

6. Summary

Cytotoxic effector CD8⁺ T cells (CTLs) are responsible for the elimination of viruses and some malignancies. However, during chronic infections with viruses, like HIV, these cells become dysfunctional or exhausted. The dysfunction of CTLs is partly induced by inhibitory receptors up-regulated on these cells during chronic infection. However, effector CD8⁺ T cells express high levels of inhibitory receptors already during acute viral infections, but remain functional at this time point. This indicates that inhibitory receptors also regulate T cell functionality during the acute phase of infection. In the current study the Friend retrovirus (FV) mouse model was used to define the mechanisms that regulate CD8⁺ T cell immunity. From previous studies it was known that myeloid cells are targets for FV infection during acute and chronic phase. We performed a detailed characterization of subpopulations of myeloid cells as targets for FV during acute infection. FV preferentially infected granulocytes and monocytes and reduced the frequencies of these myeloid cells significantly in the spleen of infected mice. A few macrophages and mDCs were also infected with FV. A detailed phenotypic characterization of infected myeloid cells showed an up-regulation of the inhibitory ligands PD-L1, PD-L2, CD270 (HVEM), CD80, CD86, CD200, and CD48 in comparison to non-infected myeloid subpopulations. Simultaneously virus-specific CD8⁺ T cells were analyzed for the expression of the receptors for these ligands. We observed that effector CD8⁺ T cells expressed many different inhibitory receptors on the cell surface after infection. Thus, infected myeloid cells expressing inhibitory molecules likely escaped the elimination by virus-specific CD8⁺ T cells positive for inhibitory receptors. In order to determine whether CD270, which was expressed on infected myeloid cells, suppresses CTL responses and interferes with the elimination of virus, we performed blocking experiments. Treatment with anti-CD270 antibodies, which selectively blocked the interaction of CD270 ligand to both its inhibitory receptors CD160 and CD272 was performed. Treated mice significantly reduced viral loads, however, the numbers of effector CD8⁺ T cells were not changed.

From previous studies it was known that regulatory T cells and myeloid-derived suppressor cells also downregulate the functionality of CTLs during acute FV infection. In order to improve the elimination of FV by enhancing the functionality of CTLs two different combination treatments were performed.

In the first treatment experiment, Tregs were eliminated and the checkpoint receptors/ligands interaction was blocked with antibodies against PD-L1 and Tim-3. This combination treatment led to a strong expansion of CD8⁺ and CD4⁺ T cells producing the cytotoxic molecule granzyme B and improved elimination of FV. However, the combination treatment resulted in an expansion of MDSCs as a possible compensatory effect, which was necessary for the control of expanded CTLs. In the second combination treatment experiment, PD-L1 and Tim-3 were blocked and MDSCs were depleted with anti-Ly6G antibodies. While the treatment with PD-L1 and Tim-3 blocking antibodies as well as the depletion of MDSCs resulted in reduced numbers of FV infected cells when applied individually, the combination treatment did not lead to a further improvement of efficacy. This second combination therapy was not associated with the expansion of virus-specific CD8⁺ T cells and resulted in a reduction of Tregs instead of an increase. The current data allows us to better understand the very complex system that regulates the adaptive T cell response during a virus infection. This knowledge can be essential for the development of efficient and safe immunomodulatory therapies against tumors and infectious diseases.

7. Zusammenfassung

Zytotoxische CD8⁺ Effektor-T-Zellen (ZTL) sind für die Eliminierung von Virusinfektionen und Tumorerkrankungen verantwortlich. In chronischen Infektionen mit Viren wie zum Beispiel HIV kommt es jedoch zur Erschöpfung und Dysfunktion dieser Zellen. Die Dysfunktion der ZTL wird zum Teil durch eine starke Expression inhibitorischer Rezeptoren in der chronischen Infektion induziert, andererseits exprimieren CD8⁺ Effektor-T-Zellen auch schon in der akuten Phase viraler Infektionen in einem hohen Maß inhibitorische Rezeptoren, bleiben zu diesem Zeitpunkt aber funktional. Dies deutet darauf hin, dass inhibitorische Rezeptoren auch während der akuten Phase der Infektion die T-Zell-Funktionalität regulieren. In der vorliegenden Studie wurde das Friend Retrovirus (FV) Mausmodell genutzt um Mechanismen zu definieren, welche die CD8⁺-T-Zell-Immunität regulieren. Aus vorangegangenen Studien war bekannt, dass myeloide Zellen Zielzellen für die FV-Infektion sowohl in der akuten als auch der chronischen Phase darstellen. Es wurde daher detailliert untersucht, welche Subpopulationen myeloider Zellen Zielzellen von FV in der akuten Infektion darstellen. FV infizierte bevorzugt Granulozyten und Monozyten, und die Infektion führte zu einer signifikanten Reduktion in der Frequenz dieser myeloiden Zellen in den Milzen infizierter Mäuse. Auch einige Makrophagen und mDCs wurden durch FV infiziert. Eine detaillierte phänotypische Charakterisierung infizierter myeloider Zellen zeigte eine stärkere Expression der inhibitorischen Liganden PD-L1, PD-L2, CD270 (HVEM), CD80, CD86, CD200 und CD48 im Vergleich mit nicht-infizierten myeloiden Subpopulationen. Es wurde andererseits auch die Expression der Rezeptoren dieser inhibitorischen Liganden auf Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen untersucht, hierbei zeigte sich, dass CD8⁺ Effektor-T-Zellen nach der Infektion zahlreiche Rezeptoren auf der Oberfläche exprimieren. FV-infizierten myeloiden Zellen gelingt es also wahrscheinlich auf Grund der hohen Expression inhibitorischer Liganden, der Eliminierung durch Virus-spezifische CD8⁺ T-zellen zu entgehen. Um zu untersuchen ob das auf infizierten myeloiden Zellen stark exprimierte CD270 die ZTL-Antwort unterdrückt und die Virus-Eliminierung verhindert, wurden Mäuse mit einem blockierenden Antikörper behandelt, welcher selektiv die Interaktion von CD270 mit den inhibitorischen Rezeptoren CD160 und CD272 inhibiert. Mit dem Antikörper behandelte Mäuse zeigten signifikant reduzierte Viruslasten, allerdings blieb die Zahl an CD8⁺ Effektor-T-Zellen unverändert.

Aus früheren Studien war bekannt, dass auch regulatorische T-Zellen und myeloide suppressive Zellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) die Funktionalität von ZTL während der

akuten FV-Infektion herabregulieren. Um die Eliminierung von FV zu verbessern wurden daher zwei verschiedene Kombinations-Therapien eingesetzt, welche die ZTL-Funktionalität steigern sollten. In einem ersten Ansatz wurden Tregs depletiert und blockierende Antikörper gegen PD-L1 und Tim-3 eingesetzt. Diese Kombinations-Therapie führte zu einer starken Expansion von Granzym B-produzierenden CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen und verbesserte die Eliminierung von FV. Allerdings führte diese Therapie auch zu einer, möglicherweise kompensatorischen, Expansion von MDSCs, welche vermutlich die expandierte ZTL-Population kontrollierte. In einem zweiten Therapie-Ansatz wurde die Blockade von PD-L1 und Tim-3 mit der Depletion von MDSCs durch einen Ly6G-Antikörper kombiniert. Während sowohl die Applikation von PD-L1- und Tim3-Antikörpern und die Depletion von MDSCs allein zu einer reduzierten Zahl FV-infizierter Zellen führte, wurde durch die Kombinations-Therapie keine weitere Verbesserung der Effektivität erreicht. Auch führte diese Kombinations-Therapie nicht zu einer Expansion Virus-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, jedoch unerwartet zu einer Reduktion der Anzahl von Tregs.

Die vorliegenden Daten ermöglichen uns ein besseres Verständnis der sehr komplexen Mechanismen, welche die adaptive T-Zell-Antwort während einer Virus-Infektion regulieren, und können wichtige Erkenntnisse liefern für die Entwicklung effektiver und sicherer immunmodulatorischer Therapien gegen Infektions- und Tumor-Erkrankung.

