994]. Dies geschieht durch die Aktivierung der Protein Phosphatase 2 (PP2A), welche die Phosphorylierung von Akt und damit die weitere Signaltransduktion blockiert [Francisco et al., 2010]. Der gravierende Einfluß des von CTLA-4 vermittelten koinhibitorischen Signals zeigt sich in CTLA-4-defizienten Mäusen. Diese entwickeln einen autoimmunen Phänotyp, an welchem sie mit einem Alter von 3-4 Wochen sterben. Bedingt wird dies durch eine Störung der T-Zell-Proliferation, die mit massiver Einwanderung von Lymphozyten in Organen und deren daraus resultierender Schädigung einhergeht [Waterhouse et al., 1995]. CTLA-4 wird ebenfalls mit einer erhöhten Suszeptibilität für autoimmune Erkrankungen wie Typ-1-Diabetes und systemischem *Lupus erythematoses* (SLE) in Verbindung gebracht [Ueda et al., 2003, Cunninghame Graham et al., 2006]. Neben aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird CTLA-4 auch konstitutiv in hohem Maße auf regulatorischen T-Zellen exprimiert und unterstützt so vermutlich ihre suppressive Aktivität [Takahashi et al., 2000]. In CTLA-4-defizienten Mäusen konnte ein Einfluß auf die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen gefunden werden, die eine Verschiebung zum Th2-Phänotyp hin aufwies [Bour-Jordan et al., 2003]. Durch anti-CTLA-4-Antikörpergabe konnte eine verstärkte TH17-Differenzierung und IL-17-Produktion *in vivo* und *in vitro* ermittelt werden [Ying et al., 2010]. Durch Applikation eines humanen, monoklonalen anti-CTLA-4-Antikörpers in Phase-III-Studien konnte ein signifikanter therapeutischer Effekt in Patienten mit metastasierendem Melanom erzielt werden [Wolchok et al., 2010, Hodi et al., 2010, Robert et al., 2011].

### 1.1.2.2 PD-1

PD-1 (*programmed death-1*) ist ein Typ-I-Transmembran-Molekül welches aus 288 Aminosäuren besteht [Ishida et al., 1992, Agata et al., 1996]. Es setzt sich aus drei Domänen zusammen, einer Ig-Superfamilien-Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Domäne, welche ein ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) sowie ein ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) beinhaltet. PD-1 kommt sowohl in Menschen als auch in Mäusen vor und wird durch das *Pdcd 1* Gen kodiert. Es beinhaltet 5 Exons und liegt beim Menschen auf Chromosom 2 und in Mäusen auf Chromosom 1 [Shinohara et al., 1994]. Eine Spleißvariante von PD-1, in der das Transmembran-Domänen-kodierende Exon 3 fehlt, wurde im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis gefunden [Wan et al., 2006]. Durch Röntgen-Kristallographie konnte festgestellt werden, dass die Faltung der  $\beta$ -Faltblätter der Ig-Superfamilie zwischen PD-1 und CTLA-4 hoch konserviert ist [Zhang et al., 2004]. PD-1 liegt als Monomer vor. Ob eine Dimerisierung zur Signaltransduktion benötigt wird, ist bisher noch unklar. Die PD-1-Expression wird in aktivierten T- und B-Zellen, NKT-Zellen, Monozyten und Dendritischen Zellen (DCs) induziert [Nishimura et al., 1996, Greenwald et al., 2005]. Die PD-1-Oberflächen-Expression konnte innerhalb von 24 Stunden nach Stimulation beobachtet werden, entsprechende funktionelle Effekte waren wenige Stunden nach T-Zell-Aktivierung detektierbar [Chemnitz et al., 2004]. Die Ligation sowohl des TCR als auch des B-Zell-Rezeptors (BCR) kann zur Aktivierung der PD-1-Expression in Lymphozyten führen, wobei das Level der mRNA Expression nicht völlig mit der Protein-Expression korreliert [Agata et al., 1996]. Auch können *common- $\gamma$* -Ketten-Zytokine, sowie Interferone die Expression von PD-1 in T-Zellen verstärken [Kinter et al., 2008]. In humanen lymphoiden Geweben konnte auch eine PD-1-Expression in T-Zellen der germinalen Zentren nachgewiesen werden [Dorfman et al., 2006].

Die Hauptrolle des PD-1-Signalweges ist die negative Regulation der T-Zell-Funktion. Dies geschieht durch Bindung von PD-1 auf der T-Zelle an seine Liganden PD-L1 oder PD-L2 auf den antigenpräsentierenden Zellen. Nach der Bindung eines seiner Liganden kommt es zur Phosphorylierung an beiden intrazellulären Tyrosinen. Dem folgt die Rekrutierung der Phosphatasen SHP-1 (*Anti-Src Homology Phosphatase-1*) und SHP-2 (*Anti-Src Homology Phosphatase-2*), welche an das ITIM und ITSM von

PD-1 binden können [Okazaki et al., 2001, Sheppard et al., 2004]. Hierbei scheint das ITSM die entscheidende Rolle zu spielen, da Studien zeigen konnten, dass es ausschließlich bei mutiertem ITSM zum Funktionsverlust von PD-1 kommt [Okazaki et al., 2001, Chemnitz et al., 2004]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Bindung an SHP-2 stärker ist als an SHP-1 [Sheppard et al., 2004]. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von TCR- mit dem Peptid-MHC-Komplex zu einer Häufung von PD-1 in der Immunologischen Synapse führt, was wiederum zu einer Akkumulation von SHP-2 führen würde [Pentcheva-hoang et al., 2007]. Dies inhibiert die CD28-vermittelte PI3K-Aktivität (Phosphoinositid-3-Kinase) und Akt-Aktivität durch Dephosphorylierung nachgeschalteter Signalmoleküle. Durch die Ligation von PD-1 kommt es zur Inhibierung der Phosphorylierung von CD3 $\zeta$ , ZAP-70 und PKC $\theta$  (Proteinkinase C) [Sheppard et al., 2004, Parry et al., 2005], so dass eine der Hauptfunktionen von PD-1 in der direkten Inhibition des TCR-Signals zu liegen scheint.

Es gibt Hinweise, dass PD-1 neben der T-Zell-Proliferation auch die Induktion des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) inhibiert [Chemnitz et al., 2004]. Auch kommt es durch PD-1 bedingt zur Inhibierung der Expression von Transkriptionsfaktoren wie GATA-3, Tbet und Eomes welche mit Effektor-Funktionen assoziiert werden [Nurieva et al., 2006]. Jedoch kann ein starkes Signal ausgelöst durch CD28 oder IL-2 den inhibitorischen Effekt von PD-1 auf Proliferation, Differenzierung und Überleben von T-Zellen überlagern [Latchman et al., 2001, Freeman et al., 2000, Carter et al., 2002, Nurieva et al., 2006].

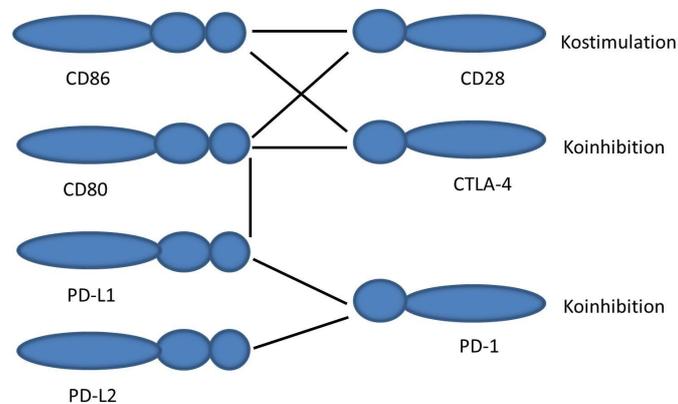
Der Einfluss von PD-1 auf B-Zellen konnte in PD-1-defizienten BALB/c-Mäusen nachgewiesen werden, die nach Immunsierung eine verringerte Anzahl an langlebigen Plasmazellen aufwiesen [Good-Jacobson et al., 2010]. Ebenfalls kam es unter PD-1-Defizienz zu einer erhöhten Anzahl follikulärer T-Helfer-Zellen mit verändertem Phänotyp, welches sich auf die Selektion von IgA-Vorläufern in germinalen Zentren auswirkte [Kawamoto et al., 2012]. In nichtlymphoiden Zellen wie Dendritischen Zellen und Monozyten konnte auch ein Einfluss der PD-1-Expression nachgewiesen werden, was Hinweise auf eine Beeinflussung der T-Zell-Antwort ohne direkte Involvierung des TCR liefert [Yao et al., 2009, Said et al., 2010].

PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) ist einer der Liganden für PD-1 [Dong et al., 1999, Freeman et al., 2000]. Er befindet sich auf Chromosom 9 im Menschen und Chromosom 19 in Mäusen. PD-L1 ist ein Typ-I-Transmembran-Molekül und besteht aus

290 Aminosäuren. Er wird durch das Gen *Cd274* kodiert und besteht aus 7 Exons. PD-L1 besitzt nur eine kurze, 30 Aminosäuren große intrazelluläre Domäne, der bisher keine Funktion zugeschrieben werden konnte [Keir et al., 2008]. Es existiert eine bekannte Spleiß-Variante für PD-L1 im Menschen, in der die IgV-Domäne, kodiert durch Exon 2, fehlt [He et al., 2005]. Bisher ist keine Funktion dieser Spleiß-Variante bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass PD-L1 und PD-L2 Varianten, die keine Bindung mit PD-1 eingehen konnten, in der Lage waren, T-Zell-Proliferation in Verbindung mit anti-CD3 zu stimulieren, dies sowohl in naiven als auch in *Pdcd<sup>-/-</sup>*-T-Zellen. Dies führte zu der Vermutung der Existenz eines weiteren Rezeptors für PD-L1 und PD-L2. PD-L1 wird konstitutiv in murinen T- und B-Zellen, Dendritischen Zellen, Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen und aus dem Knochenmark stammenden Mastzellen exprimiert [Yamazaki et al., 2002]. PD-L1 wurde ebenso auf nicht-hematopoetischen Zellen gefunden und seine Expression wird in vielen Zell-Typen nach Aktivierung hochreguliert. Sowohl IFN-Typ I als auch -Typ II bewirken eine Verstärkung der PD-L1-Expression [Eppihimer et al., 2002, Schreiner et al., 2004]. Durch Analysen des humanen PD-L1-Promoters konnten zwei IRF-1 (*IFN regulatory factor-1*) Bindungsstellen in der Nähe des Transkriptionsstartes detektiert werden, von denen die konstitutive und induzierte Expression von PD-L1 abhängt [Lee et al., 2006]. Neben der Bindung an PD-1 konnte von Butte et al. eine Bindung von PD-L1 an CD80 nachgewiesen werden, die über bidirektionale Interaktion zur Inhibition von T-Zell-Antworten führen kann [Butte et al., 2007].

PD-L2 (*programmed death-ligand 2*) ist der zweite Ligand von PD-1 [Latchman et al., 2001]. Er ist ein Typ-I-Transmembran-Molekül und wird durch das Gen *PdcdIg2* kodiert. Es liegt in unmittelbarer Nähe zum PD-L1 Gen und besitzt 7 Exons im Menschen sowie 6 in der Maus. Während PD-L2 in der Maus nur eine kurze zytoplasmatische Domäne besitzt, liegt im Menschen eine längere Domäne vor. Diese besitzt zwar keine bisher entdeckten Signal-Motive, ist aber in verschiedenen Spezies konserviert, so dass eine funktionelle Rolle nicht ausgeschlossen werden kann [Keir et al., 2008]. Es sind mehrer Spleißvarianten von PD-L2 aus humanen peripheren mononukleären Blutzellen bekannt. Diese verlieren zum Teil ihre Bindungskapazität an PD-1 bzw. liegen möglicherweise in löslicher Form vor [He et al., 2004]. Die PD-L2-Expression kann in Dendritischen Zellen, Makrophagen und aus dem Knochenmark stammenden Mastzellen induziert werden. Außerdem wird es auf einem Teil der ruhenden, peritonealen B1-Zellen exprimiert [Zhong

et al., 2007]. Es kann durch GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), IL-4 und IFN- $\gamma$  in Monozyten und Makrophagen induziert werden [Yamazaki et al., 2002, Loke and Allison, 2003].



**Abbildung 1.1.2: Übersicht der Rezeptor-Liganden-Interaktion.** CD28 bindet an CD80 und CD86 was zu einem kostimulatorischen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung führt. CTLA-4 ist ebenfalls ein Rezeptor für CD80 und C86 mit höherer Bindungsaffinität als CD28 und vermittelt ein koinhibitorisches Signal. Der Rezeptor PD-1 bindet an die Liganden PD-L1 und PD-L2 und löst dadurch auch inhibitorische Signale aus. Zusätzlich kann es zur Bindung von PD-L1 an CD80 kommen, welche ebenfalls inhibitorische Signale übermitteln kann.

Der Einfluss des PD-1-Signalweges ist in diversen Modellen muriner Erkrankungen näher untersucht worden. So beschäftigten sich einige Studien mit dem Einfluss von PD-1 auf die Entwicklung von Autoimmunität und Toleranzinduktion. Hierfür wurde das NOD-Modell gewählt, welches das murine Modell für autoimmune T-Zell-vermittelte Diabetis darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Defizienz bzw. Blockade von PD1 oder PD-L1 zu einem schnellen und starken Ausbruch von Diabetis in diesen Mäusen führte [Ansari et al., 2003, Wang et al., 2005, Fife et al., 2006]. Diese Studien konnten den großen inhibitorischen Einfluss des PD-1/PD-L1-Signalweges aufzeigen. Auch in der EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) dem murinen Modell der Multiplen Sklerose wurde durch Antikörperapplikation die Funktion von PD-1 untersucht. Es zeigte sich eine Verstärkung der Erkrankung nach Rezeptor-Blockade [Salama et al., 2003], wobei nachfolgende Untersuchungen eine Regulation in Abhängigkeit vom Maus-Stamm feststellen konnten [Zhu et al., 2006]. Auch in Modellen chronischer viraler Infektionen ist der Einfluss von PD-1 untersucht worden. In diesen Erkrankungen kommt es zur Ausbildung eines erschöpften Phänotyps der virusspezifischen T-Zellen, welche

dadurch ihre Effektor-Funktionen verlieren ohne jedoch in Apoptose zu gehen. Durch diese Unreaktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingt kann die Infektion persistieren und ihre Chronizität entwickeln [Wherry and Ahmed, 2004]. Für humane HIV-Infektionen konnte gezeigt werden, dass die PD-1-Expression mit dem Erschöpfungszustand der T-Zellen korreliert. Ebenso konnte eine Korrelation der PD-1-Expression sowohl mit der viralen Last der untersuchten Individuen als auch mit dem Fortschreiten des Krankheitsverlaufs gezeigt werden [Petrovas et al., 2006, Day et al., 2006, Trautmann et al., 2006]. In einem murinen Modell der LCMV-Infektion gelang es durch die Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion den erschöpften T-Zell-Zustand aufzuheben, gefolgt von einer Reduktion der viralen Last und verbesserten Kontrolle der Infektion [Barber et al., 2006]. Auch in bakteriellen chronischen Infektionen konnte der inhibitorische Einfluss von PD-1 nachgewiesen werden. In einer *H. pylori*-Infektion konnte durch anti-PD-L1-Antikörperapplikation eine Verbesserung der T-Zell-Proliferation und IL-2-Sekretion erzielt werden [Das et al., 2006]. In Ko-Kultivierungs-Versuchen konnte ein Einfluß von PD-L1 in *H. pylori*-Infektionen auf die Balance zwischen Effektor- und regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden [Beswick et al., 2007]. Auch im Rahmen der Immunsuppression durch Tumore ist der PD-1/PD-L1-Signalweg untersucht worden. So konnte in einer Vielzahl von Tumoren eine PD-L1-Expression nachgewiesen werden, welche in den meisten Fällen mit ungünstigen Krankheitsprognosen einherging. Die Expression von PD-L1 schien in diesen Studien das Voranschreiten der Tumorentwicklung sowie deren Ausbreitung zu begünstigen. Aufgrund der Relevanz der PD-/PD-L1-Expression in Tumorerkrankungen, kam es zur Entwicklung humaner monoklonaler anti-PD-1- sowie anti-PD-L1-Antikörper, deren Effektivität zur Zeit in klinischen Studien getestet wird. Die Pharmakodynamik, Toxizität und Sicherheit des entwickelten anti-PD-1-Antikörpers wurde in Phase-I-Studien erfolgreich getestet [Flies et al., 2011]. Die in diesen Studien erzielten Ergebnisse und die bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der klinischen Studien merkbare anti-Tumor-Aktivität führten zu Folgestudien. In diesen wurden weitere Untersuchungen zur Ermittlung der Sicherheit, maximalen Dosis und klinischen Aktivität durchgeführt [Topalian et al., 2012]. Auch eine Blockade von PD-L1 durch einen humanen, monoklonalen anti-PD-L1-Antikörper konnte bis in die Phase der klinischen Studien fortschreiten [Brahmer et al., 2012].

Im Gegensatz zu den in diesen Studien nachgewiesenen inhibitorischen Effekten, konnte in einigen Studien eine kostimulatorische Wirkung des PD-1/PD-L1-Signalweges auf

die T-Zell-Antwort nachgewiesen werden. So kam es in Studien zu Infektionen mit *Listeria monocytogenes* zu einer reduzierten Anzahl aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen und verringerter Zytokinsekretion durch anti-PD-L1-Antikörper-Applikation [Rowe et al., 2008, Seo et al., 2008]. Auch in einigen weiteren Modellen kam es zu Hinweisen auf eine kostimulatorische Funktion von PD-L1 [Dong et al., 1999, Tamura et al., 2001, Subudhi et al., 2004]. Faktoren verschiedenster Art, von einer Modulation der T-Zell-Antwort in Abhängigkeit vom Entwicklungsstatus der T-Zellen, über eine potentiell kontradiktorisch wirkende Antikörper-Applikation, bis hin zu einem potentiellen weiteren, koinhibitorisch wirkenden Rezeptor für PD-L1 könnten diese gegensätzlichen Resultate hervorgerufen haben. Dies zu ermitteln wird Gegenstand zukünftiger Studien sein.

### 1.1.3 *Memory-T-Zellen*

Während es nach T-Zell-Aktivierung zur klonalen Expansion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen kommt, treten diese im Anschluß in die Kontraktionsphase ein. Ein Teil der antigenspezifischen Population persistiert jedoch weiterhin und trägt zur Bildung des immunologischen Gedächtnisses bei. Dieses gewährleistet eine zügige Abwehr von Pathogenen und setzt sich u.a. aus CD8<sup>+</sup> *Memory-Zellen* zusammen, welche sich in zwei Hauptgruppen unterteilen lassen. Die eine Gruppe ist die der zentralen *Memory-Zellen* (T<sub>CM</sub>). Neben der Expression des Hyaluronsäurerezeptors CD44 [Pihlgren et al., 1996] und CD127 [Harty and Badovinac, 2008], deren Expression allen *Memory-Zellen* gemein ist, werden sie durch die Expression von CCR7 (*C-C chemokine receptor type 7*) und CD62L auf ihrer Oberfläche abgegrenzt [Sallusto et al., 2004]. Als *Homing*-Rezeptor vermittelt CD62L (L-Selektin) den zentralen *Memory-Zellen* den Eintritt in die Lymphknoten [Rosen, 2004], unterstützt von dem Chemokin-Rezeptor CCR7 [Potsch et al., 1999], so dass diese Teilpopulation primär in lymphoiden Organen zirkuliert [Sallusto et al., 2004]. T<sub>CM</sub> zeichnen sich durch eine schnelle Proliferation und IL-2-Produktion nach Antigenkontakt aus und können nach Differenzierung Effektor-Funktionen übernehmen. Die zweite Gruppe wird als Effektor-*Memory-Zellen* (T<sub>EM</sub>) bezeichnet. Diese exprimieren weder CCR7 noch CD62L und halten sich hauptsächlich in der Peripherie in nicht-lymphoiden Geweben auf [Sallusto et al., 2004, Masopust, 2001]. T<sub>EM</sub> besitzen zytotoxische Aktivität, produzieren Zytokine und sind in der Lage, schnell Effektorfunktionen nach Antigenkontakt auszuüben.

Die genaue Entstehung und Differenzierung des *Memory*-Kompartments konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Aus den bisherigen Erkenntnissen ließen sich zwei Modelle der *Memory*-Entwicklung ableiten. Das erste Modell geht von einer linearen Entwicklung der Zellen aus. Hiernach entstehen aus den naiven T-Zellen die T-Effektor-Zellen, gefolgt von der Stufe der  $T_{EM}$  aus denen sich letztendlich die  $T_{CM}$  bilden [Wherry et al., 2003]. Das zweite Modell geht von einer Vorläuferzelle aus, aus der sich  $T_{CM}$  bilden können, ohne die Effektor-Phase durchlaufen haben zu müssen [Manjunath et al., 2001]. Jedoch wäre auch eine Kombination beider Modelle denkbar, bei der lineare Entwicklung und direkte  $T_{CM}$ -Entstehung koexistieren würden.

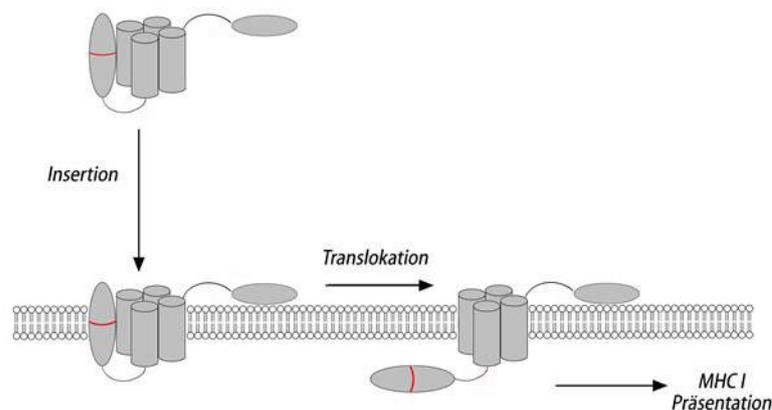
Neben den beiden bekannten Haupt-*Memory*-Populationen konnten Gebhardt et al. im Rahmen einer Herpes-Simplex-Virusinfektion eine weitere Gruppe an *Memory*-Zellen identifizieren. Sie zirkulieren nicht durch die Peripherie, sondern residieren nach Infektion dauerhaft in der Haut und den sensorischen Ganglien. Aufgrund ihres lokalen Vorkommens werden sie als *resident memory T Cells* (TRM) bezeichnet [Gebhardt et al., 2009].

### 1.1.4 Immunisierung durch ACT-OVA

Es existieren eine Vielzahl verschiedener Methoden eine T-Zell-Aktivierung durch Immunisierung auszulösen. Jedoch kann es, wie im Fall von LPS und Adjuvantien, zu einer breiten Aktivierung des Immunsystems kommen. Andere Methoden führen zwar, wie im Falle des DEC-205-Targetings, zu einem Einschleusen des gewünschten Antigens in die Dendritische Zelle [Jiang et al., 1995], sind jedoch auf *Cross*-Präsentation angewiesen und führen zur Aktivierung sowohl von  $CD8^+$  als auch von  $CD4^+$  T-Zellen.

Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vakzine ACT-OVA dagegen, kommt es ausschließlich zur Aktivierung von  $CD8^+$  T-Zellen über den MHC-Klasse I Präsentationsweg. ACT-OVA ist die genetisch veränderte Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis*. *B. pertussis* ist ein gramnegatives Stäbchenbakterium und der Erreger des *Pertussis* (Keuchhusten). Die Adenylatcyclase wird als Haupttoxin von *B. pertussis* produziert und ist ein wichtiger Faktor bei der Besiedlung des respiratorischen Traktes während einer Infektion. Sie ist bifunktional und besitzt sowohl hämolytische als auch AdenylatCyclase-Aktivität. Die Intoxikation der Zielzelle besteht aus einem zweistufigem

Mechanismus. ACT bindet an die Membran eukaryotischer Zellen, dabei weist sie eine hohe Affinität für eukaryotische, CD11b/CD18 exprimierende Zellen, wie z.B. Dendritischen Zellen auf [Ladant and Ullmann, 1999, Guermonprez et al., 2001]. Als zweiten Schritt nach der Bindung transloziert sie ihre katalytische Domäne in das Zytosol der Zielzelle. Ihre N-terminale katalytische Domäne setzt sich aus zwei Untereinheiten (T25 und T18) zusammen. Diese können mit endogenem Calmodulin (CaM) einen Komplex bilden, wodurch CaM die Katalyse von ATP (Adenosin triphosphat) zu cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) aktiviert. Aufgrund ihrer Fähigkeit, ihre katalytische Domäne direkt in das Zytosol antigenpräsentierender Zellen zu translozieren, stellt sie ein geeignetes Trägermolekül dar, um heterologe Antigene in den MHC-Präsentationsweg einzuschleusen [Ladant and Ullmann, 1999]. Gezeigt wurde dies u.a. von Tartz et al. im Rahmen einer Malaria-Immunisierung [Tartz et al., 2006, 2008]. Um die hier ungewollte, toxische Aktivität der Adenylatcyclase zu inhibieren, die aus der Anreicherung von cAMP in der Zelle resultiert, wurden zusätzlich an Position 188/189 die Aminosäuren Glycin und Phenylalanin inseriert. Das verwendete Fusionsmolekül enthält an Position 108 seiner katalytischen Domäne das SIINFEKL-Peptid des Ovalbumin-Proteins als Modellantigen.



**Abbildung 1.1.3: *B. pertussis* Adenylatcyclase.** Die Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* bindet an die Membran eukaryotischer Zellen. Es folgt die Insertion der  $\alpha$ -helikalen Strukturen der porenbildenden Domäne in die Zellmembran der Zielzelle. Anschließend kommt es zur Translokation der katalytischen Domäne in das Zytosol der Zelle und dem damit verbundenem Einschleusen von Peptidantigenen in den Klasse I-MHC-Präsentationsweg.

### 1.1.5 *Listeria monocytogenes*

Eine protektive Immunantwort auf eine Infektion mit *L. monocytogenes* ist von den Mechanismen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen abhängig, was *L. monocytogenes* zu einem beliebten Modell-Organismus zur Erforschung der T-Zell-Antwort gemacht hat.

*Listeria monocytogenes* ist ein grampositives, stäbchenförmiges Bakterium und gehört zu den *Phylum firmicutes*. Es ist fakultativ anaerob, nicht-sporenbildend und beweglich bei geringen Temperaturen. Es ist angepasst an unwirtliche Lebensumstände wie extreme pH-Werte, hohe Salzkonzentrationen und niedrige Temperaturen. Diese Anpassungsfähigkeit kann zu Nahrungsmittelkontaminationen führen welche eine Listeriose auslösen können [Cossart, 2011]. Besonders gefährdet sind hierbei schwangere Frauen, ältere Menschen und solche mit beeinträchtigtem Immunsystem. Da *Listeria monocytogenes* die intestinalen Barrieren durchqueren kann, kommt es zum Einfall des Bakteriums in das intestinale Epithelium was in einer Gastroenteritis resultieren kann. Auch besitzt *L. monocytogenes* die Fähigkeit, die fetoplazentale Barriere zu durchdringen. Dies kann zu einer Infektion des Fötus und einem septischen Abort führen. Ebenso kann das Bakterium die Blut-Hirn-Schranke durchqueren und damit Meningitis und Enzephalitis auslösen [Condotta SA, Richer MJ, Badovinac VP, 2012]. Um Folgeschäden zu vermeiden, ist eine frühzeitige Diagnose der Infektion mit Listerien essenziell. Die Infektion kann durch Gabe von Amoxicillin und Gentamicin therapiert werden [Cossart, 2011]. Jedoch nicht nur Menschen, sondern alle bisher untersuchten Mammalia zeigten sich suszeptibel für eine Listerien-Infektion [Pamer, 2004].

Zu der Gruppe der *Listeria* gehören außer *Listeria monocytogenes* noch *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*, *Listeria marthii* sowie *Listeria rocourtiaae*. Mit Ausnahme von *L. ivanovii*, welches Tiere und dabei insbesondere Wiederkäuer und Schafe infizieren kann, sind diese jedoch nicht pathogen. *Listeria monocytogenes* kann in verschiedenen Formen vorliegen. Neben einer planktonartigen Form, existieren Listerien auch als Biofilm und L-Form, welche Peptidoglykan- und Zellwand-defiziente Bakterien-Derivate sind [Cossart, 2011].

Da Mäuse bedingt durch eine Abweichung des humanen vom murinen E-Cadherin eine Resistenz gegenüber einer Infektion des Intestinums mit *Listeria Monocytogenes* aufweisen [Lecuit et al., 2001], werden die Bakterien im Labor Mäusen hauptsächlich intraperitoneal oder intravenös appliziert. Auf natürlichem Wege findet die Infektion

durch orale Aufnahme statt. Das Bakterium gelangt so in den Gastrointestinaltrakt, wo es intestinale Epithelzellen infiziert. Hierzu exprimiert das Bakterium Internalin A (InIA) auf seiner Oberfläche. Dieses interagiert mit dem auf der Epithel-Zelloberfläche exprimiertem E-Cadherin und vermittelt so das Eindringen in die Zelle [Gaillard et al., 1991]. Durch die Durchquerung der epithelialen Zellschichten gelangen die Bakterien in die Blutzirkulation und erreichen auf diesem Weg weitere Organe wie Milz und Leber. Auf Hepatozyten wird der *hepatocyte growth factor receptor* exprimiert, an welchen ein anderes Oberflächenmolekül des Bakteriums, das Internalin B (InIB) binden kann. Dies vermittelt das Eindringen in die Leberzellen [Shen et al., 2000]. In der Zelle angelangt sekretiert *Listeria monocytogenes* den Virulenzfaktor Listeriolysin O (LLO). Dieser zerstört die phagosomale Membran und ermöglicht dem Bakterium den Ausbruch aus dem Phagosom [Bielecki et al., 1990]. Im Zytosol angelangt kommt es zur polaren Expression des *actin-assembly-inducing proteins* (ActA). Dieses führt zu einer Actin-Polymerisierung, durch welches die Fortbewegung des Bakteriums durch das Zytosol der Zelle gewährleistet wird [Domann et al., 1992, Kocks et al., 1992]. Es kann so auch zu einem Eindringen in Nachbarzellen kommen. Durch erneute Produktion des LLOs, einer sekretierten Form einer Zink-Metallo-Proteinase (Mpl) sowie der phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase PlcB, kommt es zum erneuten Ausbruch aus der zweiten Vakuole [Pamer, 2004].

## 1.2 Fragestellung

Die Modulation sowohl der T-Zell-Aktivierung als auch der T-Zell-Differenzierung ist ein Faktor, der entscheidend zur Entwicklung der T-Zell-Antwort beiträgt. Durch diese Modulation wird gewährleistet, dass das Gleichgewicht zwischen der Immunantwort gegen Pathogene einerseits und dem Erhalt der Selbst-Toleranz andererseits erhalten bleibt. Hierzu tragen eine Reihe von koinhibitorischen Rezeptor-Liganden-Paaren bei. Einer dieser Rezeptoren ist PD-1, welcher auf T-Zellen nach deren Aktivierung exprimiert wird. Er bindet an seine Liganden PD-L1 und PD-L2, welche konstitutiv als auch induziert auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von PD-1 auf die Aktivierung und Differenzierung der T-Zell-Antwort untersucht werden, da wenig bekannt ist über die Rolle von PD-1 im frühen Stadium der T-Zell-Antwort.

Zur T-Zell-Aktivierung sollte eine Immunisierung mit dem SIINFEKL-Peptid des Ovalbumin-Proteins durchgeführt werden. Als Antigenträger sollte die Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* (ACT-OVA) verwendet werden. Um die Funktion von PD-1 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch untersuchen zu können, sollte vor der Immunisierung ein Transfer von PD-1defizienten OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sowie OT-I Wildtyp-Kontrollzellen, durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von PD-1 auf die Entwicklung der antigenspezifischen, aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung, sowohl im Hinblick auf ihre Anzahl als auch auf ihre Funktion hin, untersucht werden. Desweiteren sollte der Phänotyp der vakzine-induzierten, PD-1-defizienten Memory-Zellen analysiert werden.

Die Funktionalität der persistierenden Memory-Zellen sollte durch eine Infektion mit dem OVA-exprimierenden Listerien-Stamm *Listeria monocytogenes* untersucht werden.

Anschließend sollten durch die Applikation eines anti-PD-1-Antikörpers Hinweise auf eine mögliche therapeutische Anwendung der Blockade des PD-1/PD-L1-Signalweges gewonnen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage	<i>SartoriusAG</i> , Göttingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator Hera Cell 150	<i>ThermoScientific</i> , Waltham, USA
Durchflusszytometer LSRII	<i>BDBioscience</i> , Heidelberg
Durchflusszytometer C6	<i>BDBioscience</i> , Heidelberg
Inokulationsöse	<i>Greinerbio – one</i> , Frickenhausen
Invers-Mikroskop Nikon TMS	<i>NikonInstruments</i> , Badhoevedorp
MidiMacs Zellseparationssystem	<i>MiltenyiBiotec</i> , Bergisch Gladbach
Mikroskop Axiostar plus	<i>Zeiss</i> , Oberkochen
Pipetten	<i>Eppendorf</i> , Hamburg und <i>Gilson</i> , Middleton
Pipettus	<i>Abimed</i> , Langenfeld
Sterile Arbeitsbank B-[MaxPro] <sup>3</sup>	<i>Berner</i> , Elmshorn
Vortex 'MS1 Minishaker'	<i>IKALabortechnik</i> , Staufen
Wasserbad Thermomix MM	<i>B.Braun</i> , Melsungen
Wasserdeionierungsanlage	<i>SGClear</i> , Barsbüttel
Kunststoffbeutel 'Whirl-pak bag'	<i>Nasco</i> , Wisconsin, USA
Zentrifuge Centrifuge 5810R	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	<i>HeraeusInstruments</i> , Hanau

### 2.1.2 Glas- und Kunststoffware

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Einmal-Injektionskanülen (0,4 x 20 mm)	<i>Braun</i> , Melsungen
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	<i>Sarstedt</i> , Nümbrecht
FACS-Röhrchen	<i>Sarstedt</i> , Nümbrecht
Glaspipetten	<i>Brand</i> , Wertheim
MACS-Separationssäulen LS	<i>Miltenyi, Biotec</i> , Bergisch Gladbach
Neubauer Zählkammer (0,1 x 0,0025 mm <sup>2</sup> )	<i>Hecht – Assistent</i> , Sondheim
Petri-Schale	<i>Sarstedt</i> , Nümbrecht
Pipettenspitzen	<i>Greinerbio – one</i> , Frickenhausen
Spritzen 1 mL	<i>Braun</i> , Melsungen
Spritzen 5 mL	<i>Braun</i> , Melsungen
Sterilfilter (0,2 µm)	<i>Sarstedt</i> , Nümbrecht
Zellkulturplatten 96-well	<i>Greinerbio – one</i> , Frickenhausen
Zellsiebe Cell strainer (70 µm)	<i>BDBioscience</i> , Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 und 20 mL)	<i>Greinerbio – one</i> , Frickenhausen

### 2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

## 2.1.4 Material für zellbiologische Arbeiten

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Bacto Agar	<i>BDBioscience</i> , Heidelberg
Bacto Tryptic Soy Broth	<i>BDBioscience</i> , Heidelberg
Bovines Serum Albumin (BSA)	<i>ServaFeinbiochemika</i> , Heidelberg
CFSE	
Fötales Kälberserum	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Gentamicin-Lösung	<i>PAA</i> , Pasching, Österreich
GolgiStop	<i>BDBioscience</i> , Heidelberg
Incidin Liquid	<i>BDBioscience</i> , Düsseldorf
L-Glutamin	<i>PAA</i> , Pasching, Österreich
MACS CD8 <sup>+</sup> T-Zell Separations-Kit	<i>Miltenyi</i> , Bergisch Gladbach
NycoPrep Universal	<i>Axis – Shield</i> , Oslo, Norwegen
Rinderserumalbumin	<i>Serva</i> , Feinbiochemika, Heidelberg
RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	<i>PAA</i> , Pasching, Österreich
PBS	<i>PanBiotech</i> , Aidenbach
Trypanblau	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Zellfixierungslösung, “BD Cytfix / Cytoperm”	<i>BDBioscience</i> , Heidelberg
Zellpermeabilisierungslösung, “BD Perm / Wash”	<i>BDBioscience</i> , Heidelberg

## **2.1.5 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen**

### **Erythrozytenlyse-Puffer**

10% 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5)

90% 0,16 M Ammoniumchlorid

### **Facs-Puffer**

1% FCS

0,1% Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) in PBS

### **Fötale Kälberserum**

Inkubation bei 56°C für 45 min. zur Komplementinaktivierung

### **MACS-Puffer**

2 mM EDTA

0,5% BSA in 1x PBS

### **10x PBS (Phosphate Buffered Saline)**

80 g Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )

2 g Kaliumchlorid ( $\text{KCl}$ )

14,4 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

ad 1 L  $\text{dH}_2\text{O}$

pH 7,4

**RPMI 10% FCS (Vollmedium)**

500 mL RPMI 1640  
50 mL FCS  
5 mL Glutamin (200mM)  
2,5 mL Gentamicin (10 mg / mL)

**Trypanblau-Lösung**

2 mg in 100 mL PBS

**TSB-Agar**

10 g Bacto Agar  
15 g Casein- Soja-Pepton-Medium  
500 mL ddH<sub>2</sub>O

## 2.1.6 Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>
anti-CD8-eFluor450	53-6.7	<i>ebioscience, San Diego, USA</i>
anti-CD19-Fitc	1D3	<i>ebioscience, San Diego, USA</i>
anti-CD19-PE	6D5	<i>BioLegend, San Diego, USA</i>
anti-CD45-PerCP	30-F11	<i>BD Biosciences, New Jersey, USA</i>
anti-CD62L-Fitc	MEL-14	<i>BD Biosciences, New Jersey, USA</i>
anti-CD62L-PE	MEL-14	<i>BD Biosciences, New Jersey, USA</i>
anti-IFN- $\gamma$ -APC	XMG1.2	<i>BD Biosciences, New Jersey, USA</i>
anti-IFN- $\gamma$ -Fitc	XMG1.2	<i>BioLegend, San Diego, USA</i>
anti-IL-2-APC	JES6-5H4	<i>ebioscience, San Diego, USA</i>
anti-PD-1-PE	J43	<i>BD Biosciences, New Jersey, USA</i>
anti-PD-1	8A7	<i>BNI, Hamburg</i>
anti-H-2K <sup>b</sup> SIINFEKL-Pentamer-APC	Pro5 MHC	<i>ProImmune, Oxford, UK</i>
anti-H-2K <sup>b</sup> SIINFEKL-Dextramer-APC		<i>Immudex, Kopenhagen, Dänemark</i>

### 2.1.7 Maus- und Listerienstämme

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>
<i>Mus musculus</i> C57Bl/6	Charles River, Sulzfeld
<i>Mus musculus</i> C57Bl/6 PD-L1 ko	BNI, Hamburg
<i>Mus musculus</i> C57Bl/6 OT-I	BNI, Hamburg und UKE, Hamburg
<i>Mus musculus</i> C57Bl/6 OT-I PD-1 ko	UKE, Hamburg
<i>Listeria monocytogenes</i> LmOVA	UKE, Hamburg

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolation muriner Milzzellen

Zur Isolation muriner Milzzellen wurde den durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getöteten Mäusen die Milzen entnommen. Diese wurden mithilfe eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb (0,2 µm) gerieben und mit 10 mL PBS gespült. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 mL Erythrozytenlyse-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde abzentrifugiert und nach zweimaligem Waschen mit 10 mL PBS in 5 mL Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend folgte die Bestimmung der Zellzahl.

### 2.2.2 Zellseparation von CD8<sup>+</sup> OT-I WT und OT-I PD-1 ko T-Zellen

Es wurde eine Zellsuspension aus den Milzen von OT-I WT und OT-I PD-1 ko C57Bl/6-Mäusen hergestellt. Mithilfe eines MACS-Separationskits wurden anschließend die CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert. Dazu wurden je 1x10<sup>8</sup> Zellen mit einer entsprechenden Menge einer Antikörper-Suspension für 10 min bei 4°C inkubiert. Es folgte die Zugabe einer entsprechenden Menge MACS-Puffer und einer Suspension magnetischer Beads. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 4°C. Nach einem Waschschrift mit der 10fachen Menge MACS-Puffer wurden je 1x10<sup>8</sup> Milzzellen in 500 µL MACS-Puffer aufgenommen. Diese Suspension wurde auf eine, sich in einem Magnet-Feld befindliche LS-Säule gegeben. Die Separation erfolgte durch negative Selektion. Hierbei werden alle Zellpopulationen, außer der gewünschten, mit Antikörpern markiert. An diese Antikörper werden im zweiten Inkubationsschritt magnetische Beads gekoppelt. Bedingt durch das, die Säule umgebende, Magnetfeld wurden alle antikörpermarkierten Zellen in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Säule passierten und in einem Zentrifugationsröhrchen aufgefangen wurden. Die Säule wurde drei Mal mit jeweils 3 mL MACS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung der isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

### **2.2.3 Isolation muriner Leberlymphozyten**

Zur Isolation muriner Leberzellen wurde den durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getöteten Mäusen die Leber entnommen. Diese wurde mithilfe eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb (0,2  $\mu\text{m}$ ) gerieben und mit 10 mL Zellkulturmedium gespült. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 mL Erythrozytenlyse-Puffer aufgenommen. Nach Zentrifugation und einmaligem Waschen wurden die Zellen in 1 mL FCS-freiem Zellkulturmedium aufgenommen. Es wurden 5,5 mL einer 30%igen Nycoprep-Verdünnung hinzugefügt und die Suspension unter 2 mL FCS-freies Zellkulturmedium geschichtet. Durch die Zugabe von Nycoprep zur der Zellsuspension und der Unterschichtung unter FCS-freies Zellkulturmedium wurde ein Dichtegradient erstellt, der zur Abtrennung der Leberlymphozyten von den restlichen Zellen und Zellorganellen führt. Anschließend wurde für 20 min bei 4°C und 2500 rpm ohne Bremse der Gradient zentrifugiert. Die sich in der ringförmigen Interphase befindlichen Leberlymphozyten wurden abpipettiert und zwei Mal mit je 10 mL Zellkulturmedium gewaschen. Sie wurden anschließend in 500  $\mu\text{L}$  Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

### **2.2.4 Zellzählung**

Zur Ermittlung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Neben der Erstellung einer geeigneten Verdünnung wurde die Zell-Suspension 1:2 mit Trypanblau versetzt um die Anzahl der vitalen Zellen zu ermitteln. Durch Eindringen in die Zellmembran toter Zellen färbt dieser Farbstoff tote, nicht aber vitale Zellen selektiv blau. Die Verdünnung wurde in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellzahl je Großquadrat unter dem Mikroskop ermittelt. Der Mittelwert von 4 Großquadraten wurde, nach Multiplizieren mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor, mit  $10^4$  multipliziert, um die Zellzahl pro mL zu erhalten.

### **2.2.5 Antigen-spezifische Restimulation isolierter Milzzellen**

Zur antigen-spezifischen Restimulation wurden  $1 \times 10^6$  aus den Milzen der immunisierten Tiere isolierte Milzzellen in einem Volumen von 200  $\mu\text{L}$  Zellkulturmedium aufgenommen. Diese Suspension wurde mit 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SIINFEKL und 0,6  $\mu\text{L}$  Golgi-Stop für 4 h bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die Antigen-Zugabe führte zur Restimulation der durch die Immunsierung bereits aktivierten T-Zellen und löste eine erneute Aufnahme der Zytokinproduktion aus. Im Anschluß erfolgte die Färbung und durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion.

## 2.2.6 Zytotoxizitätstest

Zur Funktionsuntersuchung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Hierzu wurde aus den Milzen naiver C57Bl/6-Mäuse eine Milzzellsuspension hergestellt. Diese wurde halbiert und die eine Hälfte mit 1 µg/mL SIINFEKL für 45 min bei 37°C inkubiert, während die andere Hälfte unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne Peptid-Zusatz, inkubiert. Nach einem Waschschriff mit 10 mL PBS wurden die Zell-Pellets in 3 mL PBS/0,1% BSA (37°C warm) aufgenommen. Die im Vorfeld mit Peptid beladenen Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 8 µM CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester), der zweite Ansatz mit 2 µM CFSE für 2 min bei 37°C inkubiert. Bei CFSE handelt es sich um einen membrangängigen Zellfarbstoff, welcher im Zytoplasma der Zelle durch intrazelluläre Esterasen strukturell verändert wird. Dies führt zur Umwandlung in seine fluoreszente Form, welche kovalente Bindungen zu Zellstrukturen ausbildet und so in der Zelle verbleibt. Nach der Inkubation mit CFSE folgten 3 Waschschriffe mit je 10 mL PBS, wobei das PBS im Zuge des zweiten Waschschriffes vor dem Abzentrifugieren für 10 min bei 37°C auf den Zellen belassen wurde. Beide Zellsuspensionen wurden zu gleichen Teilen gemischt und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden je 1x10<sup>7</sup> Zellen / 200 µL in immunisierten Mäuse intravenös injiziert. Als Kontrolle wurde eine naive Maus verwendet. Nach 5 Stunden wurden die Tiere mithilfe von CO<sub>2</sub> getötet und die Milzen entnommen. Es folgte die Isolation der Milzzellen. Anschließend wurden die Milzzellen durchflusszytometrisch analysiert. Die zwei transferierten Zellansätze ließen sich in der durchflusszytometrischen Analyse anhand der Färbung mit unterschiedlichen CFSE-Konzentrationen wiederfinden und voneinander abgrenzen. Es wurde für jede Maus der prozentuale Anteil beider Ansätze an den Gesamtzellen ermittelt und mithilfe folgender Formel die spezifische Lyse errechnet.

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \left( 1 - \frac{CFSE_{immunisiert}^{high}/CFSE_{immunisiert}^{low}}{CFSE_{naiv}^{high}/CFSE_{naiv}^{low}} \right) \times 100$$

Da der Ansatz, welcher mit einer hohen CFSE-Konzentration gefärbt wurde, im Vorfeld mit spezifischem Antigen beladen wurde, dient dieser zur Ermittlung der zytotoxischen Funktionalität der *in vivo* persistierenden antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Über die Veränderung des Verhältnisses, der zum Zeitpunkt des Zelltransfers zu gleichen Teilen vorhandenen Zell-Ansätze, wurde die spezifische Lyse und damit die Funktionalität der

vakzine-induzierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt.

### 2.2.7 Durchflusszytometrische Analyse

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf den individuellen Eigenschaften der verschiedenen Zellpopulationen. So können Zellen aufgrund ihrer Granularität und Größe voneinander abgrenzen werden. Durch das Vorbeileiten einer Einzelzellsuspension an einem Laserstrahl, wird die Vorwärtsstreuung sowie die Seitwärtsstreuung ermittelt. Diese korrelieren mit Größe respektive Granularität der Zelle. Zusätzlich lassen sich Zellen über die Expression von Oberflächenmarkern sowie bestimmter intrazellulärer Proteine unterscheiden. Diese werden vor der Messung mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und anschließend die Absorption des Lichts bei verschiedenen Wellenlängen ermittelt.

Die Färbungen wurden in 96-well-Platten für 30 min. bei 4°C durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro well in einem Volumen von 15  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer inkubiert. Die  $K^b$ OVA-spezifischen Zellen wurden mit einem anti-H-2- $K^b$ -Pentamer bzw. anti-H-2- $K^b$ -Dextramer, welche mit dem Peptid SIINFEKL beladen waren, für 10 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach einem Waschschrift in 200  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer (1200 rpm, 4°C, 6 min.) wurden alle weiteren monoklonalen Antikörper hinzugefügt. Der Färbung schlossen sich zwei weitere Waschschrift an. Es folgte unmittelbar die durchflusszytometrische Analyse.

Zur Detektion intrazellulärer Zytokine wurden die Zellen für 15 min mit 100  $\mu\text{L}$  Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience) auf Eis fixiert und permeabilisiert. Es folgten zwei Waschschrift mit 150  $\mu\text{L}$  einer Perm/Wash-Lösung. Daraufhin wurden die Zellen mit den fluoreszenzgelabelten Antikörpern 15  $\mu\text{L}$  Perm/Wash inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit 150  $\mu\text{L}$  Perm/Wash gewaschen und für die folgende durchflusszytometrische Analyse in 150  $\mu\text{L}$  Perm/Wash resuspendiert.

## 2.2.8 Bestimmung des Bakterientiters

Zur Bestimmung des Bakterientiters 3 Tage nach Infektion der immunisierten Mäuse mit LmOVA wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und Milz und Leber entnommen. Die Milzen wurden in zwei gleich große Teile geteilt und die Hälfte *pars posterior* für die durchflusszytometrische Analyse verwendet. Die Hälfte *pars anterior* wurde in einem mit 1 mL sterilem H<sub>2</sub>O gefüllten Kunststoffbeutel verwahrt. Das Milzgewebe wurde durch mechanische Disintegration zerstört und eine Suspension hergestellt. Dies führte zum Aufschluß der Zellen und der Freisetzung der Bakterien. Die Suspension wurde in einer Verdünnungsreihe in Schritten von 1:10 verdünnt und 100 µL jeder Verdünnung auf eine TSB+2% Agar-Platte aufgetragen. Die Platten wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Ermittlung der LmOVA-Kolonien je Platte und Verdünnung. Durch Multiplikation der Kolonie-Zahlen mit dem Verdünnungsfaktor wurde die Bakterienlast / Organ ermittelt.

## 2.2.9 Tierversuche

### 2.2.9.1 Transfer von OT-I WT und OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Es wurde eine Zellsuspension erstellt, welche  $3 \times 10^5$  OT-I WT bzw. OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen in 200 µL sterilem PBS enthielt. Diese wurde den Rezipienten an Tag -1 des Versuches intravenös in die Schwanzvene injiziert.

### 2.2.9.2 Immunisierung mit ACT-OVA

Die Immunisierung erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 20 µg ACT-OVA in 200 µL sterilem PBS an Tag 0 des Versuches.

### 2.2.9.3 Infektion mit *Listeria monocytogenes* (LmOVA)

Die Mäuse wurden an Tag 44 nach Immunisierung mit  $2 \times 10^7$  LmOVA intravenös infiziert. Bei LmOVA handelt es sich um einen Stamm des Bakteriums *Listeria monocytogenes*, welcher das SIINFEKL-Peptid des Ovalbumin-Proteins exprimiert und somit die benötigte Antigenpezifität aufweist.

#### **2.2.9.4 Statistische Auswertung**

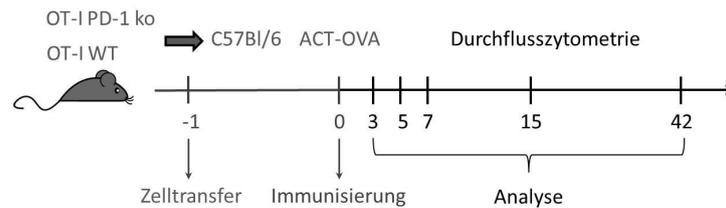
Die statistischen Auswertungen wurden alle mit der Software 'Graph Pad Prism' vorgenommen. Es wurde der *students t-test* verwendet. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

## 3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluß des koinhibitorischen Rezeptors PD-1 auf die Entwicklung der T-Zell-Population nach einer Immunisierung untersucht. Hierzu wurden aufgereinigte OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche einen transgenen T-Zell-Rezeptor exprimieren, der spezifisch für ein Epitop des Ovalbumin-Proteins ist, in C57Bl/6-Mäuse transferiert. Vergleichend wurden OT-I Wildtyp (WT) CD8<sup>+</sup> T-Zellen in C57Bl/6-Mäuse transferiert. Anschließend wurde mit dem entsprechenden Antigen (SIINFEKL-Peptid, OVA<sub>257-264</sub>) immunisiert. Als Antigenträger wurde ein ACT-OVA-Fusionsmolekül, auf Basis der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* gewählt. Als erstes wurde die Entwicklung der antigenspezifischen T-Zell-Population über einen Zeitraum von 6 Wochen verfolgt. Hierbei wurde im Besonderen die Expansion und Kontraktion der CD8<sup>+</sup>T-Zellen in Milz und Leber nach T-Zell-Aktivierung sowie die Zusammensetzung des *Memory*-Kompartments untersucht. Anschließend wurde die Funktionalität der persistierenden Memory-Population analysiert. Diese erfolgten durch einen zytotoxischen T-Zell-Versuch sowie eine Infektion mit einem SIINFEKL-exprimierenden *Listeria monocytogenes* Stamm. Abschließend wurde der Einfluss der PD-1-Blockade durch Einsatz von anti-PD-1-Antikörpern untersucht.

### 3.1 Transfer von OT-I PD-1 ko und OT-I WT CD8<sup>+</sup> T-Zellen in C57Bl/6-Mäuse mit anschließender Immunisierung durch ACT-OVA

Um zu untersuchen, ob eine Modulation der T-Zell-Population durch die Bindung von PD-1 an seine Liganden PD-L1 und PD-L2 im Rahmen einer Immunisierung erfolgt, wurden OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus OT-I-Mäusen auf C57Bl/6 Hintergrund isoliert. Diese speziellen CD8<sup>+</sup>T-Zellen exprimieren ausschließlich einen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch ein Epitop des Ovalbumin-Proteins (OVA<sub>257-264</sub>), das SIINFEKL-Peptid auf MHC-I Molekülen des Haplotyps H2-K<sup>b</sup> erkennt. Als Kontrollgruppe wurden OT-I Wildtyp CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert. Beide Ansätze wurden intravenös in die Schwanzvene von C57Bl/6-Wildtyp-Rezipienten injiziert. Am darauffolgenden Tag wurden beide Mausgruppen mit ACT-OVA immunisiert. Hierbei handelt es sich um die Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* die aus einer N-terminalen katalytischen Domäne, einer porenbildenden sowie einer Calcium-bindenden Domäne aufgebaut ist. Das hier verwendete Fusionsmolekül enthält das SIINFEKL-Peptid als Modellantigen innerhalb seiner katalytischen Domäne an Position 108. Um die hier ungewollte toxische Aktivität der Adenylatcyclase zu inhibieren, wurden zusätzlich an Position 188/189 die Aminosäuren Glycin und Phenylalanin inseriert. ACT bindet hochaffin an CD11b/CD18 exprimierende antigenpräsentierende Zellen. Dort transloziert es seine katalytische Domäne in das Zytosol der Ziel-Zelle und kann somit als Trägermolekül Modellantigene in den MHC-I-Präsentationsweg einschleusen. Die Versuche wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfer und Immunisierung beendet und beiden Mausgruppen sowohl Milz als auch Leber entnommen. Aus den Organen wurden die Lymphozyten isoliert und in durchflusszytometrischen Analysen eingesetzt.

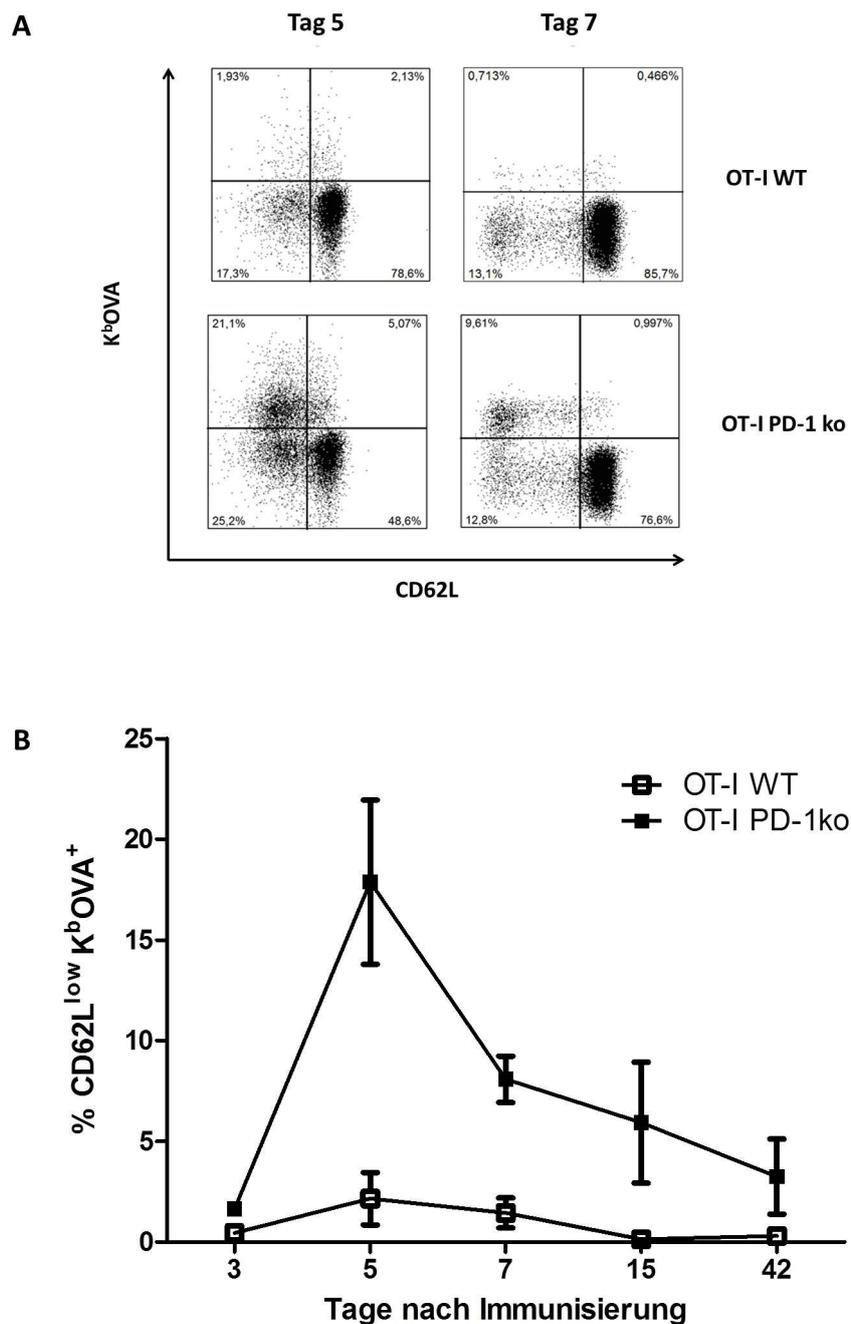


**Abbildung 3.1.1: Schema des Versuchsaufbaus.** Es wurden  $3 \times 10^5$  OT-I PD-1 ko  $CD8^+$  T-Zellen isoliert und naiven C57Bl/6-Mäusen an Tag -1 intravenös injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt  $3 \times 10^5$  OT-I WT  $CD8^+$  T-Zellen. An Tag 0 wurden beide Gruppen mit jeweils  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 3, 5, 7, 15 und 42 erfolgte die Isolation von Milz- und Leberzellen und ihre durchflusszytometrische Analyse.

### 3.1.1 Entwicklung antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen in der Milz im Zeitverlauf

Nach Entnahme der Milzen und Isolation der Milzzellen aus den immunisierten C57Bl/6-Mäusen wurden die Zellen auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Im besonderen Fokus stand hierbei die Ermittlung der antigenspezifischen und durch die Immunisierung aktivierten  $CD8^+$  T-Zellen. Hierzu wurden anti-CD45-, anti-CD8-, anti-CD19- und anti-CD62L-Antikörper sowie ein H2-K<sup>b</sup>/OVA<sub>257–264</sub>-Multimer eingesetzt und die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Nach Ermittlung der  $CD8^+$ -Population wurde diese auf Aktivierung und Antigenpezifität hin untersucht. Dies wurde zu verschiedenen Zeitpunkten von Tag 3 bis hin zu 6 Wochen nach Immunisierung durchgeführt, so dass die Expansion, Kontraktion und Persistenz der antigenspezifischen  $CD8^+$  T-Zell-Population analysiert werden konnte. Abbildung 3.1.2 stellt die Ergebnisse dieser Untersuchungen dar. Abbildung 3.1.2A zeigt exemplarisch Dot-Blots der durchflusszytometrischen Analyse, dargestellt für CD62L und K<sup>b</sup>OVA der Tage 5 und 7 nach Immunisierung. In Abbildung 3.1.2B sind die aktivierten, antigenspezifischen  $CD8^+$  Milzzellen als Zeitverlauf von Tag 3 bis Tag 42 dargestellt. Während die Frequenzen der  $CD62L^{low}K^bOVA^+CD8^+$  T-Zellen an Tag 3 noch ähnliche Werte aufweisen, kommt es an Tag 5 zu einem starken Anstieg der OT-I PD-1 ko Zellen wohingegen die OT-I WT Population im Vergleich nur minimal expandiert. Von den untersuchten Zeitpunkten stellt Tag 5 den Höhepunkt der T-Zell-Expansion dar, gefolgt von einer stetigen Abnahme beider Populationen an den darauffolgenden Tagen. Obwohl sich die Frequenz der OT-I PD-1 ko Zellen von Tag 5 auf Tag 7 um beinahe die Hälfte verringert und es auch an den folgenden Zeitpunkten

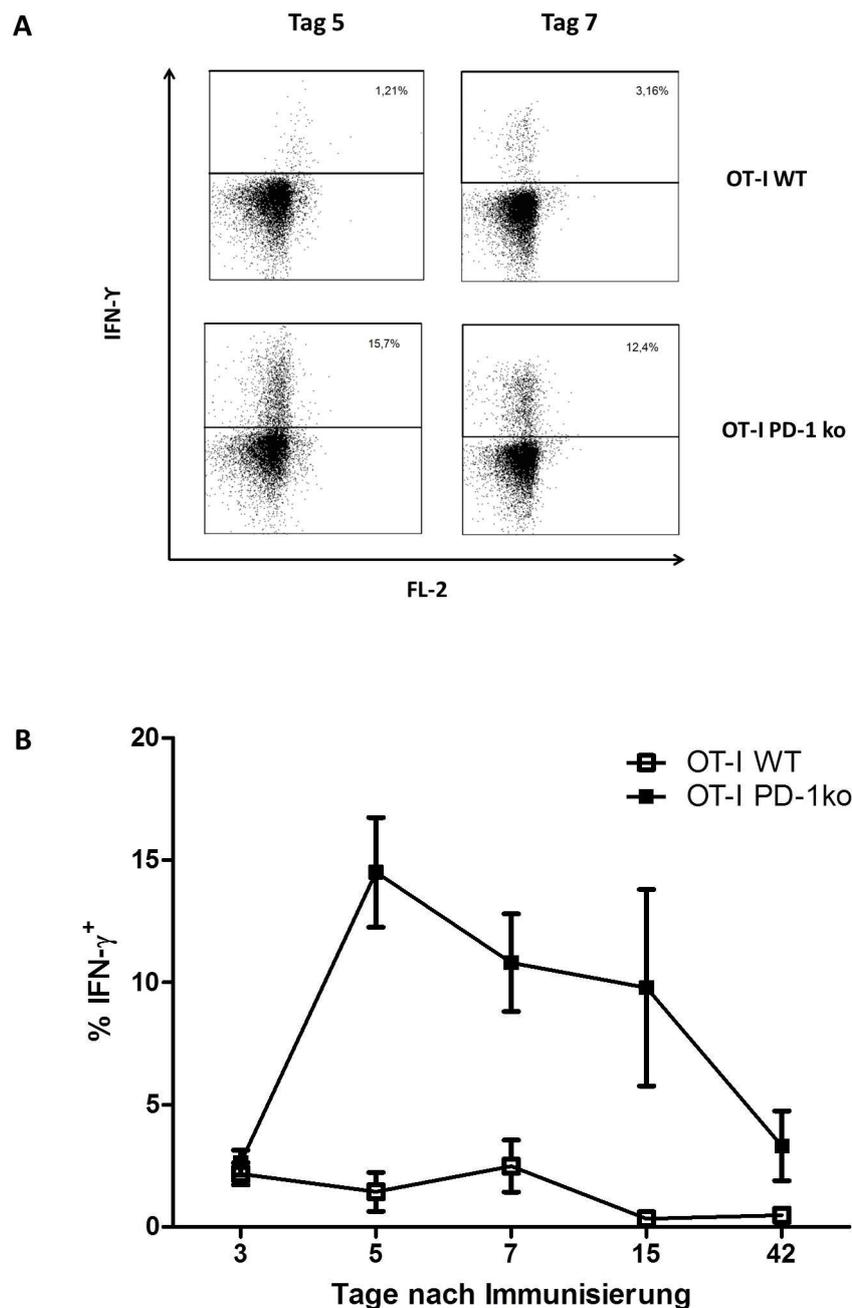
zu einer weiteren Abnahme der Population kommt, sinken die OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu keiner Zeit auf die Werte der OT-I WT Zellen herab und persistieren auch an Tag 42 noch auf einem höheren Niveau als die Vergleichsgruppe. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch die fehlende Interaktion von PD-1 mit seinen Liganden zu einem starken Anstieg der aktivierten antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach OT-I PD-1 ko Transfer und folgender Immunisierung kommt, die Bindung von PD-1 sich daher negativ auf die Proliferation bzw. möglicherweise verstärkend auf die Apoptose der antigenspezifisch aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen auswirkt.



**Abbildung 3.1.2: Anzahl der aktivierten SIINFEKL-spezifischen CD8<sup>+</sup> Milzzellen im Zeitverlauf.** C57Bl/6-Mäusen wurden  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Kontroll-Gruppe die gleiche Anzahl OT-I WT Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden beide Gruppen mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An den Tagen 3, 5, 7, 15 und 42 nach Immunisierung wurden die Milzzellen aufgereinigt und mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-, anti-CD62L-Antikörpern sowie einem H2-K<sup>b</sup>/OVA<sub>257-264</sub>-Multimer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A** zeigt exemplarische Färbungen von OT-I PD-1 ko Milz-Lymphozyten (untere Reihe) sowie von OT-I WT Milz-Lymphozyten (obere Reihe) der Tage 5 und 7. Dargestellt ist die CD62L K<sup>b</sup>OVA-Färbung von CD8<sup>+</sup> Zellen. **B** Die Abbildung zeigt den Zeitverlauf der aktivierten antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz der immunisierten Mäuse über die Tage 3, 5, 7, 15 und 42. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD der Mäuse einer Gruppe (n=5).

### 3.1.2 IFN- $\gamma$ -Sekretion restimulierter CD8<sup>+</sup> Milzzellen nach Zelltransfer und Immunisierung

Neben der Bestimmung der Anzahl der antigenspezifisch aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen mithilfe eines K<sup>b</sup>OVA Multimers wurde parallel die IFN- $\gamma$ -Sekretion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert. Dazu wurden 1x10<sup>6</sup> der aus der Milz isolierten Zellen für 4 Stunden unter Zugabe von SIINFEKL antigenspezifisch restimuliert. Es folgte eine Oberflächenfärbung durch anti-CD45-, anti-CD19- und anti-CD8-Antikörper sowie eine intrazelluläre Färbung durch einen anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper. Anschließend wurden die Lymphozyten im Durchflusszytometer analysiert. Abbildung 3.1.3 A stellt exemplarisch die IFN- $\gamma$ -Sekretion der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population an den Tagen 5 und 7 nach Immunisierung dar. Die obere Reihe zeigt die OT-I WT-, die untere Reihe die OT-I PD-1 ko Zellen. Abbildung 3.1.3 B fasst die IFN- $\gamma$ -Produktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen über einen Zeitraum von Tag 3 bis Tag 42 als Zeitverlauf zusammen. Auch hier zeigt sich, dass an Tag 3 nach Immunisierung ungefähr gleiche Anteile beider Zellpopulationen vorlagen. Die Zytokinproduktion der Kontrollgruppe hält dieses Niveau mit nur kleineren Abweichungen bis Tag 7, um bis Tag 15 auf einen leicht niedrigeren Wert abzufallen und auf diesem Niveau bis Tag 42 zu stagnieren. Die IFN- $\gamma$ -Produktion der Gruppe, welcher OT-I PD-1 ko T-Zellen transferiert wurden, hingegen steigt bis Tag 5 um ein Vielfaches an und fällt dann über die analysierten Zeitpunkte hin langsam ab. Aber auch hier ist analog zu Abbildung 3.1.2 zu sehen, dass an Tag 42 sich die IFN- $\gamma$ -Produktion der Knockout-Zellen auf einem bedeutend höheren Niveau befindet als die Zytokin-Produktion der Kontrollzellen. Auch durch die Analyse der IFN- $\gamma$ -Sekretion konnte der inhibitorische Einfluß von PD-1 auf die Expansion der aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden. Analog zu dem Anstieg der antigenspezifischen aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Abbildung 3.1.2 konnte eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Sekretion detektiert werden. Zwar konnten in dieser Untersuchung die antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht durch einen entsprechenden Antikörper bestimmt werden, da jedoch antigenspezifisch restimuliert wurde, ist davon auszugehen, dass die detektierte IFN- $\gamma$ -Sekretion primär von durch die Immunisierung aktivierten antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen stammt. Dies wird auch durch den analogen Verlauf der CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Abbildung 3.1.2 unterstützt, da der Anstieg der entsprechenden antigenspezifisch aktivierten Zellen mit einem Anstieg der IFN- $\gamma$ -Sekretion einhergeht.



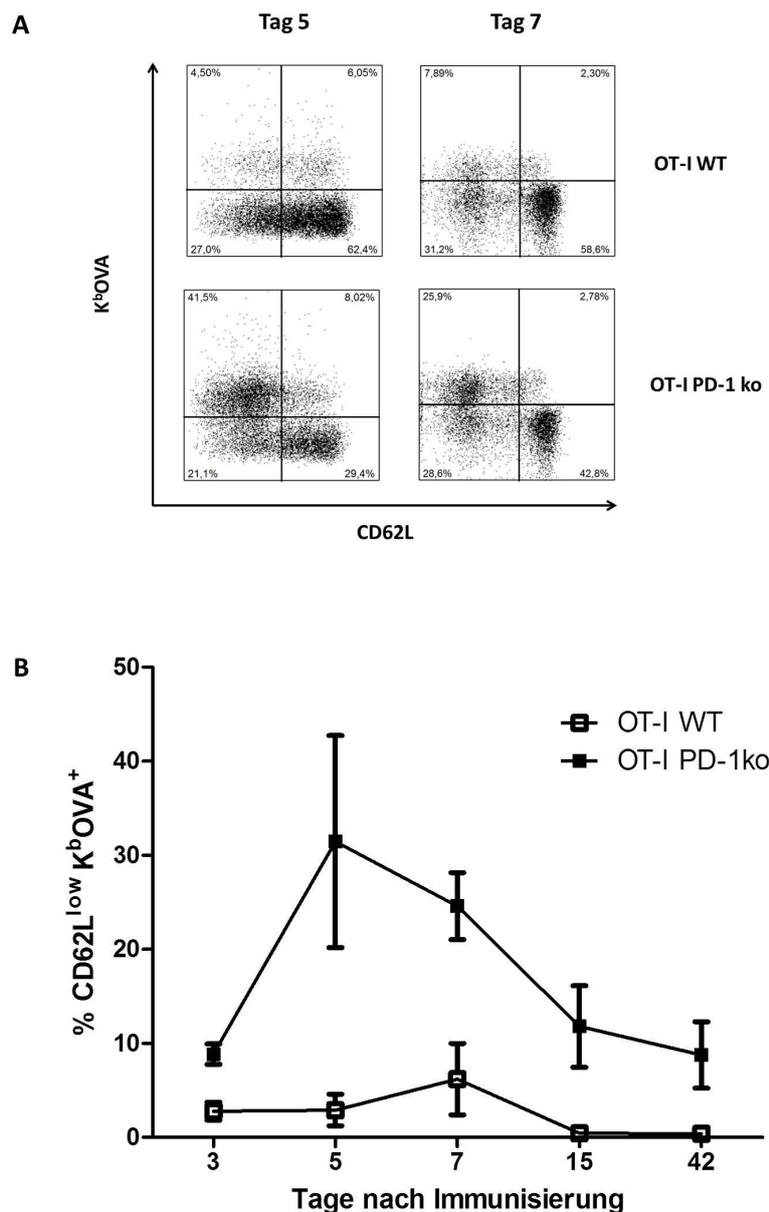
**Abbildung 3.1.3: IFN- $\gamma$ -Produktion restimulierter CD8<sup>+</sup> Milzzellen nach Zelltransfer und Immunisierung im Zeitverlauf.** C57Bl/6-Mäusen wurden  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Kontroll-Gruppe die gleiche Anzahl OT-I WT Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden beide Gruppen mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An den Tagen 3, 5, 7, 15 und 42 nach Immunisierung wurden die Milzzellen aufgereinigt und für 4 h durch Zugabe von  $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$  SIINFEKL-Peptid antigenspezifisch restimuliert. Anschließend wurden sie mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-Antikörpern extrazellulär, sowie einem anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

**A** zeigt exemplarische Färbungen von OT-I PD-1 ko Milz-Lymphozyten (untere Reihe) sowie von OT-I WT Milz-Lymphozyten (obere Reihe) der Tage 5 und 7. Dargestellt ist die IFN- $\gamma$ -Färbung von CD8<sup>+</sup> Zellen.

**B** Die Abbildung zeigt den Zeitverlauf der IFN- $\gamma$ -Sekretion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz der immunisierten Mäuse über die Tage 3, 5, 7, 15 und 42. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD der Mäuse einer Gruppe (n=5).

### **3.1.3 Entwicklung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Leber im Zeitverlauf**

Zusätzlich zur Analyse der CD8<sup>+</sup>T-Zellen aus den Milzen der immunisierten Mäuse wurden die Lebern entnommen und die Lymphozyten isoliert. Die Leber nimmt eine Sonderstellung unter den Organen ein. Bedingt durch ihre vielfältigen Aufgaben und ihre Physiologie kommt es zu einem steten Ausbalancieren von Toleranzinduktion und Aktivierung einer Immunantwort. Die aus den Lebern der immunisierten Mäuse aufgereinigten Lymphozyten wurden analog zu den analysierten Milzzellen mit anti-CD45-, anti-CD19, anti-CD8- und anti-CD62L-Antikörpern sowie einem K<sup>b</sup>OVA-Multimer markiert und auf die Anwesenheit aktivierter antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 3.1.4 dargestellt.



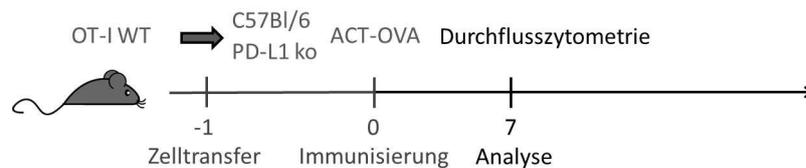
**Abbildung 3.1.4: Entwicklung der aktivierten SIINFEKL-spezifischen CD8<sup>+</sup> Leberzellen im Zeitverlauf.** C57Bl/6-Mäusen wurden  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Kontroll-Gruppe die gleiche Anzahl OT-I WT Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden beide Gruppen mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An den Tagen 3, 5, 7, 15 und 42 nach Immunisierung wurden die Leber-Lymphozyten aufgereinigt und mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-, anti-CD62L-Antikörpern sowie einem H2-K<sup>b</sup>/OVA<sub>257-264</sub>-Multimer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A** zeigt exemplarische Färbungen von OT-I PD-1 ko Leber-Lymphozyten (untere Reihe) sowie von OT-I WT Leber-Lymphozyten (obere Reihe) der Tage 5 und 7. Dargestellt ist die CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA-Färbung von CD8<sup>+</sup> Zellen. **B** Die Abbildung zeigt den Zeitverlauf der aktivierten antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber der immunisierten Mäuse über die Tage 3, 5, 7, 15 und 42. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD der Mäuse einer Gruppe (n=5).

Abbildung 3.1.4 A zeigt exemplarische Färbungen der isolierten Leber-Lymphozyten der Analysezeitpunkte Tag 5 und 7 nach Immunisierung. Dargestellt ist die Anzahl der  $CD62L^{low} K^bOVA^+CD8^+$  T-Zellen. Abbildung 3.1.4 B stellt die Frequenzen der aktivierten antigenspezifischen  $CD8^+$  T-Zellen als Zeitverlauf von Tag 3 bis Tag 42 nach Immunisierung dar. Es wird ersichtlich, dass die OT-I PD-1 ko-Population an Tag 3 bereits wesentlich stärker expandiert ist, als die OT-I WT-Kontrollgruppe. Diese Entwicklung erreicht an Tag 5 der analysierten Zeitpunkte ihren Höhepunkt, an dem die aktivierten antigenspezifischen  $CD8^+$  T-Zellen mit durchschnittlich 30% einen großen Teil der Gesamtpopulation der  $CD8^+$  T-Zellen ausmachen. Zwar treten die Zellen auch hier in die Kontraktionsphase ein und ihre Anzahl verringert sich über die nächsten drei Analysezeitpunkte, persistiert an Tag 42 jedoch auf einem im Vergleich zur WT-Gruppe hohen Niveau. Die Zellen expandieren bis Tag 7 und geht dann in die Kontraktionsphase über, erreicht jedoch nie die Frequenzen der OT-I PD-1 ko  $CD8^+$  T-Zellen. Auch bei der Analyse der Leberlymphozyten ist ein starker Anstieg der aktivierten antigenspezifischen OT-I PD-1 ko  $CD8^+$  T-Zellen sichtbar, der an Tag 5 seinen Höhepunkt erreicht. Zwischen diesem und dem folgenden Zeitpunkt (Tag 7) setzt die Kontraktionsphase ein und die Anzahl der Zellen reduziert sich, persistiert aber bis hin zum letzten Analysezeitpunkt auf vergleichsweise hohem Niveau. Diese Ergebnisse verlaufen analog zu den vorhergehenden Experimenten aus 3.1.1 und 3.1.2 und unterstützen so die These einer inhibitorischen Funktion von PD-1 im Rahmen der T-Zell-Entwicklung nach Zelltransfer und Immunisierung.

### **3.1.4 Transfer von OT-I WT $CD8^+$ T-Zellen in PD-L1 ko Mäuse mit anschließender Immunisierung durch ACT-OVA**

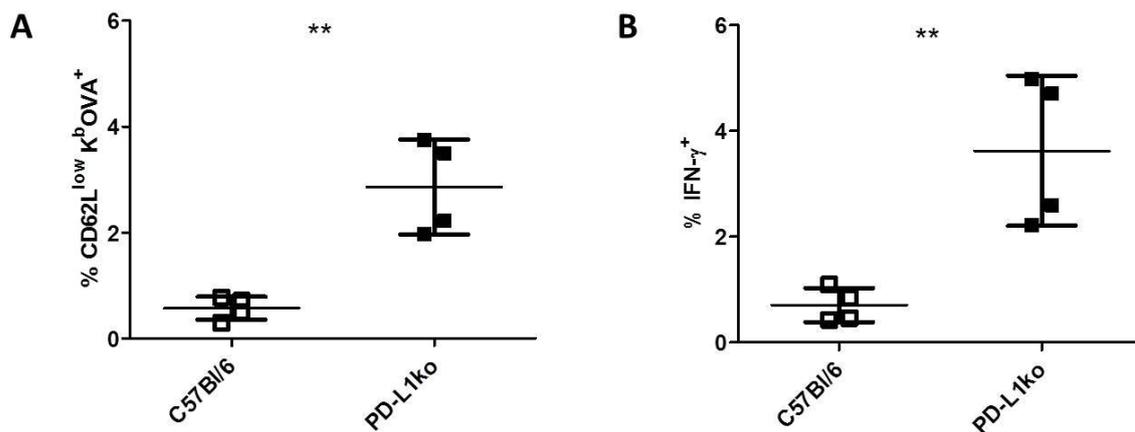
Um sicherzustellen, dass die in den vorherigen Abschnitten dargestellten Ergebnisse tatsächlich auf der Blockade der Bindung von PD-1 an seine Liganden beruhen und nicht die Effekte möglicher kompensatorischer Mechanismen sind, die durch den vollständigen Knockout von PD-1 auf den OT-I  $CD8^+$  T-Zellen resultieren, wurde der Versuchsaufbau modifiziert. Wie in Abbildung 3.1.5 dargestellt, wurden an Tag -1  $CD8^+$ T-Zellen aus den Milzen von OT-I WT Mäusen isoliert und in naive PD-L1 ko-Mäuse auf C57Bl/6-Hintergrund intravenös injiziert. Die Kontrollgruppe bestand aus naiven C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen denen ebenfalls  $CD8^+$ OT-I WT Zellen verabreicht wurden. An Tag 0

erfolgte für beide Gruppen die intraperitoneale Immunisierung mit ACT-OVA. An Tag 7 nach Immunisierung wurden die Milzen entfernt und die Milzzellen isoliert. Diese wurden mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8- und anti-CD62L-Antikörpern sowie einem  $K^b$ OVA-Multimer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Desweiteren wurden  $1 \times 10^6$  Milzlymphozyten für 4 Stunden antigenspezifisch mit SIINFEKL restimuliert und anschließend mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-Antikörpern extrazellulär sowie einem anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper intrazellulär gefärbt und die IFN- $\gamma$ -Sekretion mittels der Durchflusszytometrie bestimmt.



**Abbildung 3.1.5: Schema des Versuchsaufbaus.** Es wurden  $3 \times 10^5$  OT-I WT  $CD8^+$  T-Zellen isoliert und PD-L1 ko Mäusen auf C57Bl/6-Hintergrund an Tag -1 intravenös injiziert. Die Kontrollgruppe bestand aus C57Bl/6-WT Mäusen, die ebenfalls  $3 \times 10^5$  OT-I WT  $CD8^+$  T-Zellen erhielten. An Tag 0 wurden beide Gruppen mit jeweils  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 7 erfolgte die Isolation von Milz- und Leberzellen und ihre durchflusszytometrische Analyse.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 3.1.6 dargestellt. Im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe ist in den PD-L1 ko-Rezipienten eine erhöhte Anzahl antigenspezifischer aktivierter  $CD8^+$  T-Zellen zum analysierten Zeitpunkt messbar. Die gleichen Resultate wurden für die IFN- $\gamma$ -Sekretion erzielt. Während sich im Falle der  $CD62L^{\text{low}}$   $K^b$ OVA $^+$ -Zellen die Frequenz verdreifacht, liegt bei der Zytokin-Produktion sogar eine Vervierfachung im Gegensatz zur Kontrollgruppe vor. Jedoch reichen sowohl der prozentuale Anteil der antigenspezifischen T-Zellen als auch die IFN- $\gamma$ -Sekretion nicht an die Frequenzen des OT-I PD-1 ko Transfer-Experimentes zum selben Zeitpunkt heran (Abbildung 3.1.1). Durch dieses Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die erhöhten antigenspezifischen T-Zell-Frequenzen und die damit einhergehende verstärkte IFN- $\gamma$ -Sekretion tatsächlich durch die Defizienz von PD-1 bzw. PD-L1 hervorgerufen wurden.

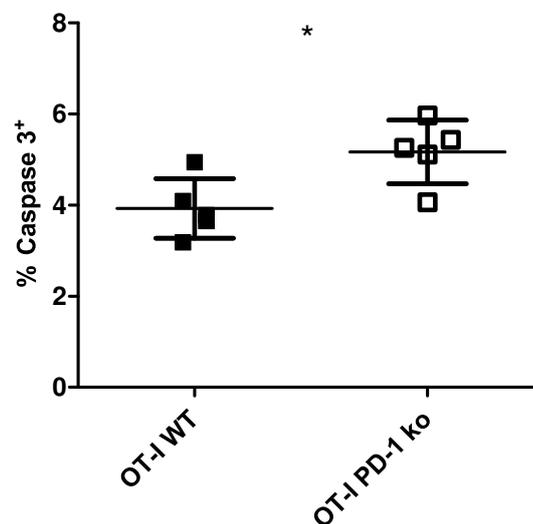


**Abbildung 3.1.6: Phänotyp der antigenspezifischen Zellen aus PD-L1 ko Mäusen nach OT-I WT-Transfer und Immunisierung.**  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I WT CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden i.v. in PD-L1 ko Mäuse injiziert. Die Kontrollgruppe bestand aus C57Bl/6-Wildtyp Mäusen und erhielt die gleiche Menge OT-I WT Zellen. Einen Tag später wurden beide Gruppen mit 20  $\mu$ g ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 7 nach Immunisierung wurden die Milzzellen aufgereinigt und mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-, anti-CD62L-Antikörpern sowie einem H2-K<sup>b</sup>/OVA<sub>257-264</sub>-Multimer gefärbt.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden für 4 h mit SIINFEKL restimuliert und anschließend mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-Antikörpern extrazellulär sowie einem IFN- $\gamma$ -Antikörper intrazellulär gefärbt. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer. **A** zeigt die Expansion der antigenspezifischen aktivierten CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA<sup>+</sup>-Zellen der CD8<sup>+</sup> T-Zell Population. **B** stellt die IFN- $\gamma$ -Sekretion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation dar. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe  $\pm$  SD an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

### 3.1.5 Einfluß der PD-1-Defizienz auf die Apoptose der CD8<sup>+</sup> T-Zell Population nach Immunisierung

Nachdem festgestellt werden konnte, dass sich PD-1 negativ auf die Expansion aktivierter CD8<sup>+</sup>T-Zellen auswirkt, sollte im folgenden Versuch festgestellt werden, ob die Defizienz von PD-1 auf den transferierten OT-Zellen Einfluß auf die Apoptose der Zellen hat. Um dies zu untersuchen wurden an Tag 3 nach Immunisierung Milzlymphozyten isoliert und mithilfe eines anti-aktive Caspase 3-Antikörpers gefärbt. Caspase 3 gehört zur Caspase-Familie der Cystein-Proteasen und ist ein Schlüsselenzym der Apoptose. Es besteht aus zwei Untereinheiten zu je 17kDa und 12kDa und wird als inaktives Pro-Enzym synthetisiert. Caspase 3 wird zu einem frühen Zeitpunkt in der apoptotischen Zelle aktiviert, dies kann sowohl durch extrinsische als auch durch intrinsische Signalwege

geschehen. Die Aktivierung geschieht durch proteolytische Spaltung an konservierten Aspartat-Resten. Durch hydrophobe Interaktionen entsteht ein Heterodimer aus großer und kleiner Untereinheit, die mit einem weiteren Heterodimer das aktive Heterotetramer bilden. Dieses kann nun durch proteolytische Spaltung weitere Caspasen des Apoptose-Signalwegs aktivieren, welches letztlich zum programmierten Tod der Zelle führt [Han et al., 1997]. Abbildung 3.1.7 stellt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Caspase 3 Aktivität dar. In beiden Gruppen konnte aktive Caspase 3 nachgewiesen werden, in den OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup>T-Zellen sogar zu einem signifikant höheren Maß. Hieraus lässt sich schließen, dass es trotz des Fehlens von PD-1 auf den transferierten T-Zellen zur Apoptose in der CD8<sup>+</sup>T-Zell-Population kommt.



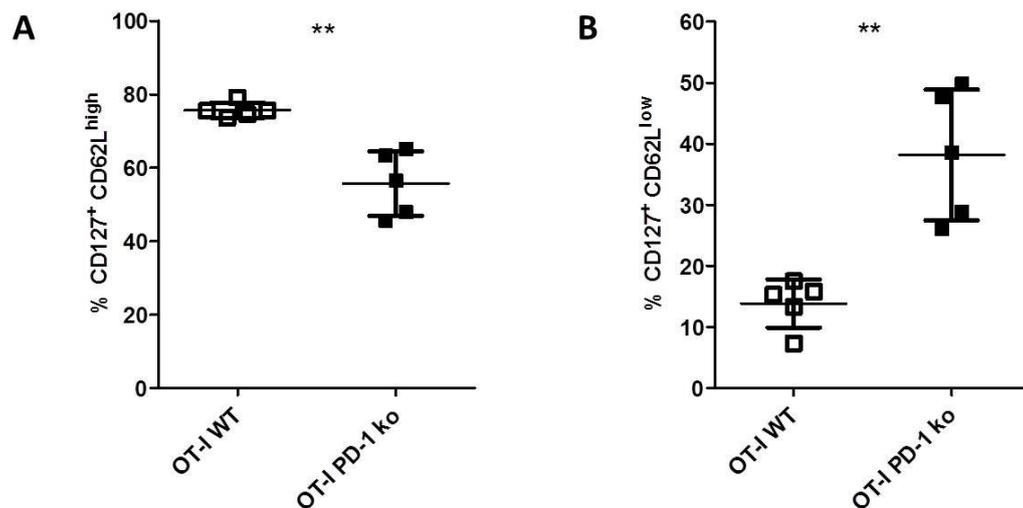
**Abbildung 3.1.7: Bestimmung der Apoptose an Tag 3 nach Zelltransfer und Immunisierung.** C57Bl/6-Mäusen wurden  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Kontroll-Gruppe die gleiche Anzahl OT-I WT Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden beide Gruppen mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 3 nach Immunisierung wurden die Milzzellen aufgereinigt und mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-Antikörpern extrazellulär sowie einem anti-aktive Caspase 3-Antikörper intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildung zeigt die prozentuale Anzahl aktive Caspase 3<sup>+</sup>Zellen der CD8<sup>+</sup> T-Zell Population. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe  $\pm$  SD an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

### 3.1.6 Phänotyp der CD8<sup>+</sup> *Memory*-T-Zellen

Um den Phänotyp der an Tag 42 nach Zelltransfer und Immunisierung persistierenden antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen näher zu bestimmen, ist die Expression bestimmter *Memory*-Marker sowie die Multizytokinsekretion untersucht worden. *Memory*-T-Zellen lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen, die sich in ihrer Funktion, Expression von Oberflächenmarkern und ihrem bevorzugten Aufenthaltsort unterscheiden. Beide Gruppen exprimieren als gemeinsames Merkmal CD127, dessen Expression als genereller Marker für *Memory*-Zellen gilt. Eine der beiden Populationen, die Effektor-*Memory*-T-Zellen ( $T_{EM}$ ) ist primär in der Peripherie zu finden und ihre Zellen besitzen Effektorfunktionen, wie z.B. zytotoxische Aktivität und die Sekretion von Zytokinen. Sie können daher zügig agieren und exprimieren in der Regel kein bis wenig CD62L [Sallusto et al., 2004, Masopust, 2001]. Die zentralen *Memory*-T-Zellen ( $T_{CM}$ ) dagegen halten sich hauptsächlich in lymphatischen Organen auf, proliferieren nach Antigenkontakt und sind starke IL-2 Produzenten. Sie exprimieren CD62L in hohem Ausmaß [Sallusto et al., 2004]. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden im folgenden der Anteil der  $T_{EM}$  und  $T_{CM}$  an der CD8<sup>+</sup> Population anhand der Expression von CD127 in Kombination mit CD62L bestimmt sowie die IL-2-Produktion der IFN- $\gamma$ -sekretierenden T-Zellen untersucht.

#### 3.1.6.1 Phänotyp der CD8<sup>+</sup> *Memory*-T-Zellen aus der Milz

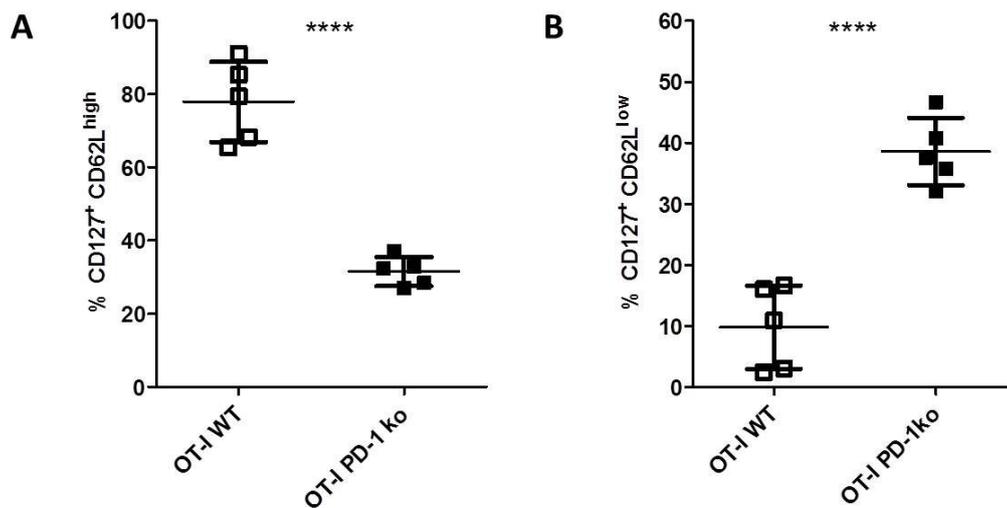
Nach OT-I PD-1 ko sowie OT-I WT Zelltransfer in naive C57Bl/6-Mäuse und deren Immunisierung einen Tag später, wurden nach 6 Wochen die Milzzellen isoliert und ihr Phänotyp analysiert. Abbildung 3.1.8 zeigt die Expression der *Memory*-Marker CD127 und CD62L auf antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> Milzzellen. Während die Population der antigenspezifischen OT-I WT CD8<sup>+</sup> T-Zellen primär aus CD127<sup>+</sup> CD62L<sup>high</sup> also  $T_{CM}$  Zellen besteht und nur wenige  $T_{EM}$  Zellen detektiert werden konnten, kommt es in der OT-I PD-1 ko Zell-Population zu einem signifikanten Anstieg der CD127<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup>- $T_{EM}$  Zellen. Es wird deutlich, dass die Abwesenheit von PD-1 auf den OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz zu einer verstärkten Bildung von *Memory*-Zellen mit Effektorfunktionen führt, wohingegen bei Anwesenheit des Rezeptors primär zentrale *Memory*-T-Zellen gebildet werden.



**Abbildung 3.1.8: Phänotyp der CD8<sup>+</sup> Milzzellen 6 Wochen nach Immunisierung.** C57Bl/6-Mäusen wurden  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Kontroll-Gruppe die gleiche Anzahl OT-I WT Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden beide Gruppen mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 42 nach Immunisierung wurden die Milzzellen aufgereinigt und mit anti-CD8-, anti-CD127-, anti-CD62L-Antikörpern sowie einem H2-K<sup>b</sup>/OVA<sub>257–264</sub>-Multimer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A** zeigt den Anteil der CD127<sup>+</sup> CD62L<sup>high</sup>-T<sub>CM</sub> Zellen der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Population. **B** zeigt den Anteil der CD127<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup>-T<sub>EM</sub> Zellen der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Population.. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe  $\pm$  SD an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

### 3.1.6.2 Phänotyp der CD8<sup>+</sup> Memory-T-Zellen aus der Leber

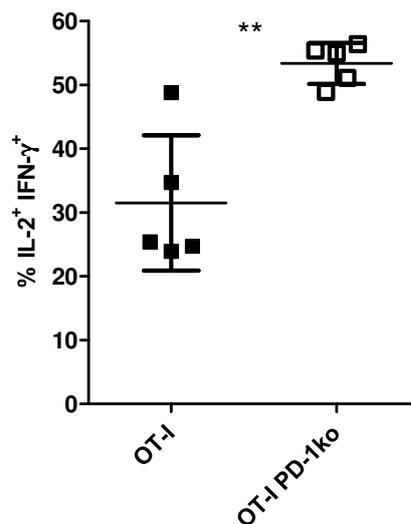
Die gleiche Untersuchung wurde an den CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Leber, 42 Tage nach Zelltransfer und Immunisierung durchgeführt. Die Ergebnisse der CD127- und CD62L-Expression auf den antigenspezifischen Leberzellen sind in Abbildung 3.1.9 dargestellt. Auch hier ist eine verringerte Bildung von T<sub>CM</sub> zugunsten des vermehrten Entstehens von T<sub>EM</sub> detektierbar, die verglichen mit Abbildung 3.1.8 sogar noch akzentuierter ist. Die Analyse der Memory-T-Zellen aus der Leber stützt daher die aus den Milzzellen erzielten Ergebnisse und festigt die Annahme, dass die PD-1-Expression in diesem Modell zu einer vermehrten Bildung einer zentralen Memory-Population führt.



**Abbildung 3.1.9: Phänotyp der CD8<sup>+</sup> Leber-Zellen 6 Wochen nach Immunisierung.** C57Bl/6-Mäusen wurden  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Kontrollgruppe die gleiche Anzahl OT-I WT Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden beide Gruppen mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 42 nach Immunisierung wurden die Leber-Lymphozyten aufgereinigt und mit anti-CD8-, anti-CD127-, anti-CD62L-Antikörpern sowie einem H2-K<sup>b</sup>/OVA<sub>257–264</sub>-Multimer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A** zeigt den Anteil der CD127<sup>+</sup> CD62L<sup>high</sup>-T<sub>CM</sub> Zellen der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Population. **B** zeigt den Anteil der CD127<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup>-T<sub>EM</sub> Zellen der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Population. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe  $\pm$  SD an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

### 3.1.6.3 Multizytokinproduktion restimulierter CD8<sup>+</sup> Milzzellen

Um die Multizytokinproduktion der Memory-T-Zellen zu untersuchen, sind Milzzellen 42 Tage nach OT-I PD-1 ko- bzw. OT-I WT-Zelltransfer und Immunisierung mit ACT-OVA isoliert und antigenspezifisch mit SIINFEKL restimuliert worden. Zusätzlich zur Detektion der IFN- $\gamma$ -Produktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 3.1.3) ist zusätzlich die IL-2-Sekretion untersucht worden. In Abbildung 3.1.10 ist der Anteil der IL-2 produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen der IFN- $\gamma$ -sekretierenden Population dargestellt. Es wird deutlich, dass in der Gruppe, der OT-I PD-1 ko T-Zellen transferiert wurden, signifikant mehr IFN- $\gamma$  IL-2 doppelt positive Zellen vorhanden sind als in der OT-I WT Gruppe. Diese Ergebnisse verhalten sich analog zu Abbildung 3.1.3, wo an Tag 42 ebenfalls eine erhöhte Zytokinproduktion, in jenem Fall IFN- $\gamma$ -Sekretion, in der Gruppe der OT-I PD-1 ko Zellen transferiert wurden, im Vergleich zur OT-I WT Gruppe detektiert werden konnte.



**Abbildung 3.1.10: IL-2 Produktion restimulierter CD8<sup>+</sup>Milz-Zellen nach Zelltransfer und Immunisierung an Tag 42.** C57Bl/6-Mäusen wurden  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Kontroll-Gruppe die gleiche Anzahl OT-I WT Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden beide Gruppen mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 42 nach Immunisierung wurden die Milzzellen aufgereinigt und für 4 h durch Zugabe von  $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$  SIINFEKL-Peptid antigenspezifisch restimuliert. Anschließend wurden sie mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-Antikörpern extrazellulär, sowie einem anti-IFN- $\gamma$ - und anti-IL-2-Antikörper intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die IL-2 Sekretion der IFN- $\gamma$ -sekretierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe  $\pm$  SD an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

## 3.2 Funktionalität der persistierenden CD8<sup>+</sup>

### *Memory*-Population

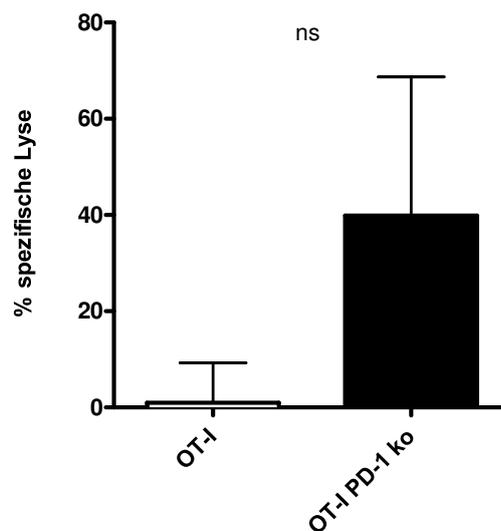
Bisher ist der Einfluß von PD-1 auf die Entwicklung der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup>T-Zell Population nach Transfer von OT-I PD-1- ko bzw. OT-I WT-Zellen mit anschließender Immunisierung durch ACT-OVA untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von PD-1 auf den transferierten OT-I Zellen zu einer Erhöhung der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Population führte, die bis zum Tag 42 anhielt. Die nähere Untersuchung des Phänotyps dieser *Memory*-Zellen ergab eine Verschiebung von  $T_{CM}$  hin zu  $T_{EM}$  in der Gruppe der PD-1-defizienten CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Um die Funktionalität der persistierenden antigenspezifischen *Memory*-Zellen zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Um einen ersten Hinweis auf möglicherweise vorhandene

---

Funktionen zu gewinnen, wurde ein zytotoxischer T-Zell-Versuch durchgeführt. Hierbei wird mithilfe von CFSE-gefärbten und mit SIINFEKL-beladenen naiven Milzzellen die Zytotoxizität der persistierenden *Memory*-Zellen getestet. Desweiteren wurde die Effektivität der *Memory*-Zellen in einem Infektionsmodell analysiert. Dies geschah durch bakterielle Infektion der immunisierten Mäuse mit einem OVA-exprimierenden Stamm von *Listeria monocytogenes*.

### 3.2.1 Zytotoxizitätstest

Um die Zytotoxizität der persistierenden *Memory*-Population zu untersuchen, wurde ein zytotoxischer T-Zell-Test durchgeführt. Hierfür wurden Milzzellen isoliert, in zwei Ansätze geteilt und diese mithilfe einer hohen und einer niedrigen Dosis des Zellfarbstoffs CFSE gefärbt. Die Zellen des ersteren Ansatzes wurden zusätzlich mit dem SIINFEKL-Peptid beladen. Anschließend wurden beide Ansätze zu gleichen Teilen gemischt und intravenös an Tag 43 in die immunisierten Mäuse injiziert. 5 Stunden später erfolgte die Isolation der Milz-Zellen der immunisierten Mäuse. Durch die im Durchflusszytometer detektierbare CFSE-Färbung der Zellen konnten die Frequenzen der zu diesem Zeitpunkt noch vorhandenen CFSE-hoch- und niedrig-gefärbten Zellen bestimmt werden. Hieraus lies sich die SIINFEKL-spezifische Lyse und damit die Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup>T-Zellen in den immunisierten Mäusen ermitteln. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.1 dargestellt.



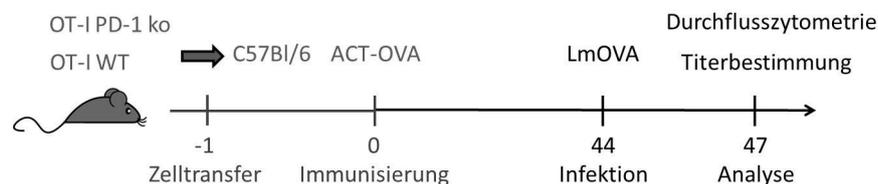
**Abbildung 3.2.1: Zytotoxizitätstest.** C57Bl/6-Mäusen wurden  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I PD-1 ko  $CD8^+$  T-Zellen und der Kontroll-Gruppe die gleiche Anzahl OT-I WT Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden beide Gruppen mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 43 wurden Milzzellen aus naiven C57Bl/6-Mäusen isoliert und in zwei Ansätze geteilt. Ein Ansatz wurde mit  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  SIINFEKL inkubiert. Anschließend wurde der peptidhaltige Ansatz mit  $8 \mu\text{M}$ , der zweite Ansatz mit  $2 \mu\text{M}$  CFSE gefärbt. Beide Ansätze wurden vereint und  $1 \times 10^7$  Zellen / Maus intravenös in die immunisierten Mäuse injiziert. 5 Stunden später wurden die Milzzellen beider Gruppen isoliert und die CFSE-Fluoreszenz im Durchflusszytometer analysiert. Die Abbildung zeigt die spezifische Lyse in Prozent. Die Balken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe + SD an ( $n=3$ ). Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

Es konnte in der OT-I PD-1 ko Gruppe eine höhere spezifische Lyse als in der OT-I WT-Gruppe detektiert werden. Dies würde sich mit einer höheren Zytotoxizität bedingt durch die Abwesenheit von PD-1 auf den T-Zellen als auch durch die höhere Anzahl persistierender *Memory*-Zellen in diesen Tieren erklären lassen. Zusammengefasst konnte mit diesem Experiment eine zytotoxische Funktionalität der *Memory*-Zellen festgestellt werden.

## 3.2.2 Infektion immunisierter C57Bl/6-Mäuse mit *Listera monocytogenes*

### 3.2.2.1 Bestimmung der bakteriellen Last nach Listerieninfektion immunisierter Mäuse

Um die Funktionalität der induzierten *Memory*-Zellen weiter testen zu können, wurde ein OVA-exprimierender *Listeria monocytogenes* Stamm als Infektionsmodell gewählt. Bei Listerien handelt es sich um Gram-positive Bakterien, welche in der immunologischen Forschung vielfältige Anwendung finden. Sie sind ein etabliertes Modell zur Charakterisierung sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort in Säugetieren. Im Besonderen werden sie zur Untersuchung der T-Zell-vermittelten Immunantwort eingesetzt, da  $\alpha\beta$ -T-Zellen die Hauptrolle bei der Beseitigung der bakteriellen Infektion zukommt. Nachdem OT-I PD-1 ko sowie OT-O WT CD8<sup>+</sup> T-Zellen intravenös in C57Bl/6-Rezipienten injiziert und die Mäuse einen Tag später mit ACT-OVA immunisiert worden sind, folgte an Tag 44 nach Immunisierung eine Infektion mit LmOVA und an Tag 47 wurden Milz- sowie Leberzellen isoliert.



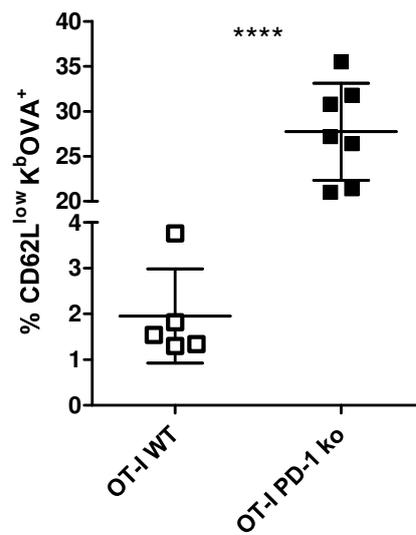
**Abbildung 3.2.2: Schema des Versuchsaufbaus.** Es wurden  $3 \times 10^5$  OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und naiven C57Bl/6-Mäusen an Tag -1 intravenös injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt  $3 \times 10^5$  OT-I WT CD8<sup>+</sup> T-Zellen. An Tag 0 wurden beide Gruppen mit jeweils  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 44 wurden beide Gruppen mit  $2 \times 10^7$  LmOVA / Maus intravenös infiziert. An Tag 47 nach Immunisierung erfolgte die Isolation von Milz- und Leberzellen und die Bestimmung der bakteriellen Last beider Organe. Die Milz-Lymphozyten wurden zusätzlich im Durchflusszytometer analysiert.

Es folgte eine Bestimmung der bakteriellen Last in beiden Organen. In Abbildung 3.2.3 sind die Ergebnisse der Titerbestimmung zusammengefasst. Sowohl die Titerbestimmung in der Milz als auch in der Leber ergab einen Wert von  $1 \times 10^8$  pfu/pro Organ in der OT-I WT Gruppe. Dagegen war der Titer in der Gruppe, welche OT-I PD-1 ko T-Zellen transferiert bekam, signifikant geringer, so dass es im Vergleich von beiden



### 3.2.2.2 Bestimmung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Listerieninfektion immunisierter Mäuse

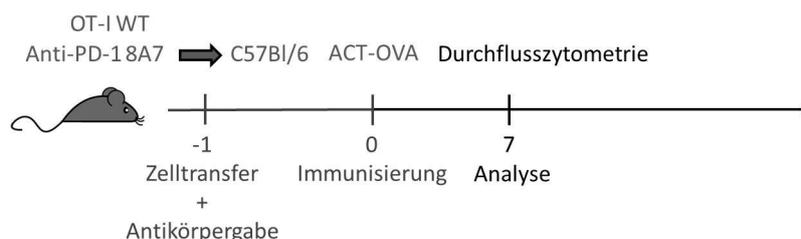
Neben der Bestimmung der bakteriellen Last 3 Tage nach Listerieninfektion wurde zusätzlich eine durchflusszytometrische Analyse der isolierten Milzzellen durchgeführt. Diese wurden mit anti-CD-45-, anti-CD19-, anti-CD8- und anti-CD62L-Antikörpern sowie einem H-2K<sup>b</sup>-Dextramer gefärbt. Abbildung 3.2.4 zeigt die Resultate der Bestimmung der CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA<sup>+</sup>-Zellen der CD8<sup>+</sup> Population. Während sich die Frequenzen der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen der OT-I WT Gruppe auf einem ähnlichen Niveau bewegten, wie sie es 6 Wochen nach Immunisierung ohne Infektion auch taten (Abbildung 3.1.2) kam es bei der Gruppe mit transferierten PD-1-defizienten Zellen zu einem starken Anstieg der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup>-Population. Verglichen mit den Werten der immunisierten und nicht infizierten C57Bl/6-Mäuse kam es sogar noch zu einer Steigerung der ursprünglich höchsten Frequenz an Tag 5 nach Immunisierung (3.1.2). Durch die Defizienz von PD-1 auf den antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> *Memory*-Zellen kam es also zu einer stärkeren Expansion der Population, was in einer effektiveren Bekämpfung der Infektion und damit einhergehend einer geringeren bakteriellen Last resultierte (Abbildung 3.2.3).



**Abbildung 3.2.4: Antigen-spezifisch aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Infektion mit LmOVA.** C57Bl/6-Mäusen wurden  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Kontroll-Gruppe die gleiche Anzahl OT-I WT Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden beide Gruppen mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 44 wurden  $2 \times 10^7$  LmOVA / Maus intravenös appliziert. An Tag 47 nach Immunisierung wurden die Milz-Lymphozyten aufgereinigt und mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-, anti-CD62L-Antikörpern sowie einem H2-K<sup>b</sup>/OVA<sub>257-264</sub>-Multimer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die antigen-spezifisch aktivierten CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA<sup>+</sup> Zellen der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population sind dargestellt. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe  $\pm$  SD an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

### 3.3 Applikation eines anti-PD-1-Antikörpers mit nachfolgendem OT-I T-Zell-Transfer und Immunisierung

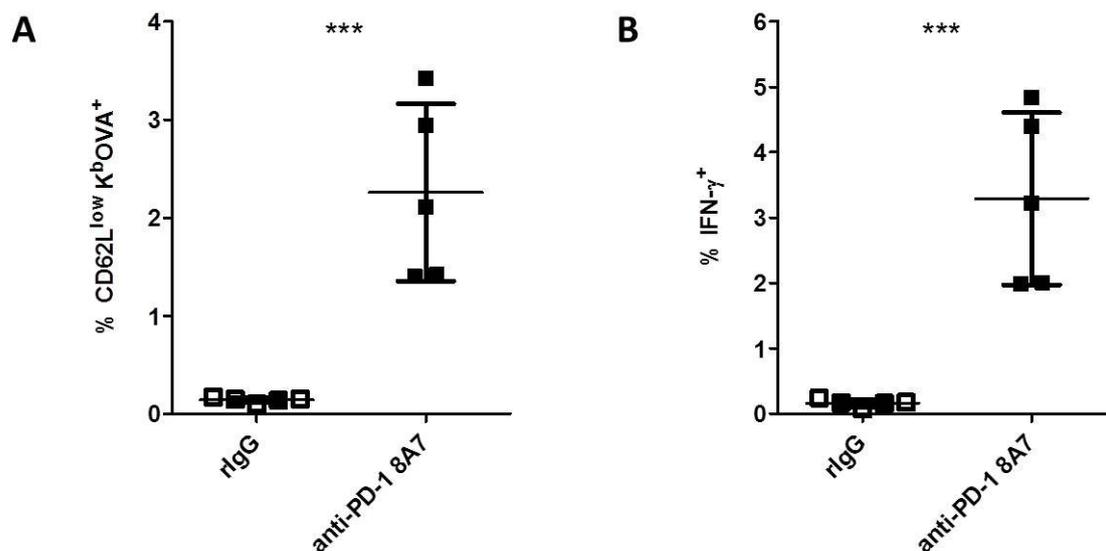
Durch den Transfer von OT-I PD-1 ko Zellen konnte der Einfluß von PD-1 auf die T-Zell-Antwort nach Immunisierung mit ACT-OVA untersucht werden. Es zeigte sich, dass der Rezeptor sich inhibierend auf die T-Zell-Proliferation und die Etablierung einer  $T_{EM}$ -Population auswirkte. Jedoch stellt der Einsatz von Knockout-Zellen oder Knockout-Tieren immer ein artifizielles System dar. Zusätzlich kann ein Knockout zur Ausbildung kompensatorischer Mechanismen führen, welche die in diesem System gewonnenen Resultate verfälschen könnten. Um die vorangegangenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde der Versuchsaufbau im Folgenden modifiziert und auf den Einsatz von Knockout-Zellen oder -Tieren verzichtet. Stattdessen wurde ein anti-PD-1-Antikörper eingesetzt, welcher die Bindung von PD-1 an seine Liganden blockiert. Neben der Annäherung an die natürliche Situation in der Maus können so auch Hinweise auf eine mögliche klinische Applikation im Menschen gewonnen werden. Zusätzlich konnten durch die gezielte Antikörpergabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten weitere mechanistische Untersuchungen durchgeführt werden.



**Abbildung 3.3.1: Schema des Versuchsaufbaus.** Es wurden  $3 \times 10^5$  OT-I WT  $CD8^+$ T-Zellen isoliert und naiven C57Bl/6-Mäusen an Tag -1 intravenös injiziert. Zusätzlich wurden  $500 \mu\text{g}$  des anti-PD-1 8A7-Antikörper / Maus intraperitoneal appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt  $500 \mu\text{g}$  Ratten-IgG / Maus. An Tag 0 wurden beide Gruppen mit jeweils  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 7 erfolgte die Isolation von Milz- und Leberzellen und ihre durchflusszytometrische Analyse. Alternativ erfolgte die Applikation des Antikörpers an Tag 5 nach Immunisierung.

### 3.3.1 Blockade von PD-1 durch einen anti-PD-1-Antikörper vor dem T-Zell-Transfer

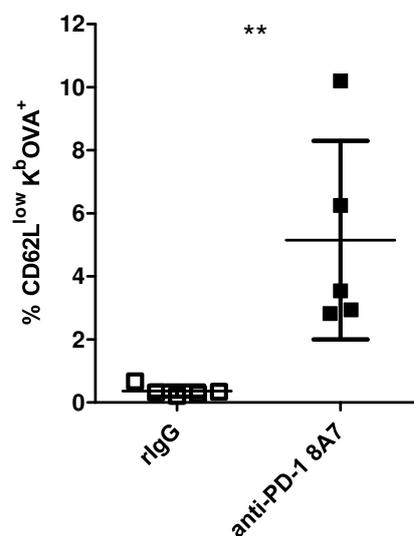
Um die Bindung von PD-1 an seine Liganden zu unterbinden, wurde am Tag -1 des OT-I T-Zell-Transfers 500 $\mu$ g anti-PD-1 Antikörpers 8A7 intraperitoneal appliziert. Der Transfer der OT-I T-Zellen erfolgte kurz darauf intravenös in die Schwanzvene der Tiere. Am darauffolgenden Tag wurden die Mäuse mit 20  $\mu$ g ACT-OVA immunisiert. An Tag 7 erfolgte die Isolation der Milz-Lymphozyten und die Detektion der antigenspezifischen aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Durchflusszytometer. Desweiteren wurden Milzzellen für 4 Stunden antigenspezifisch mit SIINFEKL restimuliert, um anschließend die IFN- $\gamma$ -Sekretion durch die intrazelluläre Färbung mit einem anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper durchflusszytometrisch zu untersuchen. Abbildung 3.3.2 zeigt die Ergebnisse der Analyse der CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie die IFN- $\gamma$ -Produktion der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population.



**Abbildung 3.3.2: Phänotyp der CD8<sup>+</sup> Milzzellen nach Antikörpergabe an Tag -1.**  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I WT CD8<sup>+</sup>T-Zellen wurden i.v. in C57Bl/6-Mäuse injiziert. Zusätzlich wurden  $500 \mu\text{g}$  anti-PD-1 8A7 Antikörper / Maus intraperitoneal verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt  $500 \mu\text{g}$  Ratten-IgG / Maus. Einen Tag später wurden beide Gruppen mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 7 nach Immunisierung wurden die Milzzellen aufgereinigt und mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-, anti-CD62L-Antikörpern sowie einem H2-K<sup>b</sup>/OVA<sub>257–264</sub>-Multimer gefärbt.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden für 4 h mit SIINFEKL restimuliert und anschließend mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-Antikörpern extrazellulär sowie einem IFN- $\gamma$ -Antikörper intrazellulär gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. **A** zeigt die Expansion der antigenspezifischen aktivierten CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA<sup>+</sup>Zellen der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population. **B** stellt die IFN- $\gamma$ -Sekretion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation dar. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe  $\pm$  SD an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

Es zeigt sich, dass es in Folge der PD-1-Blockade durch den verabreichten Antikörper anti-PD-1 8A7 zu einem Anstieg der antigenspezifisch aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe, welcher Ratten-IgG appliziert wurde, gekommen ist. Diese signifikante Erhöhung spiegelt sich auch in der gemessenen IFN- $\gamma$ -Produktion wieder, die im Gegensatz zur Zytokinsekretion der Kontrollgruppe ebenfalls erhöht ist. Um einen vollständigen Vergleich mit den Ergebnissen der Knockout-Versuche zu gewährleisten, wurden auch die Frequenzen der CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber bestimmt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung 3.3.3 dargestellt. Auch hier lässt sich, passend zu den Daten aus der Milz, ein signifikanter Anstieg der antigenspezifischen aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen. Jedoch erreicht der Anstieg der Zell-Population

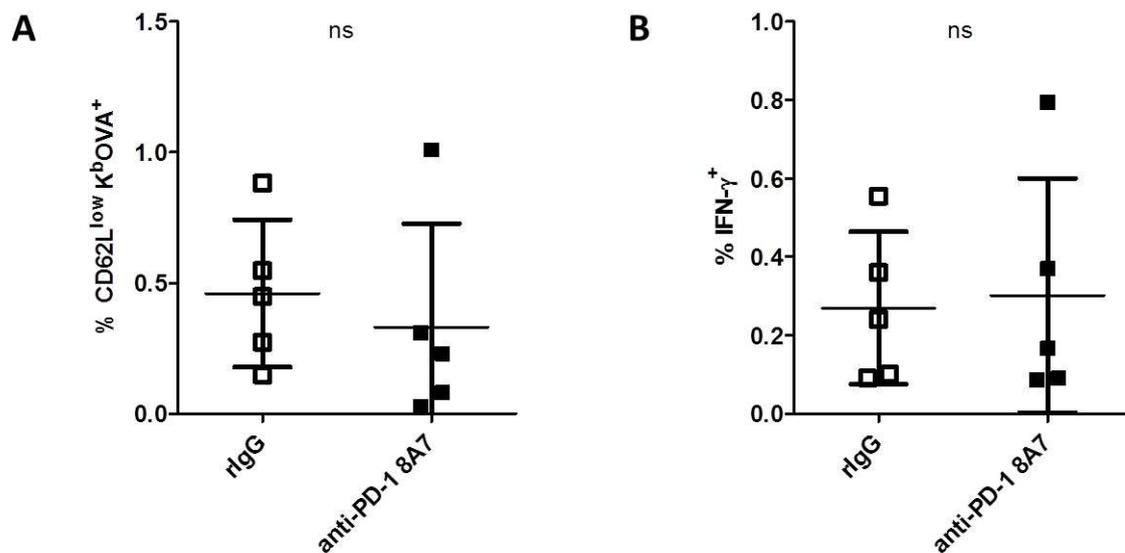
weder für Milz noch Leber die Frequenzen die mithilfe des PD-1-Knockouts in den transferierten OT-I-Zellen erzielt worden sind (Abbildungen 3.1.1, 3.1.3 und 3.1.4). Dies jedoch ist durch die unterschiedlichen Systeme erklärbar, die angewendet worden sind. Ein permanenter, über den kompletten Zeitrahmen des Experiments vollständiger Rezeptor-Knockout wird sich erwartungsgemäß stärker auswirken, als eine einmalige Antikörper-Applikation welche sich nur temporär auswirkt. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass sich eine PD-1-Blockade inhibierend auf die T-Zell-Antwort nach Immunisierung auswirkt und damit die bisher erzielten Ergebnisse verifiziert werden. Zusätzlich konnte durch die Antikörper-Gabe an Tag -1 festgestellt werden, dass PD-1 bereits während der frühen Phase der T-Zell-Aktivierung, nämlich während des Primings, die T-Zell-Antwort moduliert.



**Abbildung 3.3.3: Phänotyp der CD8<sup>+</sup> Leberzellen nach Antikörper-Applikation an Tag -1.**  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I WT CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden i.v. in C57Bl/6-Mäuse injiziert. Zusätzlich wurden  $500 \mu\text{g}$  anti-PD-1 8A7-Antikörper / Maus intraperitoneal verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt  $500 \mu\text{g}$  Ratten-IgG / Maus. Einen Tag später wurden beide Gruppen mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 7 nach Immunisierung wurden die Leber-Lymphozyten aufgereinigt und mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-, anti-CD62L-Antikörpern sowie einem H2-K<sup>b</sup>/OVA<sub>257-264</sub>-Multimer gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Die antigen-spezifischen aktivierten CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA<sup>+</sup>Zellen der CD8<sup>+</sup> T-Zell Population sind dargestellt. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe  $\pm$  SD an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

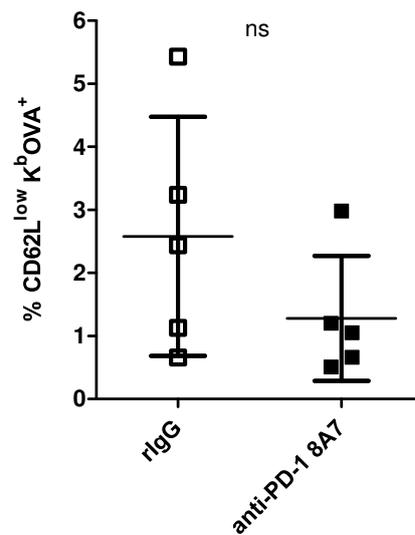
### 3.3.2 Blockade von PD-1 durch einen anti-PD-1-Antikörper an Tag 5 nach Immunisierung

Um den Einfluß von PD-1 während der späteren Phase der T-Zell-Aktivierung zu untersuchen, wurde die Applikation des anti-PD-1-Antikörpers 8A7 auf Tag 5 nach Immunisierung verlegt. Es fand vergleichbar zum Versuch 3.3.1 ein OT-I WT T-Zelltransfer an Tag -1 und eine Immunisierung mit ACT-OVA an Tag 0 statt. 5 Tage später wurden 500 $\mu$ g des Antikörpers intraperitoneal appliziert. An Tag 7 erfolgte die Isolation der Milz- und Leberzellen. Es schloß sich eine Färbung mit Antikörpern zur Detektion der antigenspezifischen aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie eine Restimulation mit SI-INFEKL und eine extra- sowie intrazelluläre Antikörperfärbung zur Ermittlung der IFN- $\gamma$ -Produktion an. Die Ergebnisse der CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Milzzellen sowie die IFN- $\gamma$ -Sekretion der CD8<sup>+</sup> Population sind in Abbildung 3.3.4 dargestellt.



**Abbildung 3.3.4: Phänotyp der CD8<sup>+</sup> Milzzellen nach Antikörpergabe an Tag 5.**  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I WT CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden i.v. in C57Bl/6-Mäuse injiziert. Einen Tag später wurde mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 5 nach Immunisierung wurden  $500 \mu\text{g}$  anti-PD-1 8A7-Antikörper / Maus intraperitoneal verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt  $500 \mu\text{g}$  Ratten-IgG / Maus. An Tag 7 nach Immunisierung wurden die Milzzellen aufgereinigt und mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-, anti-CD62L-Antikörpern sowie einem H2-K<sup>b</sup>/OVA<sub>257–264</sub>-Multimer gefärbt.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden für 4 h mit SIINFEKL restimuliert und anschließend mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-Antikörpern extrazellulär sowie einem IFN- $\gamma$ -Antikörper intrazellulär gefärbt. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer. **A** zeigt die Expansion der antigenspezifischen aktivierten CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA<sup>+</sup>Zellen der CD8<sup>+</sup> T-Zell Population. **B** stellt die IFN- $\gamma$ -Sekretion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation dar. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe  $\pm$  SD an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

In diesem Fall lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen. Weder in den Frequenzen der antigenspezifischen aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen noch in der IFN- $\gamma$ -Sekretion wirkt sich die Applikation des anti-PD-1-Antikörpers 8A7 messbar aus. Gleiches gilt auch für die Ergebnisse der Bestimmung der CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Leber, die in Abbildung 3.3.5 dargestellt sind.



**Abbildung 3.3.5: Phänotyp der CD8<sup>+</sup> Leberzellen nach Antikörpergabe an Tag 5.**  $3 \times 10^5$  aufgereinigte OT-I WT CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden i.v. in C57Bl/6-Mäuse injiziert. Einen Tag später wurde mit  $20 \mu\text{g}$  ACT-OVA intraperitoneal immunisiert. An Tag 5 nach Immunisierung wurden  $500 \mu\text{g}$  anti-PD-1 8A7-Antikörper / Maus intraperitoneal verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt  $500 \mu\text{g}$  Ratten-IgG / Maus. An Tag 7 nach Immunisierung wurden die Leberzellen aufgereinigt und mit anti-CD45-, anti-CD19-, anti-CD8-, anti-CD62L-Antikörpern sowie einem H2-K<sup>b</sup>/OVA<sub>257–264</sub>-Multimer gefärbt. Die antigenspezifischen aktivierten CD62L<sup>low</sup> K<sup>b</sup>OVA<sup>+</sup>Zellen der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population sind dargestellt. Die Querbalken geben den Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe  $\pm$  SD an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) ermittelt.

Zusammengefasst konnten weder in den antigenspezifischen aktivierten CD8<sup>+</sup>T-Zell Populationen aus Milz und Leber noch in der IFN- $\gamma$ -Sekretion signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass eine einmalige anti-PD-1-Antikörpergabe an Tag 5 nach Immunisierung keinen Einfluß auf die T-Zell-Antwort hat. Dies deutet darauf hin, dass die inhibitorische Rolle von PD-1 vor allem in der frühen Phase der T-Zell-Aktivierung von Bedeutung ist, während PD-1 keinen Einfluß auf die Kontraktionsphase zu haben scheint. Um diese Ergebnisse zu stützen, müssten jedoch weiterführende Untersuchungen vorgenommen werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Der Einfluss des Rezeptors PD-1 auf die vakzine-induzierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort

Um im Rahmen der T-Zell-Aktivierung die Balance zwischen der Immunreaktion gegen Pathogene einerseits und dem Erhalt der Selbst-Toleranz andererseits zu gewährleisten, bedarf es neben der Bindung des T-Zell-Rezeptors an den MHC-Antigen-Komplex und der Bindung von CD28 an CD80 oder CD86 weiterer Modulation. Diese wird von einer Reihe von regulierenden Rezeptor-Liganden-Paaren vermittelt, denen der koinhibitorische Rezeptor PD-1 angehört. Seine Expression wird auf aktivierten T- und B-Zellen induziert [Ishida et al., 1992, Agata et al., 1996] und er bindet an seine zwei Liganden PD-L1 und PD-L2 [Dong et al., 1999, Latchman et al., 2001]. Der PD-1 Signalweg hat einen großen Einfluß bei chronischen viralen Infektionen. So konnte für humane HIV-Infektionen gezeigt werden, dass die spezifischen T-Zellen sowohl einen erschöpften Phänotyp aufweisen, als auch zu einem hohen Maß PD-1 exprimieren. Es konnte eine Korrelation der PD-1-Expression mit dem Erschöpfungszustand der T-Zellen gezeigt werden. Ebenso korrelierte die PD-1-Expression sowohl mit der viralen Last der untersuchten Individuen als auch mit dem Fortschreiten des Krankheitsverlaufs [Petrovas et al., 2006, Day et al., 2006, Trautmann et al., 2006]. In einem murinen Modell der LCMV-Infektion gelang es durch die Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion den erschöpften T-Zell-Zustand aufzuheben, gefolgt von einer Reduktion der viralen Last und verbesserten Kontrolle der Infektion [Barber et al., 2006]. Diese Studien beschäftigten sich mit der Expression von PD-1 zu einem späten Zeitpunkt in chronischen viralen Infektionen. Dagegen sollte in dieser Arbeit der Einfluss von PD-1 auf die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch eine Immunisierung sowie den weiteren Verlauf der T-Zell-Entwicklung untersucht werden.

Es ist bekannt, dass PD-1-defiziente Mäuse sowohl auf C57Bl/6- als auch auf BALB/c-Hintergrund zu Immunpathologien neigen [Nishimura et al., 1999, Okazaki et al., 2003]. Deshalb wurde auf den Einsatz von PD-1-defizienten Rezipienten verzichtet. Stattdessen wurde vor Immunisierung ein Zelltransfer von OT-I Wildtyp und vergleichend OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die erzielten Ergebnisse spezifisch durch die transferierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen herrührten und kein Resultat einer PD-1-Defizienz anderer Zell-Populationen waren.

Als Vakzine wurde ACT-OVA gewählt. Hierbei handelt es sich um die Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis*, ein bakterielles Toxin. Sie besteht aus drei Domänen und bindet hochaffin an die Membran von eukaryotischen, CD11b/CD18-exprimierenden Zellen, wie z.B. Dendritischen Zellen [Ladant and Ullmann, 1999, Guernonprez et al., 2001]. Nach der Bindung kommt es zur Translokation der katalytischen Domäne in das Zytosol der Zielzelle. Somit stellt ACT-OVA ein geeignetes Trägermolekül für heterologe Antigene dar. Gezeigt wurde dies u.a. von Tartz et al. im Rahmen einer Malaria-Immunisierung [Tartz et al., 2006, 2008]. Im Gegensatz zu einer Immunisierung mit Adjuvantien, die eine breitgefächerte Aktivierung des Immunsystems bewirkt, kommt es hier durch die hochaffine Bindung an Dendritische Zellen zu einer gezielten Translokation des Antigens und somit zu einer exklusiven Aktivierungen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Als Antigen wurde das Epitop OVA<sub>257-264</sub>(SIINFEKL) in die katalytische Domäne ACT-OVAs inseriert, welches vom T-Zell-Rezeptor der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch erkannt wird.

Die T-Zell-Antwort wurde über einen Zeitraum von 3 bis hin zu 42 Tagen nach Immunisierung analysiert. Dazu wurde sowohl die Anzahl der antigenspezifischen Milz- und Leberlymphozyten als auch ihre Funktion durch die Analyse der Zytokinsekretion untersucht.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass es durch PD-1-Defizienz auf CD8<sup>+</sup>T-Zellen zu einem starken Anstieg der antigenspezifischen, aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowohl in der Milz als auch in der Leber kommt. Dieser Effekt konnte über den gesamten untersuchten Zeitraum, von Tag 3 bis hin zu Tag 42, beobachtet werden. Dieser Anstieg der T-Zell-Zahl spiegelt sich zugleich in einer erhöhten IFN- $\gamma$ -Sekretion im Vergleich zur Kontrollgruppe wieder. In einem Modell in dem Hämagglutinin als Selbst-Antigen exprimiert wurde, konnten Goldberg et al. durch Antikörper-Blockade von PD-L1 zum Zeitpunkt der T-Zell-Aktivierung ebenfalls einen Anstieg sowohl der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen als auch deren IFN- $\gamma$ -

Sekretion nachweisen [Goldberg et al., 2007]. Die erhöhte Anzahl der in dieser Arbeit detektierten PD-1-defizienten, antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen läßt auf einen Einfluss von PD-1 auf die Proliferation schließen. So könnte es, wie für CTLA-4 bereits von Schneider et al. gezeigt, durch die Defizienz von PD-1 zu einer Verkürzung der Interaktionsdauer zwischen T-Zelle und APZ gekommen sein [Schneider et al., 2008]. Dies würde dazu führen, dass die T-Zellen schneller aktiviert würden und daher auch früher mit ihrer Proliferation beginnen könnten. Zusätzlich würde es dazu führen, dass eine größere Anzahl an T-Zellen pro Zeiteinheit aktiviert werden könnte. Beides würde zu dem hier beobachteten Anstieg der PD-1-defizienten CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur Wildtyp-Population führen.

Betrachtet man die Resultate von Milz und Leber vergleichend fällt auf, dass in der Leber eine größere Anzahl antigenspezifischer T-Zellen als in der Milz auftraten. Es konnte nachgewiesen werden, dass es sowohl in Gegenwart [Belz et al., 1998, Mehal et al., 1999] als auch in Abwesenheit von Antigen [Mehal, 2001; Bowen, 2002] zu einer Akkumulation von aktivierten T-Zellen in der Leber kam, welche dort deletiert wurden. Jedoch gibt es auch Hinweise in einem Modell der Influenza-Infektion darauf, dass die Leber, in Abhängigkeit von der jeweiligen Phase der T-Zell-Aktivierung, als Immun-Reservoir für aktivierte T-Zellen dienen könnte [Polakos et al., 2007]. Weiterhin wurde gezeigt, dass es zu einer Expression von PD-L1 in der Leber kommt, welche die Akkumulation und Deletion der T-Zellen in der Leber beeinflusst [Iwai et al., 2003, Dong et al., 2004]. Daraus ließe sich schließen, dass durch die PD-1-Defizienz bedingt keine Interaktion mit PD-L1 stattfinden konnte, was zu einer verminderten T-Zell-Deletion in der Leber führte.

Neben der Analyse der Anzahl antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist auch die Expression von PD-1 auf den OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht worden (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte weder für den Zeitpunkt direkt vor Zelltransfer noch für die analysierten Zeitpunkte nach Immunisierung eine nennenswerte PD-1-Expression nachgewiesen werden. Für den Zelltransfer bedeutet dies, dass naive und funktionelle T-Zellen transferiert worden sind, da aus Modellen chronisch-viraler Infektionen bekannt ist, dass die Hochregulierung von PD-1 ein Marker für T-Zell-Erschöpfung ist [Petrovas et al., 2006, Day et al., 2006, Trautmann et al., 2006]. Jedoch konnte auch in den aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine PD-1-Expression nachgewiesen werden. Dies wurde auch von Goldberg et al. in einem Infektionsmodell mit *Listeria monocytogenes* gezeigt [Gold-

berg et al., 2007]. Da der früheste untersuchte Zeitpunkt in dieser Arbeit Tag 3 war, ließe sich vermuten, dass es zu einer temporären Expression von PD-1 kam, die an den untersuchten Zeitpunkten bereits wieder abgeklungen war. Gestützt wird diese Vermutung durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Antikörperblockade von PD-1. Dort konnte nachgewiesen werden, dass der primäre Einfluss von PD-1 im Zeitrahmen des T-Zell-Primings zu liegen scheint. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die PD-1-Expression unter der Nachweisgrenze der durchflusszytometrischen Analyse liegt, wie für die CD160-Expression bereits nachgewiesen werden konnte [Cai et al., 2008].

Um zu untersuchen, ob die PD-1-Defizienz einen Einfluss auf die Apoptose der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat, wie es in Modellen chronischer viraler Infektionen gezeigt wurde [Petrovas et al., 2006], wurde an Tag 3 nach Immunisierung das Vorliegen von aktiver Caspase 3 in den T-Zellen analysiert. Aktive Caspase 3 ist ein Schlüsselenzym der Apoptose, welches zu einem frühen Zeitpunkt in der apoptotischen Zelle durch einen zweistufigen Mechanismus in seine aktive Form umgewandelt wird [Han et al., 1997]. Es konnte gezeigt werden, dass die Defizienz von PD-1 zu keiner Abnahme der Apoptose der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen geführt hat. Diese Ergebnisse verhalten sich konträr zu den Ergebnissen die Petrovas et al. in HIV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefunden haben. In dieser chronischen viralen Infektion konnte eine verringerte Apoptose-Rate in PD-1-negativen T-Zellen im Vergleich zu PD-1-exprimierenden T-Zellen ermittelt werden [Petrovas et al., 2006].

Um sicherzustellen, dass der beobachtete Anstieg der antigenspezifischen OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausschließlich auf die Defizienz von PD-1 und nicht auf mögliche den Knockout kompensierende Mechanismen zurückzuführen ist, wurden PD-L1-defiziente Rezipienten eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass auch der Transfer von OT-I WT CD8<sup>+</sup> T-Zellen in PD-L1-defiziente Mäuse auf C57Bl/6-Hintergrund zu einem Anstieg der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur C57Bl/6-Wildtyp-Gruppe führte. Gleiches konnte auch für die IFN- $\gamma$ -Sekretion der restimulierten Milzzellen gezeigt werden. Auffällig ist jedoch, dass die antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ihrer Anzahl unter denen der OT-I PD-1 ko-Population lagen. Dies könnte durch eine, die PD-L1-Defizienz kompensierende, Verstärkung regulatorischer Mechanismen in den Mäusen entstanden sein. So wäre eine verstärkte Einflussnahme von regulatorischen T-Zellen oder anderer koinhibierender Rezeptoren wie z.B. CTLA-4 denkbar.

## 4.2 Einfluss der PD-1 Defizienz auf die Entstehung und Differenzierung des *Memory*-Kompartments

Um den Phänotyp der an Tag 42 nach Immunisierung persistierenden antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen näher spezifizieren zu können, wurden Milz- und Leberlymphozyten auf die Expression von *Memory*-Markern hin untersucht. CD8<sup>+</sup> *Memory*-Zellen exprimieren CD127 [Harty and Badovinac, 2008], welches hier als genereller Marker zur Abgrenzung des *Memory*-Kompartments eingesetzt wurde. Desweiteren lässt sich eine Einteilung der *Memory*-Population in zwei Hauptgruppen vornehmen. Die eine Gruppe setzt sich aus den zentralen *Memory*-Zellen ( $T_{CM}$ ) zusammen. Diese exprimieren den *Homing*-Rezeptor CD62L auf ihrer Oberfläche und lassen sich demzufolge primär in lymphatischen Organen finden [Lanzavecchia and Sallusto, 2004]. Die andere Gruppe besteht aus den Effektor-*Memory*-Zellen ( $T_{EM}$ ). Diese exprimieren kein CD62L und zirkulieren primär durch die Peripherie [Lanzavecchia and Sallusto, 2004, Masopust, 2001].

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die PD-1-Defizienz in den OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einer Veränderung der Zusammensetzung des CD8<sup>+</sup> *Memory*-Kompartments führt. Während in der OT-I WT-Gruppe die  $T_{CM}$  vorherrschend sind, kommt es im Vergleich dazu in der OT-I PD-1 ko-Gruppe zu einer Zunahme der  $T_{EM}$  in Milz und Leber. Der Mechanismus der *Memory*-Differenzierung konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Aktuell existieren zwei verschiedenen Modelle. Das eine geht von einer linearen Entwicklung der Zellen aus. Hiernach entstehen aus den naiven T-Zellen die T-Effektor-Zellen, gefolgt von der Stufe der  $T_{EM}$ , aus denen sich letztendlich die  $T_{CM}$  bilden [Wherry et al., 2003]. Das zweite Modell geht von einer Vorläuferzelle aus, aus der sich  $T_{CM}$  bilden können, ohne die Effektor-Phase durchlaufen haben zu müssen [Manjunath et al., 2001]. Die Verschiebung des Verhältnisses der *Memory*-Zellen hin zu  $T_{EM}$  in der OT-I PD-1 ko Gruppe lässt sich alleine durch keines der beiden Modelle erklären. So könnte die Defizienz von PD-1 in den OT-I CD8 T-Zellen die Entwicklung der Zellen in eine  $T_{EM}$ -Richtung beeinflusst haben, was die zweite

Theorie stützen würde. Jedoch wäre es auch denkbar, dass die OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup>T-Zellen durch die PD-1-Defizienz bedingt zum Analysezeitpunkt noch nicht vollständig ausdifferenziert waren und daher noch eine größere Anzahl an T<sub>EM</sub> vorlag. Die Analyse der Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 ergab eine erhöhte Multizytokinsekretion der PD-1-defizienten CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche auch in einem Modell viraler Infektion nachgewiesen werden konnte [Allie et al., 2011]. Unter Einbeziehung der Ergebnisse von Denton et al., die in einem Modell einer viralen Infektion für IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Sekretion zeigen konnten, dass mit zunehmender Zellteilung und Differenzierung die Multizytokinproduktion ab- und die Einzel-Sekretion von IFN- $\gamma$  zunimmt [Denton et al., 2011], würde, ausgehend von einer noch nicht vollständig abgeschlossenen Ausdifferenzierung der PD-1 defizienten *Memory*-Zellen, die erhöhte Multizytokinsekretion der OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen für das Modell der linearen Entwicklung des T-Zell-*Memorys* sprechen.

### 4.3 Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Nachdem in einem zytotoxischen T-Zell-Test erste Hinweise auf die Funktionalität der persistierenden *Memory*-Zellen gewonnen werden konnten, sollten die Ergebnisse in einem Infektionsmodell getestet werden. Dazu wurde eine Infektion mit LmOVA gewählt. Dieser OVA-exprimierende Listerien-Stamm erfüllt die nötige Antigenpezifität, außerdem ist die Protektion gegen *Listeria monocytogenes* als intrazellulärem Bakterium von der Polyfunktionalität der CD8<sup>+</sup>T-Zellen in der Milz abhängig.

Es konnte eine Zunahme der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> Milzzellen nach Infektion der OT-I PD-1 ko Rezipienten mit LmOVA detektiert werden. Dies ging einher mit einer starken Reduktion der bakteriellen Last in Milz und Leber im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch die bakterielle Infektion ausgelöst könnte es zu einer verstärkten Expression von PD-1 in den persistierenden OT-I WT CD8<sup>+</sup> T-Zellen gekommen sein, wodurch diese in ihrer Funktionalität im Gegensatz zu den PD-1-defizienten Zellen eingeschränkt waren. Dieser Einfluss konnte auch in Modellen chronischer viraler Infektionen gezeigt werden, in welchen die PD-1-Expression auf T-Zellen zu einem erschöpften Phänotyp und einem damit einhergehenden Funktionsverlust führt [Petrovas et al., 2006, Barber

et al., 2006]. Für den negativen Regulator CTLA-4 konnte in einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* ebenfalls eine vergleichbare Wirkung beobachtet werden [Rowe et al., 2009, Pedicord et al., 2011]. Ebenfalls in einem *Listeria monocytogenes*-Modell konnte durch Applikation eines anti-PD-L1-Antikörpers jedoch eine Reduktion der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden [Rowe et al., 2008]. Jedoch kann eine Antikörpergabe nicht nur eine antagonistische, sondern ebenfalls eine agonistische Wirkung erzielen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in einem PD-1-Knockout-Modell gezeigt werden, dass weder für das T-Zell-Priming noch für die Expansion eine PD-1-Expression benötigt wird und dass diese Defizienz sich positiv auf den Verlauf der T-Zell-Entwicklung auswirkt. Dies resultierte nicht nur in gesteigerten Anzahlen antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sondern auch in einer verbesserten bakteriellen Bekämpfung. Zusätzlich wiesen die LmOVA-infizierten OT-I PD-1 ko-Rezipienten einen besseren Allgemeinzustand im Gegensatz zur Kontrollgruppe auf. Dies lässt darauf schließen, dass in diesem Modell keine Immunpathologien durch die Defizienz von PD-1 ausgelöst wurden. Da die Wirkung der anti-PD-L1-Antikörperapplikation unklar ist, sollte im Rahmen einer Vakzine-Entwicklung, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, PD-1 als Target verwendet werden. Da die Expression von PD-1 in Modellen chronischer viraler Infektionen mit dem Erschöpfungszustand der T-Zellen korreliert [Petrovas et al., 2006, Day et al., 2006] sollte eine vakzinierungsbedingte Induktion der PD-1-Expression vermieden werden. Wie für eine BTLA-basierte Tumor-Immunsierung gezeigt werden konnte, kann eine entsprechende Vakzine zusätzlich auch zu einer verringerten Expression koinhibierender Moleküle führen [Derré et al., 2010].

## **4.4 Blockade von PD-1 durch den Antikörper anti-PD-1 8A7**

Es konnte mithilfe des Einsatzes von PD-1-defizienten CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Einfluss von PD-1 auf die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gezeigt werden. Jedoch stellen Knockout-Tiere und die aus ihnen gewonnenen Knockout-Zellen stets ein artifizielles System dar, welches das Risiko der Ausbildung kompensatorischer Mechanismen trägt. Um die in den vorangegangenen Versuchen erzielten Ergebnisse zu verifizieren wurde durch die Verwendung

von anti-PD-1-Antikörpern eine Annäherung an eine therapeutische Anwendung geschaffen. Durch die Applikation des antagonistischen anti-PD-1-Antikörpers konnte der bereits gezeigte koinhibierende Einfluss von PD-1 auf die T-Zell-Antwort bestätigt werden. Zusätzlich konnte vergleichend durch die Antikörpergabe zum Zeitpunkt des T-Zell-Primings und zum Einsetzen der Kontraktionsphase die Relevanz von PD-1 auf das Priming und die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden.

Wie wichtig Untersuchungen zur Funktion koinhibierender Moleküle sind, zeigen eine Reihe an Studien zum Einfluss von anti-CTLA-4- und anti-PD-1-Antikörpern auf die Tumorentwicklung im Menschen. CTLA-4 wird nach der T-Zell-Aktivierung auf der Oberfläche von T-Zellen hochreguliert und wirkt dort inhibitorisch durch Bindung an CD80/CD86 [Kormann, 2005]. Bereits zwei anti-CTLA-4-Antikörper sind entwickelt worden, welche sich zur Zeit in der Phase der klinischen Studien befinden. Der erste Antikörper ist ein monoklonaler anti-CTLA-4 IgG1-Antikörper (Ipilimumab), welcher Phase I und II der klinischen Studien bereits durchlaufen hat. Er wurde in den Studien primär gegen metastasierende Melanoma sowohl als Einzelgabe als auch in Kombination mit dem Zytostatikum Dacarbazin eingesetzt und konnte eine dosisabhängige Verbesserung bewirken [Wolchok et al., 2010]. Auch klinische Studien der Phase-III konnten diese Ergebnisse bestätigen [Hodi et al., 2010, Robert et al., 2011]. Jedoch kam es unter anti-CTLA-4-Behandlung zu mittleren bis schweren Nebenwirkungen, meist immunologischer Art (z.B. endokrin, gastrointestinal, hepatisch) in bis zu 30% der Patienten. Der zweite anti-CTLA-4-Antikörper (Tremelimumab) ist ein IgG2-Antikörper und befindet sich ebenfalls in klinischen Studien der Phase-III. Er konnte als Einzelanwendung im Vergleich zu einer Dacarbazine-Behandlung nicht überzeugen [Simeone, 2012], wird aber weiterhin in Kombinationsstudien getestet [Tarhini et al., 2012]. Auch ein humaner, monoklonaler anti-PD-1 IgG4-Antikörper wird aktuell in klinischen Studien zur Tumorbehandlung eingesetzt. Während die genaue Wirkweise des anti-CTLA-4-Antikörpers nicht bekannt ist, wird PD-1 nur auf *de novo* aktivierten T-Zellen exprimiert [Ishida et al., 1992, Agata et al., 1996] und dort durch den Antikörper geblockt. In Phase-I-Studien wurde die Sicherheit, Toxizität und Pharmakodynamik untersucht [Brahmer et al., 2010, Flies et al., 2011]. Neben diesen eigentlich zu analysierenden Parametern konnte bereits in dieser Phase der Studien eine klinische Aktivität in bezug auf anti-Tumor-Aktivität nachgewiesen werden. Auch ergab sich ein geringeres Toxizitätsprofil für den anti-PD-1-Antikörper, als für die getesteten anti-CTLA-4-Antikörper ermittelt

wurde. Weitere Studien sind durchgeführt worden, um Sicherheit, maximale Dosis und klinische Aktivität weiter zu untersuchen [Flies et al., 2011, Topalian et al., 2012]. Zusätzlich befindet sich ein humaner monoklonaler anti-PD-L1-Antikörper zur Zeit in der Phase der klinischen Studien [Brahmer et al., 2012].

All dies sind erfolgsversprechende Ansätze, um über die Blockade koinhibitorischer Regulatoren einen Fortschritt in der Tumorthherapie zu erzielen. Auch verdeutlichen sie die Tragweite des Einflusses dieser Moleküle. Zieht man die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse hinzu, wäre eine klinische Applikation eines anti-PD-1-Antikörpers auch im Rahmen einer Vakzine zur Stärkung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Anwort denkbar.

# Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des koinhibitorischen Rezeptors PD-1 auf die Entwicklung der T-Zell-Antwort der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation untersucht. Dazu wurde ein Transfer von PD-1-defizienten OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie vergleichend ein Transfer von OT-I Wildtyp-Zellen durchgeführt. Anschließend fand eine Immunisierung mit dem Modell-Antigen SIINFEKL statt.

Es konnte gezeigt werden, dass es zu einem starken Anstieg der PD-1-defizienten CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen kam. Diese Differenz in der Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte über den gesamten untersuchten Zeitraum hin beobachtet werden. Damit einher ging eine Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Produktion, die in antigenspezifisch-restimulierten Milzzellen *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Auch in PD-L1 ko-Rezipienten, denen OT-I WT CD8<sup>+</sup> T-Zellen transferiert wurden, konnte nach Immunisierung eine Erhöhung der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie eine verstärkte IFN- $\gamma$  -Sekretion der antigenspezifisch-restimulierten Milzzellen im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe detektiert werden.

Die Analyse des Phänotyps der *Memory*-Zellen ergab eine Verschiebung des T<sub>CM</sub> / T<sub>EM</sub> -Verhältnisses in den OT-I PD-1 ko-Zellen hin zu einer verstärkten T<sub>EM</sub>-Bildung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass PD-1 sich inhibitorisch auf die Entwicklung der vakzine-induzierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen auswirkt. Dieser Einfluss zeigt sich bis hin zur Entwicklung des Memory-Kompartments und resultiert zusätzlich in einer höheren Anzahl antigenspezifischer Memory-Zellen und einer verstärkten Multizytokinproduktion.

In einem zytotoxischen T-Zell-Test konnte keine Einschränkung der Effektor-Funktionen der Memory-Zellen festgestellt werden. Zur weiteren Untersuchung der antigenspezifischen persistierenden *Memory*-Zellen wurden immunisierte Mäuse mit einem SIINFEKL-exprimierenden Stamm des Bakteriums *Listeria monocytogenes* (LmOVA) infiziert. Die Infektion führte zu einem starken Anstieg der Anzahl antigenspezifischer OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz sowie zu einer sehr starken Reduktion der bakteriellen Last

in Milz und Leber der Mausgruppe, welcher PD-1-defiziente CD8<sup>+</sup> T-Zellen transferiert wurden. Durch diese Versuche konnte die Funktionalität der PD-1-defizienten persistierenden *Memory*-Zellen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Abwesenheit von PD-1 auf den vakzine-induzierten Memory-Zellen positiv auf die Immunantwort gegen eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* auswirkt.

Anschließend wurde die PD-1-Blockade durch Antikörperapplikation untersucht. Hierzu wurden neben dem Transfer von OT-I WT CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der folgenden Immunisierung einer Gruppe ein anti-PD-1-Antikörper appliziert. Im Zuge der frühen Antikörperapplikation konnte ein Anstieg der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gegensatz zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Dies zeigte sich auch in einer erhöhten IFN- $\gamma$ -Sekretion der *in vitro* antigenspezifisch-restimulierten Milzzellen. Die späte Antikörpergabe nach Immunisierung führte dagegen zu keiner Erhöhung der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie zu einer vergleichbaren Zytokinsekretion der Milzzellen beider Gruppen. Hieraus läßt sich schlußfolgern, dass die Expression von PD-1 primär während der frühen Phase der T-Zell-Antwort zum Tragen kommt. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine anti-PD-1-Antikörperapplikation sowohl zu einem Anstieg der Anzahl antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen als auch zu einer verstärkten IFN- $\gamma$ -Sekretion führt. Dies läßt auf eine erfolgsversprechende Anwendung einer PD-1-Blockade durch Antikörperapplikation im Rahmen einer therapeutischen Anwendung schließen.

# Abstract

The aim of this thesis was to analyze the influence of PD-1 as a negative receptor on T cell activation and differentiation. To this end OT-I PD-1 ko CD8<sup>+</sup> T cells as well as OT-I wildtyp T cells as a control were transferred into naive C57Bl/6 mice, followed by an immunization with the vaccine-carrier containing the SIINFEKL peptide.

An high increase in antigen-specific activated OT-I PD-1 ko cells in comparison to wt cells could be detected after immunization. These differences were maintained during early as well as late stages of T cell development.

Additionally, PD-1 deficient T cells produced an increased amount of IFN- $\gamma$  after antigen specific restimulation of spleen cells. These results were corroborated by transfer of OT-I wt cells in PD-L1 ko or wt recipients. Here also an increased amount of cytokine producing T cells were found in PD-L1 ko recipients.

Furthermore the deficiency for PD-1 skewed the ratio of memory T cells towards multi cytokine-producing effector memory cells. This indicates that PD-1 affects the development of vaccine-induced CD8<sup>+</sup> T cells in an inhibitory way.

In a cytotoxic T cell assay no impairment regarding the functionality of persisting PD-1 deficient memory cells could be detected. To further analyze the effector functions of persisting memory cells, immunized mice were infected with transgenic *Listeria monocytogenes* expressing SIINFEKL. This infection led to a higher expansion of PD-1 deficient CD8<sup>+</sup> T cells compared to their wt counterpart. This was accompanied by a strong decrease in bacterial load within the group that received OT-I PD-1 ko T cells. This furthermore indicates the functionality of persisting PD-1 deficient memory cells.

Additionally, the impact of PD-1 blockade by application of an anti-PD-1 antibody was analyzed. After transfer of OT-I wt T cells followed by immunization an anti-PD-1 antibody was applied. Here, an early administration of the antibody led to an increase in the amount of CD8<sup>+</sup> T cells. However, no influence on T cell numbers could be detected when the antibody was applied at later time points. From this data, it can be concluded, that PD-1 inhibits the T cell development during the early course of T cell

activation. Taken together these results suggest a potential therapeutical role of PD-1 blockade during immunization.

# Literaturverzeichnis

- Oreste Acuto and Frédérique Michel. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nature reviews. Immunology*, 3(12):939–51, December 2003. ISSN 1474-1733. doi: 10.1038/nri1248.
- Y Agata, A Kawasaki, H Nishimura, Y Ishida, T Tsubata, H Yagita, and T Honjo. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology*, 8(5):765–72, May 1996. ISSN 0953-8178.
- S Rameeza Allie, Weijun Zhang, Shinchiro Fuse, J Usherwood, and Edward J Usherwood. Programmed death 1 regulates development of central memory CD8 T cells after acute viral infection. *The Journal of Immunology*, 186(11):6280–6286, June 2011. ISSN 1550-6606. doi: 10.4049/jimmunol.1003870.
- Mohammed Javeed I Ansari, Alan D Salama, Tanuja Chitnis, R Neal Smith, Hideo Yagita, Hisaya Akiba, Tomohide Yamazaki, Miyuki Azuma, Hideyuki Iwai, Samia J Khoury, Hugh Auchincloss, and Mohamed H Sayegh. The Programmed Death-1 ( PD-1 ) Pathway Regulates Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic ( NOD ) Mice. *The Journal of experimental medicine*, 198(1):0–6, July 2003. ISSN 0022-1007. doi: 10.1084/jem.20022125.
- Daniel L Barber, E John Wherry, David Masopust, Baogong Zhu, James P Allison, Arlene H Sharpe, Gordon J Freeman, and Rafi Ahmed. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439(7077):682–7, February 2006. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature04444.
- Gabrielle T. Belz, John D. Altman, and Peter C. Doherty. Characteristics of virus-specific CD8 T cells in the liver during. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(November):13812–13817, 1998.
- Ellen J Beswick, Irina V Pinchuk, Soumita Das, Don W Powell, and Victor E Reyes. Expression of the programmed death ligand 1, B7-H1, on gastric epithelial cells

- after *Helicobacter pylori* exposure promotes development of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Infection and immunity*, 75(9):4334–41, September 2007. ISSN 0019-9567. doi: 10.1128/IAI.00553-07.
- Jacek Bielecki, Philip Youngman, Patricia Connelly, and Daniel A. Portnoy. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature*, 345(May):175–176, 1990.
- Hélène Bour-Jordan, Jane L Grogan, Qizhi Tang, Julie a Auger, Richard M Locksley, and Jeffrey a Bluestone. CTLA-4 regulates the requirement for cytokine-induced signals in T(H)2 lineage commitment. *Nature immunology*, 4(2):182–8, February 2003. ISSN 1529-2908. doi: 10.1038/ni884.
- Hélène Bour-jordan, Jonathan H Esensten, Marc Martinez-llordella, Cristina Penaranda, Melanie Stumpf, and Jeffrey A Bluestone. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunological reviews*, 241(1):180–205, 2011. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01011.x.Intrinsic.
- Julie R Brahmer, Charles G Drake, Ira Wollner, John D Powderly, Joel Picus, William H Sharfman, Elizabeth Stankevich, Alice Pons, Theresa M Salay, Tracee L McMiller, Marta M Gilson, Changyu Wang, Mark Selby, Janis M Taube, Robert Anders, Lieping Chen, Alan J Korman, Drew M Pardoll, Israel Lowy, and Suzanne L Topalian. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(19):3167–75, July 2010. ISSN 1527-7755. doi: 10.1200/JCO.2009.26.7609.
- Julie R Brahmer, Scott S Tykodi, Laura Q M Chow, Wen-Jen Hwu, Suzanne L Topalian, Patrick Hwu, Charles G Drake, Luis H Camacho, John Kauh, Kunle Odunsi, Henry C Pitot, Omid Hamid, Shailender Bhatia, Renato Martins, Keith Eaton, Shuming Chen, Theresa M Salay, Suresh Alaparthi, Joseph F Grosso, Alan J Korman, Susan M Parker, Shruti Agrawal, Stacie M Goldberg, Drew M Pardoll, Ashok Gupta, and Jon M Wigginton. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England journal of medicine*, 366(26):2455–65, June 2012. ISSN 1533-4406. doi: 10.1056/NEJMoa1200694.
- Manish J Butte, Mary E Keir, Theresa B Phamduy, Arlene H Sharpe, and Gordon J Freeman. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimu-

- latory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*, 27(1):111–22, July 2007. ISSN 1074-7613. doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.016.
- Guifang Cai, Anukanth Anumanthan, Julia A Brown, Edward A Greenfield, Baogong Zhu, and Gordon J Freeman. CD160 inhibits activation of human CD4 + T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nature Immunology*, 9(2), 2008. doi: 10.1038/ni1554.
- LauraL Carter, Lynette a Fouser, Jason Jussif, Lori Fitz, Bija Deng, Clive R Wood, Mary Collins, Tasuku Honjo, Gordon J Freeman, and Beatriz M Carreno. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *European journal of immunology*, 32(3):634–43, March 2002. ISSN 0014-2980. doi: 10.1002/1521-4141(200203)32:3<#60;634::AID-IMMU634<#62;3.0.CO;2-9.
- Jens M Chemnitz, Richard V Parry, Kim E Nichols, H June, James L Riley, and Carl H June. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology*, 173(2): 945–954, 2004.
- Harty JT. Condotta SA, Richer MJ, Badovinac VP. Probing CD8 T cell responses with *Listeria monocytogenes* infection. *Advances in Immunology*, 113:51–80, 2012.
- Pascale Cossart. Illuminating the landscape of host - pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49):19484–19491, 2011. doi: 10.1073/pnas.1112371108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1112371108.
- D S Cunninghame Graham, a K Wong, N J McHugh, J C Whittaker, and Timothy J Vyse. Evidence for unique association signals in SLE at the CD28-CTLA4-ICOS locus in a family-based study. *Human molecular genetics*, 15(21):3195–205, November 2006. ISSN 0964-6906. doi: 10.1093/hmg/ddl395.
- Soumita Das, Giovanni Suarez, Ellen J Beswick, C Johanna, David Y Graham, Victor E Reyes, and Johanna C Sierra. Expression of B7-H1 on Gastric Epithelial Cells: Its Potential Role in Regulating T Cells during *Helicobacter pylori* Infection. *The Journal of Immunology*, 176(5):3000–3009, 2006.
- Cheryl L Day, Daniel E Kaufmann, Photini Kiepiela, Julia a Brown, Eshia S Moodley, Sharon Reddy, Elizabeth W Mackey, Joseph D Miller, Alasdair J Leslie, Chantal

- DePierres, Zenele Mncube, Jaikumar Duraiswamy, Baogong Zhu, Quentin Eichbaum, Marcus Altfeld, E John Wherry, Hoosen M Coovadia, Philip J R Goulder, Paul Klenerman, Rafi Ahmed, Gordon J Freeman, and Bruce D Walker. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443(7109):350–4, September 2006. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature05115.
- Alice E Denton, Brendan E Russ, Peter C Doherty, Sudha Rao, and Stephen J Turner. Differentiation-dependent functional and epigenetic landscapes for cytokine genes in virus-specific. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(37):15306–15311, 2011. doi: 10.1073/pnas.1112520108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1112520108.
- Laurent Derré, Jean-paul Rivals, Camilla Jandus, Sonia Pastor, Donata Rimoldi, Pedro Romero, Olivier Michielin, Daniel Olive, and Daniel E Speiser. BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8 + T cells that can be partially reversed by vaccination. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(1):157–167, 2010. doi: 10.1172/JCI40070.Src.
- E Domann, J Wehland, M Rohde, S Pistor, M Hartl, W Goebel, M Leimeister-Wächter, M Wuenscher, and T Chakraborty. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *The EMBO journal*, 11(5):1981–90, May 1992. ISSN 0261-4189.
- H Dong, G Zhu, K Tamada, and L Chen. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature medicine*, 5(12):1365–9, December 1999. ISSN 1078-8956. doi: 10.1038/70932.
- Haidong Dong, Gefeng Zhu, Koji Tamada, Dallas B Flies, Jan M A Van Deursen, and Lieping Chen. B7-H1 Determines Accumulation and Deletion of Intrahepatic CD8 T Lymphocytes. *Immunity*, 20:327–336, 2004.
- David M Dorfman, Julia A Brown, Aliakbar Shahsafaei, and Gordon J Freeman. Programmed Death-1 (PD-1) is a Marker of Germinal Center-associated T Cells and Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. *American Journal of Surgery and Pathology*, 30(7):802–810, 2006.
- Michael J Eppihimer, Jason Gunn, Gordon J Freeman, Edward a Greenfield, Tetyana Chernova, Jamie Erickson, and John P Leonard. Expression and regulation of the

- PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 9(2):133–45, April 2002. ISSN 1073-9688. doi: 10.1038/sj/mn/7800123.
- Brian T Fife, Indira Guleria, Melanie Gubbels Bupp, Todd N Eagar, Qizhi Tang, Helene Bour-jordan, Hideo Yagita, Miyuki Azuma, Mohamed H Sayegh, and Jeff A Bluestone. Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1 - PD-L1 pathway. *Journal of Experimental Medicine*, 203(12):2737–2747, 2006. doi: 10.1084/jem.20061577.
- Dallas B Flies, Britt J Sandler, Mario Sznol, and Lieping Chen. Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy. *The Yale journal of biology and medicine*, 84(4):409–21, December 2011. ISSN 1551-4056.
- Loise M. Francisco, Peter T. Sage, and Arlene H. Sharpe. The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity. *Immunological reviews*, 236(July):219–242, 2010. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.The.
- By Gordon J Freeman, Andrew J Long, Yoshiko Iwai, Karen Bourque, Tatyana Chernova, Hiroyuki Nishimura, Lori J Fitz, Nelly Malenkovich, Taku Okazaki, Michael C Byrne, Heidi F Horton, Lynette Fouser, Laura Carter, Vincent Ling, Michael R Bowman, Beatriz M Carreno, Mary Collins, Clive R Wood, Tasuku Honjo, and G J Freeman. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *The Journal of experimental medicine*, 192(7):1027–34, October 2000. ISSN 0022-1007.
- J L Gaillard, P Berche, C Frehel, E Gouin, and P Cossart. Entry of L. monocytogenes into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*, 65(7):1127–41, June 1991. ISSN 0092-8674.
- Thomas Gebhardt, Linda M Wakim, Liv Eidsmo, Patrick C Reading, William R Heath, and Francis R Carbone. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nature immunology*, 10(5):524–30, May 2009. ISSN 1529-2916. doi: 10.1038/ni.1718.
- Monica V Goldberg, Charles H Maris, Edward L Hipkiss, Andrew S Flies, Lijie Zhen, M Rubin, Joseph F Grosso, Timothy J Harris, Derese Getnet, Katharine A Wharthenby, G Dirk, Thomas W Dubensky, Lieping Chen, Drew M Pardoll, Charles G Drake, Washington Dc, Rubin M Tudor, F Joseph, Dirk G Brockstedt, and Thomas

- W Dubensky Jr. Role of PD-1 and its ligand , B7-H1 , in early fate decisions of CD8 T cells. *Blood*, 110(1):186–192, 2007. doi: 10.1182/blood-2006-12-062422.
- Kim L Good-Jacobson, Courtney G Szumilas, Lieping Chen, Arlene H Sharpe, Mary M Tomayko, and Mark J Shlomchik. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature immunology*, 11(6): 535–42, June 2010. ISSN 1529-2916. doi: 10.1038/ni.1877.
- Rebecca J Greenwald, Gordon J Freeman, and Arlene H Sharpe. The B7 family revisited. *Annual review of immunology*, 23:515–48, January 2005. ISSN 0732-0582. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611.
- P Guermonprez, N Khelef, E Blouin, P Rieu, P Ricciardi-Castagnoli, N Guiso, D Ladant, and C Leclerc. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *The Journal of experimental medicine*, 193(9):1035–44, May 2001. ISSN 0022-1007.
- Zhiyong Han, Eric A Hendrickson, Theodore A Bremner, and James H Wyche. A Sequential Two-Step Mechanism for the Production of the Mature p17 : p12 Form of Caspase-3 in Vitro \*. *Journal of biological chemistry*, 272(20):13432–13436, 1997.
- John T Harty and Vladimir P Badovinac. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nature reviews. Immunology*, 8(2):107–19, February 2008. ISSN 1474-1741. doi: 10.1038/nri2251.
- Xian-Hui He, Yi Liu, Li-Hui Xu, and Yao-Ying Zeng. Cloning and identification of two novel splice variants of human PD-L2. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 36(4): 284–9, April 2004. ISSN 1672-9145.
- Xian-hui He, Li-hui Xu, and Yi Liu. Identification of a novel splice variant of human PD-L1 mRNA encoding an isoform-lacking Igv-like domain. *Acta pharmacologica Sinica*, 26(4):462–8, April 2005. ISSN 1671-4083. doi: 10.1111/j.1745-7254.2005.00086.x.
- F Stephen Hodi, Steven J O’Day, David F. McDermott, Robert W. Weber, Jeffrey A Sosman, John B Haanen, Rene Gonzalez, Caroline Robert, D Ph, Dirk Schadendorf, Jessica C Hassel, Wallace Akerley, Alfons J M Van Den Eertwegh, Jose Lutzky, Paul Lorigan, Julia M Vaubel, Gerald P Linette, David Hogg, Christian H Ottensmeier, Celeste Lebbé, Christian Peschel, Ian Quirt, Joseph I Clark, Jedd D Wolchok, Jeffrey S Weber, Jason Tian, Michael J Yellin, Geoffrey M Nichol, B Ch, Axel Hoos, and

- Walter J Urba. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England journal of medicine*, 363(8):711–723, 2010.
- Y Ishida, Y Agata, K Shibahara, and T Honjo. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*, 11(11):3887–95, November 1992. ISSN 0261-4189.
- Yoshiko Iwai, Seigo Terawaki, Masaya Ikegawa, Taku Okazaki, and Tasuku Honjo. PD-1 Inhibits Antiviral Immunity at the Effector Phase in the Liver. *Journal of Experimental Medicine*, 198(1):39–50, July 2003. ISSN 0022-1007. doi: 10.1084/jem.20022235.
- Wanping Jiang, William Swiggard, Christine Heufler, Michael Peng, Asra Mirza, Ralph Steinman, and Michel Nussenzweig. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*, 375(151-155), 1995.
- Shimpei Kawamoto, Thinh H Tran, Mikako Maruya, Keiichiro Suzuki, Yasuko Doi, Yumi Tsutsui, Lucia M Kato, and Sidonia Fagarasan. The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science (New York, N. Y.)*, 336(6080):485–9, April 2012. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1217718.
- Mary E Keir, Manish J Butte, Gordon J Freeman, and Arlene H Sharpe. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology*, 26(December 2007):677–704, January 2008. ISSN 0732-0582. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
- Audrey L Kinter, Emily J Godbout, Jonathan P McNally, Irini Sereti, Gregg A Roby, Marie A O Shea, and Anthony S Fauci. The common  $\gamma$ -Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Induce the Expression of Programmed Death-1 and Its Ligands. *The Journal of Immunology*, 181:6738–6746, 2008.
- C Kocks, E Gouin, M Tabouret, P Berche, H Ohayon, and P Cossart. L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell*, 68(3):521–31, February 1992. ISSN 0092-8674.
- Matthew F Krummel and James Allison. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *Journal of Experimental Medicine*, 182(August):459–465, 1995.

- Daniel Ladant and Agnes Ullmann. Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in Microbiology*, 7(4), April 1999. ISSN 0934-8840.
- Antonio Lanzavecchia and Federica Sallusto. Lead and follow: the dance of the dendritic cell and T cell. *Nature immunology*, 5(12):1201–2, December 2004. ISSN 1529-2908. doi: 10.1038/ni1204-1201.
- Yvette Latchman, Clive R Wood, Tatyana Chernova, Divya Chaudhary, Irene Chernova, Yoshiko Iwai, Andrew J Long, Julia A Brown, Raquel Nunes, Edward A Greenfield, Karen Bourque, Vassiliki A Boussiotis, Laura L Carter, Beatriz M Carreno, Nelly Malenkovich, Hiroyuki Nishimura, Taku Okazaki, Tasuku Honjo, Arlene H Sharpe, Gordon J Freeman, and M Borde. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*, 2(3):261–268, March 2001. ISSN 1529-2908. doi: 10.1038/85330.
- M Lecuit, S Vandormael-Pournin, J Lefort, M Huerre, P Gounon, C Dupuy, C Babinet, and P Cossart. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5522):1722–5, June 2001. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.1059852.
- Seung-Jin Lee, Byeong-Churl Jang, Soo-Woong Lee, Young-Il Yang, Seong-Il Suh, Yeong-Min Park, Sangtaek Oh, Jae-Gook Shin, Sheng Yao, Lieping Chen, and In-Hak Choi. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS letters*, 580(3):755–62, February 2006. ISSN 0014-5793. doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.093.
- P'ng Loke and James P Allison. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9):5336–41, April 2003. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0931259100.
- N Manjunath, P Shankar, J Wan, W Weninger, M A Crowley, K Hieshima, T A Springer, X Fan, H Shen, J Lieberman, and U H Von Andrian. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *Journal of clinical investigation*, 108(6):871–878, 2001. doi: 10.1172/JCI200113296.Introduction.
- David Masopust. Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. *Science*, 2413(2001):2413–2417, 2001. doi: 10.1126/science.1058867.
- Wajahat Z Mehal, Amy E Juedes, and I Nicholas Crispe. Selective Retention of Activated

- CD8 + T Cells by the Normal Liver. *The Journal of Immunology*, 163(6):3202–3210, 1999.
- H Nishimura, M Nose, H Hiai, N Minato, and T Honjo. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11(2):141–51, August 1999. ISSN 1074-7613.
- Hiroyuki Nishimura, Yasutoshi Agata, Akemi Kawasaki, Masaki Sato, Sadao Imamura, Nagahiro Minato, Hideo Yagita, Toru Nakano, and Tasuku Honjo. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *International Immunology*, 8(5):773–780, 1996.
- Roza Nurieva, Sunil Thomas, Thang Nguyen, Natalia Martin-Orozco, Ying Wang, Murali-Krishna Kaja, Xue-Zhong Yu, and Chen Dong. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *The EMBO journal*, 25(11):2623–33, June 2006. ISSN 0261-4189. doi: 10.1038/sj.emboj.7601146.
- T Okazaki, A Maeda, H Nishimura, T Kurosaki, and T Honjo. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24):13866–71, November 2001. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.231486598.
- Taku Okazaki, Yoshimasa Tanaka, Ryosuke Nishio, Tamotsu Mitsuiye, Akira Mizoguchi, Jian Wang, Masayoshi Ishida, Hiroshi Hiai, Akira Matsumori, Nagahiro Minato, and Tasuku Honjo. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nature medicine*, 9(12):1477–1483, 2003. doi: 10.1038/nm955.
- Eric G Pamer. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature reviews. Immunology*, 4(10):812–23, October 2004. ISSN 1474-1733. doi: 10.1038/nri1461.
- Richard V Parry, Jens M Chemnitz, Kenneth A Frauwirth, Anthony R Lanfranco, Inbal Braunstein, Sumire V Kobayashi, Peter S Linsley, Craig B Thompson, James L Riley, V Sumire, and L Riley. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 25(21):9543–9553, 2005. doi: 10.1128/MCB.25.21.9543.
- Virginia A Pedicord, Welby Montalvo, Ingrid M Leiner, and James P Allison. Single dose of anti-CTLA-4 enhances CD8 + T-cell memory formation , function

- , and maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1):266–271, 2011. doi: 10.1073/pnas.1016791108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1016791108.
- Tsvetelina Pentcheva-hoang, Lieping Chen, Drew M Pardoll, and James P Allison. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(45):17765–17770, 2007.
- Constantinos Petrovas, Joseph P Casazza, Jason M Brenchley, David A Price, Emma Gostick, William C Adams, Melissa L Precopio, Timothy Schacker, Mario Roederer, Daniel C Douek, and Richard A Koup. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8 + T cell survival in HIV infection. *Journal of Experimental Medicine*, 203(10):2281–2292, 2006. doi: 10.1084/jem.20061496.
- Maria Pihlgren, Patrice M Dubois, Martine Tomkowiak, Tove Sjögren, and Jacqueline Marvel. Resting Memory CD8 T Cells are Hyperreactive to Antigenic Challenge In Vitro. *Journal of Experimental Medicine*, 184(December):2141–2151, 1996.
- Noelle K Polakos, Ingo Klein, Martin V Richter, M Zaiss, Matthew Giannandrea, Ian N Crispe, J David, Dietmar M Zaiss, and David J Topham. Early Intrahepatic Accumulation of CD8+ T Cells Provides a Source of Effectors for Nonhepatic Immune Responses. *Journal of Immunology*, 179(1):201–210, 2007.
- C Potsch, D Vöhringer, and H Pircher. Distinct migration patterns of naive and effector CD8 T cells in the spleen: correlation with CCR7 receptor expression and chemokine reactivity. *European journal of immunology*, 29(11):3562–70, November 1999. ISSN 0014-2980. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199911)29:11<3562::AID-IMMU3562>3.0.CO;2-R.
- Caroline Robert, Luc Thomas, Igor Bondarenko, Steven O’Day, Jeffrey Weber M D, Claus Garbe, Celeste Lebbe, Jean-François Baurain, Alessandro Testori, Jean-Jacques Grob, Neville Davidson, Jon Richards, Michele Maio, Axel Hauschild, Wilson H Miller, Pere Gascon, Michal Lotem, Kaan Harmankaya, Ramy Ibrahim, Stephen Francis, Tai-Tsang Chen, Rachel Humphrey, Axel Hoos, and Jedd D Wolchok. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*, 364(26):2517–26, June 2011. ISSN 1533-4406. doi: 10.1056/NEJMoa1104621.

- Steven D Rosen. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annual review of immunology*, 22:129–56, January 2004. ISSN 0732-0582. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.090501.080131.
- Jared H Rowe, Tanner M Johanns, James M Ertelt, and Sing Sing Way. PD-L1 Blockade Impedes T Cell Expansion and Protective Immunity Primed by Attenuated *Listeria monocytogenes*. *Journal of Immunology*, 180(11):7553–7557, 2008.
- Jared H Rowe, Tanner M Johanns, James M Ertelt, Joseph C Lai, and Sing Sing Way. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 blockade augments the T-cell response primed by attenuated *Listeria monocytogenes* resulting in more rapid clearance of virulent bacterial challenge. *Immunology*, 128(1 Suppl):e471–8, September 2009. ISSN 1365-2567. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03001.x.
- Elias A Said, Franck P Dupuy, Lydie Trautmann, Yuwei Zhang, Yu Shi, Mohamed El-Far, Brenna J Hill, Alessandra Noto, Petronela Ancuta, Yoav Peretz, Simone G Fonseca, Julien Van Grevenynghe, Mohamed R Boulassel, Julie Bruneau, Naglaa H Shoukry, Jean-Pierre Routy, Daniel C Douek, Elias K Haddad, and Rafick-Pierre Sekaly. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nature medicine*, 16(4):452–9, April 2010. ISSN 1546-170X. doi: 10.1038/nm.2106.
- Alan D Salama, Tanuja Chitnis, Jaime Imitola, Hisaya Akiba, Fumihiko Tushima, Miyuki Azuma, Hideo Yagita, Mohamed H Sayegh, and Samia J Khoury. Critical Role of the Programmed Death-1 ( PD-1 ) Pathway in Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis *The Journal of Experimental Medicine*. 198(1), 2003. doi: 10.1084/jem.20022119.
- Federica Sallusto, Jens Geginat, and Antonio Lanzavecchia. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology*, 22:745–63, January 2004. ISSN 0732-0582. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.
- Helga Schneider, Xin Smith, Hebin Liu, Georges Bismuth, and Christopher E Rudd. CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell / APC dwell times and calcium mobilization. *European journal of immunology*, 38:40–47, 2008. doi: 10.1002/eji.200737423.
- Bettina Schreiner, Meike Mitsdoerffer, Bernd C Kieseier, Lieping Chen, Hans-Peter

- Hartung, Michael Weller, and Heinz Wiendl. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 155(1-2):172–82, October 2004. ISSN 0165-5728. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.06.013.
- Su-Kil Seo, Hye-Young Jeong, Sae-Gwang Park, Soo-Woong Lee, Il-Whan Choi, Lieping Chen, and Inhak Choi. Blockade of endogenous B7-H1 suppresses antibacterial protection after primary *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology*, 123(1):90–9, January 2008. ISSN 1365-2567. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02708.x.
- Y Shen, M Naujokas, M Park, and K Ireton. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*, 103(3):501–10, October 2000. ISSN 0092-8674.
- Kelly-ann Sheppard, Lori J Fitz, Julie M Lee, Christina Benander, Judith A George, Joe Wooters, Yongchang Qiu, Jason M Jussif, Laura L Carter, Clive R Wood, and Divya Chaudhary. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70 / CD3f signalosome and downstream signaling to PKCO. *FEBS letters*, 574: 37–41, 2004. doi: 10.1016/j.febslet.2004.07.083.
- Takashi Shinohara, Masafumi Taniwaki, Yasumasa Ishida, Masashi Kawaichi, and Tasuko Honjo. Structure and Chromosomal Localization of the Humand PD-1 Gene (PDCD1). *Genomics*, 23:704–706, 1994.
- Jennifer E Smith-Garvin, Gary a Koretzky, and Martha S Jordan. T cell activation. *Annual review of immunology*, 27:591–619, January 2009. ISSN 0732-0582. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706.
- Sumit K Subudhi, Ping Zhou, Lisa M Yerian, Robert K Chin, James C Lo, Robert A Anders, Yonglian Sun, Lieping Chen, Yang Wang, Maria-luisa Alegre, and Yang-xin Fu. Local expression of B7-H1 promotes organ-specific autoimmunity and transplant rejection. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(5):694–700, 2004. doi: 10.1172/JCI200419210.694.
- Takeshi Takahashi, Tomoyuki Tagami, Sayuri Yamazaki, Toshimitsu Uede, Jun Shimizu, Noriko Sakaguchi, Tak W Mak, and Shimon Sakaguchi. Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte - associated Antigen 4. *Journal of Experimental Medicine*, 192(2):303–309, 2000.

- Hideto Tamura, Haidong Dong, Gefeng Zhu, Gabriel L Sica, Dallas B Flies, Koji Tamada, and Lieping Chen. B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood*, 97(6):1809–1816, March 2001. ISSN 00064971. doi: 10.1182/blood.V97.6.1809.
- Ahmad a Tarhini, John Cherian, Stergios J Moschos, Hussein a Tawbi, Yongli Shuai, William E Gooding, Cindy Sander, and John M Kirkwood. Safety and efficacy of combination immunotherapy with interferon alfa-2b and tremelimumab in patients with stage IV melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(3):322–8, January 2012. ISSN 1527-7755. doi: 10.1200/JCO.2011.37.5394.
- Susanne Tartz, Jana Kamanova, Marcela Simsova, Peter Sebo, Stefanie Bolte, Volker Heussler, Bernhard Fleischer, and Thomas Jacobs. Immunization with a Circumsporozoite Epitope Fused to Bordetella pertussis Adenylate Cyclase in Conjunction with Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4 Blockade Confers Protection against Plasmodium berghei Liver-Stage Malaria. *Infection and immunity*, 74(4):2277–2285, 2006. doi: 10.1128/IAI.74.4.2277.
- Susanne Tartz, Holger Rüssmann, Jana Kamanova, Peter Sebo, Angelika Sturm, Volker Heussler, Bernhard Fleischer, and Thomas Jacobs. Complete protection against P. berghei malaria upon heterologous prime/boost immunization against circumsporozoite protein employing Salmonella type III secretion system and Bordetella adenylate cyclase toxoid. *Vaccine*, 26(47):5935–43, November 2008. ISSN 0264-410X. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.08.057.
- Suzanne L. Topalian, Stephen Hodi, Julie R. Brahmer, David C Smith, David F McDermott, John D Powderly, Richard D Carvajal, Jeffrey A Sosman, Michael B Atkins, Philip D Leming, David R Spigel, Scott J Antonia, D Ph, Leora Horn, Charles G Drake, Drew M Pardoll, Lieping Chen, William H Sharfman, Robert A Anders, Janis M Taube, Tracee L Mcmillen, Haiying Xu, Alan J Korman, Maria Jure-kunkel, Shruti Agrawal, Mario Sznol, and Scott N Gettinger. Safety, Activity and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *The New England journal of medicine*, 366(26):2443–2454, 2012.
- Lydie Trautmann, Loury Janbazian, Nicolas Chomont, Elias a Said, Sylvain Gimig, Benoit Bessette, Mohamed-Rachid Boulassel, Eric Delwart, Homero Sepulveda,

- Robert S Balderas, Jean-Pierre Routy, Elias K Haddad, and Rafick-Pierre Sekaly. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature medicine*, 12(10):1198–202, October 2006. ISSN 1078-8956. doi: 10.1038/nm1482.
- Hironori Ueda, Joanna M M Howson, Laura Esposito, Joanne Heward, Hywel Snook, Giselle Chamberlain, Daniel B Rainbow, Kara M D Hunter, Annabel N Smith, Gianfranco Di Genova, Mathias H Herr, Ingrid Dahlman, Felicity Payne, Deborah Smyth, Christopher Lowe, Rebecca C J Twells, Sarah Howlett, Barry Healy, Sarah Nutland, Helen E Rance, Vin Everett, Luc J Smink, Alex C Lam, Heather J Cordell, Neil M Walker, Cristina Bordin, John Hulme, Costantino Motzo, Francesco Cucca, J Fred Hess, Michael L Metzker, Jane Rogers, Simon Gregory, Amit Allahabadia, Ratnasingham Nithiyanthan, Eva Tuomilehto-Wolf, Jaakko Tuomilehto, Polly Bingley, Kathleen M Gillespie, Dag E Undlien, Kjersti S Rø nningen, Cristian Guja, Constantin Ionescu, David a Savage, a Peter Maxwell, Dennis J Carson, Chris C Patterson, Jayne a Franklyn, David G Clayton, Laurence B Peterson, Linda S Wicker, John a Todd, and Stephen C L Gough. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 423(6939):506–11, May 2003. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature01621.
- T L Walunas, D J Lenschow, C Y Bakker, P S Linsley, G J Freeman, J M Green, C B Thompson, and J a Bluestone. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1(5):405–13, August 1994. ISSN 1074-7613.
- Bing Wan, Hong Nie, Ailian Liu, and Guozhang Feng. Aberrant Regulation of Synovial T Cell Activation by Soluble Costimulatory Molecules in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of experimental medicine*, 177(12):8844–8850, 2006.
- Jian Wang, Taku Yoshida, Fumio Nakaki, Hiroshi Hiai, Taku Okazaki, and Tasuku Honjo. Establishment of NOD-Pdcd1 / mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33):11823–11828, 2005.
- P Waterhouse, J M Penninger, E Timms, A Wakeham, A Shahinian, K P Lee, C B Thompson, H Griesser, and T W Mak. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5238):985–8, November 1995. ISSN 0036-8075.

- E John Wherry and Rafi Ahmed. Viral Infection Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *Journal of Virology*, 78(11):5535–5545, 2004. doi: 10.1128/JVI.78.11.5535.
- E John Wherry, Volker Teichgräber, Todd C Becker, David Masopust, Susan M Kaech, Rustom Antia, Ulrich H Von Andrian, and Rafi Ahmed. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature immunology*, 4(3):225–234, 2003. doi: 10.1038/ni889.
- Jedd D Wolchok, Bart Neyns, Gerald Linette, Sylvie Negrier, Jose Lutzky, Luc Thomas, William Waterfield, Dirk Schadendorf, Michael Smylie, Troy Guthrie, Jean-Jacques Grob, Jason Chesney, Kevin Chin, Kun Chen, Axel Hoos, Steven J O’Day, and Celeste Lebbé. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *The lancet oncology*, 11(2):155–64, February 2010. ISSN 1474-5488. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70334-1.
- Tomohide Yamazaki, Hisaya Akiba, Hideyuki Iwai, Hironori Matsuda, Mami Aoki, Yuka Tanno, Tahiro Shin, Haruo Tsuchiya, Drew M Pardoll, Ko Okumura, Miyuki Azuma, and Hideo Yagita. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(10):0–7, November 2002. ISSN 0022-1767.
- Sheng Yao, Shengdian Wang, Yuwen Zhu, Liqun Luo, Gefeng Zhu, Sarah Flies, Haiying Xu, William Ruff, Megan Broadwater, In-Hak Choi, Koji Tamada, and Lieping Chen. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood*, 113(23):5811–5818, June 2009. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2009-02-203141.
- Haiyan Ying, Lifen Yang, Guilin Qiao, Zhenping Li, Li Zhang, Fei Yin, Dong Xie, and Jian Zhang. Cutting edge: CTLA-4–B7 interaction suppresses Th17 cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(3):1375–8, August 2010. ISSN 1550-6606. doi: 10.4049/jimmunol.0903369.
- Xuewu Zhang, Jean-Claude D Schwartz, Xiaoling Guo, Sumeena Bhatia, Erhu Cao, Michael Lorenz, Michael Cammer, Lieping Chen, Zhong-Yin Zhang, Michael a Edidin, Stanley G Nathenson, and Steven C Almo. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity*, 20(3):337–47, March 2004. ISSN 1074-7613.

Xuemei Zhong, Joseph R Tumang, Wenda Gao, Chunyan Bai, and Thomas L Rothstein. PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. *European journal of immunology*, 37(9):2405–10, September 2007. ISSN 0014-2980. doi: 10.1002/eji.200737461.

Bing Zhu, Indira Guleria, Arezou Khosroshahi, Jaime Imitola, Miyuki Azuma, Hideo Yagita, Mohamed H Sayegh, Samia J Khoury, and Tanuja Chitnis. Differential Role of Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-Ligand 2 in Regulating the Susceptibility and Chronic Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 176(6):3480–3489, 2006.