

**Negative Kostimulation  
zur Verhinderung der humanen T-Zellreaktivität  
gegen porcines Xenoantigen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat

genehmigte Dissertation von

Dipl. Biol. Annegret Plege

geboren am 30.03.1981 in Clausthal-Zellerfeld

2009

Referent: Prof. Dr. R. Schwinzer

Korreferent: Prof. Dr. R. Jacobs

Tag der Promotion: 18.06.09

## Zusammenfassung

Bei einer Transplantation von porzinen Geweben und /oder Organen in den Menschen muss mit Immunantworten gerechnet werden, die deutlich heftiger und komplexer sind als bei der Allotransplantation. Dennoch existieren in der Xenosituation Möglichkeiten zur Immunmodulation, die bei der Transplantation von Mensch-auf-Mensch nicht umsetzbar sind. Hierzu zählt z.B. die gentechnische Veränderung des Schweins als potentiellen Organspender mit dem Ziel, die Immunantworten des Empfängers zu vermindern. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Überexpression der humanen negativ-kostimulatorischen Moleküle PD-L1 oder PD-L2 auf porzinen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) eine Inhibition der humanen anti-porzinen T-Zellaktivierung bewirkt, sowie ob PD-L1 auf porzinen Zellen auch Auswirkungen auf die Aktivität humaner Effektorzellen ( $CD8^+$  T-Zellen und NK-Zellen) hat. Zudem wurde in einem Ratten-Transplantationsmodell untersucht, ob die Überexpression von PD-L1 auf porzinen Zellen diese Zellen vor einer Abstoßung schützt.

Um diese Konzepte zu prüfen, wurden zunächst porzine APC (B-Zelllinie L23), die entweder humanes PD-L1 oder humanes PD-L2 stark exprimierten (L23-PD-L1-, L23-PD-L2-Zellen) und Leervektor-Transfektanten (L23-GFP-Zellen) generiert. Bei der Aktivierung humaner  $CD4^+$  T-Zellen mit den PD-L-Transfektanten zeigte sich, dass die PD-L1/2 Expression zu einer verminderten Proliferation der  $CD4^+$  T-Zellen sowie zu einer geringeren Synthese von proliferationsfördernden Zytokinen (z.B. IL-2) in den  $CD4^+$  T-Zellen führte. Die Synthese des immunsupprimierenden Zytokins IL-10 hingegen war vergleichsweise hoch in  $CD4^+$  T-Zellen, die PD-L1/2 Signale erhielten. In Langzeitkulturen von  $CD4^+$  T-Zellen mit PD-L-Transfektanten tauchten vermehrt  $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$   $T_{regs}$  auf, die eine starke supprimierende Wirkung auf die Aktivierung von  $CD4^+$  T-Zellen hatten. Auch die zytotoxische Aktivität humaner Effektorzellen wurde durch PD-L1 auf porzinen Zellen beeinflusst. Die Lyse porziner PD-L1-Transfektanten durch humane  $CD8^+$  zytotoxische Effektorzellen und durch NK-Zellen war gegenüber der Lyse porziner Kontroll-Zellen um etwa 50% vermindert. Nach der Transplantation von L23-GFP- und L23-PD-L1-Zellen unter die Nierenkapsel von Ratten waren sowohl die L23-GFP- wie auch die L23-PD-L1-Zellen an Tag 7 nach Transplantation nicht mehr unter der Nierenkapsel nachzuweisen. In den transplantierten Nieren wurden T-Zell- und NK-Zellinfiltrate nachgewiesen, wobei die T-Zellinfiltrate und NK-Zellinfiltrate in Nieren, die mit L23-PD-L1-Zellen transplantiert wurden, schwächer ausfielen als in Nieren, die mit L23-GFP-Zellen transplantiert wurden.

Weiterhin wurden an Tag 7 nach Transplantation auch anti-L23-Antikörper im Blut transplantierte Ratten detektiert. Ein Vergleich der Intensitäten der Antikörperbildung zeigte, dass die Antikörperantworten in Tieren, die L23-PD-L1-Zellen erhielten, im Schnitt geringer ausfiel als in Tieren, die L23-GFP-Zellen erhielten.

Aus diesen Daten wird der Schluss gezogen, dass die PD-L-Überexpression auf porzinen APC die humane CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung in der Induktionsphase effektiv vermindern kann. Zudem deuten die Daten darauf hin, dass auch die Aktivierung von humanen zytotoxischen Effektorzellen durch die Überexpression von PD-L1 auf porzinen Zellen unterdrückt werden kann. Die bisherigen Befunde aus dem Ratten-Transplantationsmodell weisen darauf hin, dass die Expression von PD-L1 auf L23-Zellen keinen generellen Schutz vor Abstoßung vermitteln kann. Die geringen zellulären Infiltrate nach L23-PD-L1-Transplantation und die verminderte anti-L23-Antikörperbildung machen es jedoch wahrscheinlich, dass PD-L1 auch *in vivo* die Kapazität hat, Immunantworten zu dämpfen. Somit scheinen die Moleküle PD-L1 und PD-L2 interessante Zielstrukturen für die Erstellung transgener Schweine zur Modulation humaner zellulärer Immunantworten gegen Xenotransplantate zu sein.

Schlagnworte: PD-1/PD-Liganden, negative Kostimulation, Xenotransplantation

## Abstract

The transplantation of porcine tissues and/or organs in humans will lead to immune responses that are expected to be stronger and more complex compared to allotransplantation. However one advantage of xenotransplantation is the possibility to generate genetically modified pigs as potential organ donors with the aim to downregulate immune responses of the recipient. We asked whether overexpression of humane negative costimulatory molecule PD-L1 or PD-L2 on pig antigen presenting cells (APC) has the capacity to modulate human anti-pig CD4<sup>+</sup> T cell responses and whether overexpression of human PD-L1 on pig cells has also inhibitory effects on human cytotoxic CD8<sup>+</sup> effector cells or NK cells. Furthermore we asked whether overexpression of PD-L1 on pig cells protects these cells from rejection in a rat transplantation model.

To test these concepts we generated pig APC ( B-cell line L23) overexpressing human PD-L1 or PD-L2 (L23-PD-L1, L23-PD-L2 cells) as well as control cells (L23-GFP cells). CD4<sup>+</sup> T cells responded with significantly reduced proliferation to PD-L1/2 transfected pig cells and produced less cytokines that enhance proliferation (e.g. IL-2) than cells stimulated with pig control cells. The immunosuppressive cytokine IL-10, however, was increased in CD4<sup>+</sup> T cells responding to stimulation with PD-L1/2 transfectants. In longterm cultures of CD4<sup>+</sup> T cells stimulated with PD-L1 transfectants, we observed that a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> cell population showed up, that effectively suppressed activation of conventional human CD4<sup>+</sup> T cells. Furthermore, PD-L1 overexpression on pig cells also affected cytotoxicity of human effector cells. Porcine PD-L1 transfectants were protected to about 50% from the lysis by human cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells compared to pig control cells. After transplantation of L23-GFP or L23-PD-L1-transfectants under the kidney capsule of rats, on day seven after transplantation neither L23-GFP nor L23-PD-L1 cells were found under the kidney capsules. Immunohistological analysis revealed that rat T cells and NK cell infiltrated in the kidneys transplanted with L23-GFP and L23-PD-L1 cells. However less T cell and NK cell infiltrates were observed in kidneys transplanted with L23-PD-L1 cells compared to kidneys transplanted with L23-GFP cells. Furthermore, anti-L23-antibodies were detected in rats transplanted with L23-GFP or L23-PD-L1 cells on day seven after transplantation. A comparison of the intensities of the antibody responses in recipient animals of L23-GFP or L23-PD-L1 cells indicated slightly diminished antibody responses of animals transplanted with PD-L1 expressing cells.

Our data indicate that PD-L overexpression on pig APC can efficiently downregulate human anti-pig CD4<sup>+</sup> T cell responses in the induction phase. Furthermore, our data suggest that strong PD-L1 signaling on pig cells also inhibits the activity of human cytotoxic effector cells. The first results from the rat transplantation model suggest, that PD-L1 expression on L23 cells can not avoid the rejection of the porcine cells. However the reduced infiltrates and the lower antibody responses after L23-PD-L1 transplantation indicate that PD-L1 has also *in vivo* the capacity to dampen immune responses. Thus PD-L1/2 seem to be interesting target molecules for the generation of transgenic pigs to modulate human anti-pig cellular responses after xenotransplantation.

Key words: PD-1/PD-ligands, negative costimulation, xenotransplantation

## Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
ABSTRACT .....	III
INHALTSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VI
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Problemstellung.....	1
1.2 Übersicht zu Abstoßungsreaktionen.....	4
1.2.1 Antikörper- und Komplement-vermittelte Abstoßung.....	4
1.2.2 Zell-vermittelte Abstoßungsreaktionen.....	5
1.3 Möglichkeiten zur Modulation von T-Zell-Antworten .....	8
1.3.1 Deletion von reaktiven T-Zellen im Thymus .....	9
1.3.2 Rolle von regulatorischen T-Zellen.....	10
1.3.3 Beeinflussung von Kostimulationswegen .....	11
<b>2. DISKUSSION .....</b>	<b>15</b>
2.1 Wirkungen von PD-L1/2 auf die Induktionsphase einer T-Zellaktivierung .....	16
2.2 Wirkung von PD-L1 in der Effektorphase .....	19
2.3 Schützt die PD-L1-Expression porcine Transplantate vor einer Abstoßung <i>in vivo</i> ?....	21
2.4 Ausblick: PD-L1 transgene Schweine als Organspender für die klinische Xenotransplantation .....	24
<b>3. REFERENZEN.....</b>	<b>28</b>
<b>4. ANHANG .....</b>	<b>36</b>
A) Manuskript 1 .....	36
B) Manuskript 2 .....	37
C) Zusätzliche unveröffentlichte Daten .....	63
BISHERIGE WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN .....	70
LEBENS LAUF.....	72
DANKSAGUNG.....	73

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende-Zelle ( <i>antigen-presenting-cell</i> )
AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazol
CD	Unterscheidungsgruppen ( <i>cluster of differentiation</i> )
cpm	Zählimpuls pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
d	Tag ( <i>day</i> )
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
GFP	grün-fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescence protein</i> )
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HLA	Humanes-Leukozyten-Antigen ( <i>human leukocyte antigene</i> )
<sup>3</sup> H-TdR	tritiummarkiertes-Thymidin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITSM	<i>immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	<i>programmed-death-receptor</i>
PD-L	<i>programmed-death-receptor-ligand</i>
PE	Phycoerythrin
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion
SHP	<i>Src homology domain-containing protein tyrosine phosphatase</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zellrezeptor

# 1. Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Der anhaltende Organmangel stellt in der klinischen Transplantation ein großes Problem dar. Dieses Problem könnte durch den Ersatz von humanen Organen durch porcine Organe überwunden werden. Bei der Transplantation von porcinen Organen in den Menschen ist mit starken Abstoßungsreaktionen zu rechnen. Die Erzeugung transgener Tiere und hiermit die Möglichkeit Spender-Organen gentechnisch so zu verändern, dass humane Abstoßungsreaktionen gegen diese Organe minimiert werden, ist ein Vorteil der Xenotransplantation. Durch molekularbiologische Methoden und den Einsatz neuer Klonierungstechniken bei der Erzeugung transgener Schweine konnten in den letzten Jahren große Fortschritte bei den Strategien zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen nach Xenotransplantation erzielt werden.

So stellt die transgene Expression von humanen Komplementregulatoren wie CD55 oder CD59 auf Schweineorganen eine Möglichkeit dar, um die Komplementaktivierung zu verhindern, die für die hyperakuten Abstoßungsreaktionen verantwortlich ist [1]. Mittlerweile stehen auch alpha1,3-Galaktosyltransferase-*knock-out* Schweine zur Verfügung [2], welche eine weitere Möglichkeit bieten, um die durch präformierte Antikörper vermittelte Komplementaktivierung zu unterbinden. Somit gibt es vielversprechende Konzepte zur Vermeidung der hyperakuten Abstoßung und für die weitere Entwicklung der klinischen Xenotransplantation sind nun zunehmend Kenntnisse über die zellulär-vermittelten Abstoßungsmechanismen und deren Vermeidung erforderlich.

Natürliche Killer (NK)-Zellen gehören zu den ersten Zellen, die ein fremdes Transplantat erkennen und attackieren. Da humane NK-Zellen in der Lage sind, porcine Endothelzellen *in vitro* zu lysieren, [3] ist davon auszugehen, dass NK-Zellen bei der akut vaskulären Abstoßung nach Xenotransplantation eine Rolle spielen. Die Expression des HLA-E-Proteins auf porcinen Zellen führt zu einem inhibitorischen Signal in humanen NK-Zellen [4] und stellt eine Möglichkeit dar, die NK-Zell-vermittelte akute vaskuläre Abstoßung zu kontrollieren.

Nach einer Xenotransplantation muss auch mit starken T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktionen gerechnet werden. Porcine Antigen-präsentierende Zellen (APC) sind

trotz der Speziesbarriere in der Lage humane T-Zellen vollständig zu aktivieren [5, 6]. Die vollständige T-Zellaktivierung deutet darauf hin, dass Interaktionen zwischen dem humanen T-Zellrezeptor und den porcinen MHC-Molekülen, sowie Interaktionen zwischen kostimulatorischen Molekülen auf porcinen APC (z. B. CD80/86, CD40) und ihren Liganden auf humanen T-Zellen, funktionell sind.

Ein Konzept zur Vermeidung der humanen anti-porcinen T-Zellaktivierung stellt die Inhibition von kostimulatorischen Signalen durch Blockade der Rezeptor-Ligand-Interaktionen zwischen humanen T-Zellen und porcinen APC dar. Die Blockade kostimulatorischer Signale brachte in Allo- und Xenotransplantationsmodellen vielversprechende Ergebnisse. So konnte zum Beispiel durch die Kombination der Blockade von CD28:CD80/86- und CD154 (CD40L):CD40-Interaktionen das Überleben von porcinen Inselzellen in Primaten deutlich verlängert werden [7]. Bei der Transplantation von porcinen Herzen in Primaten wurde durch die Kombination der CD154-Blockade mit gleichzeitiger Gabe von Immunsuppressiva ein Transplantatüberleben von 2-6 Monaten erreicht [8]. Somit führt die Blockade der positiven kostimulatorischen Interaktionen zwar zu verminderten Abstoßungsreaktionen, wird aber alleine vermutlich nicht ausreichend sein, um eine langanhaltende Toleranz nach Xenotransplantation zu erzielen.

Eine weitere Möglichkeit, die humane anti-porcine T-Zellantwort zu inhibieren, ergibt sich aus dem neuem Konzept der negativen Kostimulation. Zusätzlich zu den klassischen positiv-kostimulatorischen Molekülen CD80/86 der B7 Familie sind in den letzten Jahren neue B7 Familien-Mitglieder bekannt geworden, die keine positiven, sondern negative Signale in T-Zellen vermitteln [9, 10]. Ein Beispiel für Rezeptor-Ligand-Interaktionen, die negative Signale in T-Zellen auslösen, sind der Rezeptor PD-1 (*Programmed death-1*) und seine Liganden PD-L1 und PD-L2 [11].

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob das Verstärken negativ-kostimulatorischer Signale auf porcinen Zellen durch transgene Expression humaner PD-L1- bzw. PD-L2-Moleküle ein wirksames Konzept darstellt, um humane zelluläre anti-porcine Immunantworten nach einer Transplantation von porcinen Zellen oder Geweben in den Menschen zu unterdrücken. Hierzu wurden folgende Teilziele bzw. Fragestellungen bearbeitet:

1. Erzeugung von porzinen APC, die humanes PD-L1/2 stabil überexprimieren. Hierzu wurden die humanen PD-L1- und PD-L2-Gensequenzen in einen Expressionsvektor kloniert und es erfolgte die Transfektion von L23-Zellen (porzine B-Zelllinie) mit dem humanen PD-L1- bzw. dem humanem PD-L2-Konstrukt. Außerdem wurden L23-Zellen mit dem Leervektor transfiziert (L23-GFP). Anschließend wurden Zelllinien, die die Transgene stabil überexprimieren (L23-PD-L1, L23-PD-L2, L23-GFP), generiert.
2. Welche Auswirkungen hat die PD-L1/2-Überexpression auf die humane CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung? Hierzu wurde die stimulatorische Kapazität von L23-PD-L1- oder L23-PD-L2-Transfektanten gegenüber humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit der stimulatorischen Kapazität von Leervektor-Transfektanten (L23-GFP) verglichen. Zusätzlich wurden die Effekte von PD-L1 oder PD-L2 Signalen auf die Entstehung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen analysiert.
3. Hat PD-L1 auf porzinen Zellen einen protektiven Effekt gegenüber der Lyse durch humane zytotoxische Effektorzellen? Es wurde geprüft, in welchem Umfang L23-GFP- bzw. L23-PD-L1-Zellen durch humane CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen zerstört werden.
4. Kann die PD-L1-Überexpression auf porzinen Zellen *in vivo* anti-porzine zelluläre Immunantworten unterdrücken? Nach Transplantation von L23-PD-L1- und L23-GFP-Zellen unter die Nierenkapsel von Ratten wurden die Infiltrate in den transplantierten Nieren und die Antikörper-Titer gegen L23-Zellen in den Ratten untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in kumulativer Form anhand von zwei Manuskripten sowie einem weiteren Einzelkapitel zusammengefasst. Die Ergebnisse zur Generierung von porzinen APC, die humanes PD-L1 oder PD-L2 exprimieren, und die Ergebnisse zu den Wirkungen der Transgene PD-L1/2 auf die humane CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung sind im Manuskript „*Suppression of Human T-cell Activation and Expansion of Regulatory T cells by Pig Cells Overexpressing PD-Ligands*“ (Anhang A) dargestellt. Im Manuskript „*Overexpression of human PD-Ligand-1 protects pig cells from lysis by human cytotoxic effector cells*“ (Anhang B) sind die Untersuchungen zum protektiven Effekt von PD-L1 auf

porzinen Zellen gegenüber der Lyse durch humane zytotoxische Effektorzellen zusammengefasst. Die Ergebnisse zur *in vivo*-Wirkung von PD-L1, die mithilfe eines Ratten-Modells generiert wurden, sind in einem zusätzlichen Einzelkapitel mit noch unveröffentlichten Daten zusammengestellt (Anhang C).

## 1.2 Übersicht zu Abstoßungsreaktionen nach Xenotransplantation

Die Abstoßungsreaktionen in der Xenotransplantation lassen sich in die Abstoßungsmechanismen, die durch Antikörper und Komplement vermittelt werden, und die zellulären Abstoßungsmechanismen unterteilen. Im Folgenden werden die verschiedenen Mechanismen erläutert, wobei besonders auf die T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktionen eingegangen wird.

### 1.2.1 Antikörper- und Komplement-vermittelte Abstoßung

Die erste Barriere, die es für eine erfolgreiche Xenotransplantation zu überwinden gilt, stellt die hyperakute Abstoßung dar. Diese wird durch präformierte Antikörper, die an vaskuläre porcine Endothelzellen binden und eine Komplementaktivierung bewirken, vermittelt. Viele dieser präformierten Antikörper sind gegen Galaktose- $\alpha$ 1,3-Galaktose (Gal)-Epitope gerichtet. Gal-Epitope entstehen durch die Umwandlung von Galaktose- $\beta$ 1,4-Galaktose durch das Enzym  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase. Das Gen für die  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase liegt beim Menschen und bei Alt-Welt-Affen nur noch als Pseudogen vor [12], ist aber in allen anderen Säugetieren funktional. Daher exprimieren Menschen und Alt-Welt-Affen keine Gal-Epitope [13], weisen aber präformierte Antikörper gegen diese Strukturen auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass auch viele Mikroorganismen, mit denen Menschen oder Alt-Welt-Affen in Kontakt kommen Gal-Epitope exprimieren [14]. Eine Möglichkeit die durch diese anti-Gal-Antikörper ausgelöste hyperakute Abstoßung zu minimieren, besteht in der Generierung von  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase-*knock-out*-Schweinen. Diese Schweine stehen mittlerweile zur Verfügung [2] und es konnte auch gezeigt werden, dass die hyperakute Abstoßung, die durch Gal-Expression auf porcinen vaskulärem Endothel verursacht wird, durch den Einsatz von Gal-*knock-out*-Organen unterdrückt werden kann, was zu längeren Überlebenszeiten der Transplantate in Primaten führte [8, 15]. Zusätzlich zu den präformierten anti-Gal-Antikörpern tragen auch sogenannte non-Gal-Antikörper zur Komplementaktivierung und damit zur Abstoßung bei [16]. Ein Ansatz auch diese Komplementaktivierung zu inhibieren,

besteht in der Generierung von Schweinen, die humane komplementregulatorische Moleküle wie CD55 oder CD59 exprimieren [17, 18]. Die Wirksamkeit dieses Konzeptes konnte bereits *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden. So wurde gezeigt, dass porcine Endothelzellen durch die Expression von humanem CD59 vor der Lyse durch humanes Komplement geschützt sind [19]. Des Weiteren wurde bei der Transplantation von CD55/59-transgenen Nieren in Primaten verlängerte Überlebenszeiten beobachtet [20]. Auch die Expression des humanen Komplementregulators CD46 hat sich als wirksam erwiesen, um humane Komplementaktivierung durch porcine Zellen zu inhibieren [21, 22]. Es gibt also vielversprechende Konzepte zur Vermeidung der hyperakuten Abstoßung nach einer Xenotransplantation.

### 1.2.2 Zell-vermittelte Abstoßungsreaktionen

Zu den Zellen, die eine angeborene Immunantwort vermitteln, zählen Monozyten/Makrophagen, neutrophile Zellen und NK-Zellen. Nach einer Xenotransplantation wird damit gerechnet, dass Monozyten/Makrophagen und neutrophile Zellen zu den ersten Zellen zählen, die zum Transplantatsort rekrutiert werden und dort durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine einen Entzündungsherd entstehen lassen [23, 24]. Die Ausbildung des Entzündungsherdes führt zur Rekrutierung weiterer Immunzellen wie den NK-Zellen. Da *in vitro* gezeigt werden konnte, dass humane NK-Zellen in der Lage sind, porcine Endothelzellen effizient zu lysieren [3], wird von einer wichtigen Rolle der NK-Zellen bei der Abstoßung von porcinen Organen im Menschen ausgegangen. Die Regulation von NK-Zell-Aktivität erfolgt durch inhibitorische und aktivierende Rezeptoren. Die Bindung von Selbst-MHC-Klasse-I-Molekülen führt zu einem starken inhibitorischen Signal in NK-Zellen. Daher könnte die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber porcinen Endothelzellen dadurch erklärt werden, dass das Schweine-Leukozyten-Antigen-Klasse-I nicht in der Lage ist, humanen NK-Zellen ein inhibitorisches Signal zu vermitteln. Die Expression des Humanen-Leukozyten-Antigen-E (HLA-E) auf porcinem Endothel führte in *in vitro*-Versuchen zu einem Schutz des Endothels vor der Lyse durch humane NK-Zellen [25], was darauf hin deutet, dass die transgene Expression von HLA-E auf porcinem Endothel negative Signale in humanen NK-Zellen auslöst. Die Erstellung von HLA-E transgenen Schweinen könnte in Kombination mit anderen Strategien (z. B. *knock-out* von aktivierenden Liganden für humane NK-Zellen in Schweinen) eine effiziente Methode darstellen, um

Schweinezellen und Schweinegewebe vor der Zerstörung durch humane NK-Zellen zu schützen.

Durch die sehr früh auftretenden durch anti-Gal-Antikörper-vermittelte hyperakuten Abstoßungsreaktionen gegen porzines vaskularisiertes Gewebe war es lange schwierig, die adaptiven zellulären Abstoßungsmechanismen in Primaten nach einer porzinen Zell- oder Gewebstransplantation zu untersuchen. Da Inselzelltransplantate nicht vaskularisiert sind und somit keiner hyperakuten Abstoßung unterliegen, stellen diese ein gutes Modell für Untersuchungen der T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktionen dar. Hier konnte gezeigt werden, dass die Transplantation porziner Inselzellgewebe in diabetische Rhesus-Makaken ohne Immunsuppression zu einer akut-zellulären Abstoßung führte, an der  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  T-Zellen und Makrophagen beteiligt waren [26]. Bei der Transplantation von  $CD46$ -transgenen porzinen Herzen in Primaten und der Gabe von B-Zell-depletierenden Antikörpern, sowie einem  $\alpha 1,3Gal$ -Polymer zur Depletion von anti- $\alpha 1,3Gal$ -Antikörpern, wurden die Transplantate nach 5-7 Tagen abgestoßen. Immunhistologische Färbungen von Infiltraten zeigten, dass  $CD4^+$  T-Zellen an dieser Abstoßung stark beteiligt waren [27]. Auch Untersuchungen von vaskularisierten porzinen Gal-*knock-out*-Organen deuten auf eine wichtige Rolle der T-Zellaktivierung im Rahmen der Abstoßung hin. So konnten Kuwaki *et al.* nach der Transplantation von porzinen Gal-*knock-out*-Herzen in Primaten durch eine T-Zellsuppression deutlich verlängertes Transplantatüberleben bewirken [8]. Somit stellen die T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktionen eine der nächsten Barrieren auf dem Weg zur erfolgreichen Xenotransplantation dar.

Die Aktivierung einer T-Zelle erfordert mindestens zwei Signale [28, 29]. Signal 1 wird durch die Interaktion zwischen MHC-Klasse II und dem T-Zellrezeptor und Signal 2 durch die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen und Liganden (z.B.  $CD80/86$  und  $CD28$ ) vermittelt. Nach einer Transplantation kann es entweder über den direkten Weg oder über den indirekten Weg zu einer Aktivierung der Empfänger T-Zellen kommen.

Der direkte Weg der T-Zellaktivierung erfolgt durch Antigen-präsentierende Zellen des Spenders, die mit dem Transplantat in den Empfänger eingebracht werden. Diese APCs wandern in die peripheren Lymphknoten und führen dort zur Aktivierung der Empfänger-T-Zellen. Der direkte Weg wurde in Allotransplantationsmodellen gut untersucht und es wird davon ausgegangen, dass dieser Weg vor allem in der Frühphase nach einer Transplantation wichtig ist [30]. In Bezug auf die Xenotransplantation stellte sich zunächst die Frage, ob

porzine APC überhaupt in der Lage sind, über die Speziesbarriere hinweg humane T-Zellen zu aktivieren. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass porzine APCs eine starke humane T-Zell-Antwort auslösen können [31]. Dies impliziert, dass effiziente funktionelle Interaktionen zwischen den porzinen MHC-Molekülen und dem humanen T-Zellrezeptor sowie zwischen den kostimulatorischen Molekülen (CD80/86, CD40) auf den APC und den entsprechenden Liganden auf den humanen T-Zellen stattfinden. Dies konnte durch die Generierung von Transfektanten, die ausschließlich porzines CD40, CD80 oder CD86 in Kombination mit porzinem MHC-II exprimierten, und eine deutliche humane T-Zellaktivierung hervorriefen, bestätigt werden [32]. Der Vergleich der humanen *in vitro*-T-Zellantwort gegenüber porzinem Antigen und Alloantigen zeigte, dass Xenoantigen eine stärkere Aktivierung hervorruft als Alloantigen [31], was eine wichtige Rolle des direkten Weges der T-Zellaktivierung nach Xenotransplantation impliziert. Nach Transplantation von porzinen Inselzellen in Mäuse führte die Blockade von porzinem CD80/86 in der Frühphase nach Transplantation zusammen mit der Blockade von murinem CD80/86 im späteren Verlauf zu einem Langzeitüberleben der Transplantate [33]. Dies deutet darauf hin, dass auch in der *in vivo*-Situation der direkte Weg der Antigenpräsentation zumindest in der Frühphase nach Transplantation eine wichtige Rolle spielt. Im späteren Verlauf nach Transplantation scheint hingegen die indirekte Route der Antigenpräsentation wichtiger zu sein, was sich dadurch erklären lässt, dass die porzinen APC im Transplantat nach und nach von Empfänger-APCs ersetzt werden. Porzine Endothelzellen exprimieren nach Aktivierung CD80/86 und sind ebenfalls in der Lage T-Zellen zu aktivieren [34]. Da porzine Endothelzellen des Transplantates nicht gegen Empfänger-Endothelzellen ausgetauscht werden, könnte der direkte Weg der T-Zellaktivierung durch Endothel nach einer Xenotransplantation eine persistente Rolle spielen.

Bei dem indirekten Weg der T-Zellaktivierung wird Spender-Antigen von APCs des Empfängers prozessiert und auf Empfänger-MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert. Diese Empfänger-APCs aktivieren dann Empfänger-CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Nach Xenotransplantation steht aufgrund der Vielzahl inkompatibler Moleküle deutlich mehr Fremd-Antigen zur Verfügung, welches prozessiert und über die Selbst-MHC-Klasse II-Moleküle präsentiert wird als nach Allotransplantation. Deshalb werden nach einer Xenotransplantation porziner Organe in den Menschen deutlich stärkere T-Zellantworten über die indirekte Antigenpräsentation erwartet als nach einer Allotransplantation [35]. Dorling *et al.* konnten *in vitro* nachweisen, dass die humane indirekte T-Zellantwort gegen porzines Antigen deutlich stärker ausfällt, als gegen Alloantigen [31]. Verschiedene Maus-Xenotransplantationsmodelle, die zur Untersuchung der

direkten und der indirekten T-Zellaktivierung eingesetzt wurden, deuten auch *in vivo* auf eine wichtige Rolle der indirekten T-Zellaktivierung bei der Abstoßung von Xenotransplantaten hin [36-38]. Somit ist in der Xenotransplantation zusätzlich zur Aktivierung von T-Zellen über die direkte Route eine starke T-Zellaktivierung durch die indirekte Route der Antigenpräsentation zu erwarten.

Da beim indirekten Weg der T-Zellaktivierung die Antigenpräsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle erfolgt, ist hier in erster Linie mit der Ausbildung von CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen zu rechnen. Beim direkten Weg der T-Zellaktivierung entstehen hingegen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen, da die CD8<sup>+</sup> T-Zellen hier durch das fremde MHC-Klasse I auf den Spender-APCs aktiviert werden können. CD4<sup>+</sup> Effektorzellen zeichnen sich durch Proliferation und Zytokinproduktion aus und sind in der Lage B-Zellen zu aktivieren, die dann wiederum eine spezifische Antikörper-Antwort vermitteln. CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen hingegen besitzen nach Aktivierung ein zytotoxisches Potential und können Zellen mit fremden MHC-Klasse I bzw. Zellen mit fremden Peptiden auf dem MHC-Klasse I spezifisch erkennen und durch die Ausschüttung von Perforin/Granzymen oder Fas-Ligand-Fas-Interaktionen töten. Somit ist es in der Transplantation wichtig sowohl die CD4<sup>+</sup> als auch die CD8<sup>+</sup> T-Zellaktivierung zu unterdrücken, um eine Transplantat-Abstoßung zu verhindern.

### **1.3 Möglichkeiten zur Modulation von T-Zell-Antworten**

Im Falle der Allotransplantation hat sich die Gabe von immunsupprimierenden Medikamenten, um T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktionen zu vermeiden als sehr erfolgreich herausgestellt. Allerdings ist eine Langzeittherapie mit toxischen Nebenwirkungen verbunden. Da T-Zellantworten gegen Xenoantigen deutlich stärker ausfallen als gegen Alloantigen, ist die unspezifische Immunsuppression durch Medikamente in der Xenotransplantation für den langanhaltenden Schutz des Transplantates wahrscheinlich nicht ausreichend [39-41]. Außerdem sind die nötigen Dosen, um eine xenogene T-Zellantwort zumindest teilweise zu unterdrücken, mit starken toxischen Nebenwirkungen verbunden [42]. Daher sind für die Xenotransplantation weitere T-Zell-Modulationswege wünschenswert. Das Ziel hierbei ist möglichst eine spezifische T-Zell-Toleranz gegenüber dem Transplantat zu induzieren. Als Toleranz wird eine fehlende Immunantwort gegen einzelne Antigene bei ansonsten normaler Immunkompetenz bezeichnet. Es gibt einige vielversprechende Ansätze für die Modulation von T-Zellantworten mit dem Ziel einer Toleranzinduktion gegenüber

einem Transplantat. Auf die Deletion von reaktiven T-Zellen im Thymus, die Rolle von regulatorischen T-Zellen ( $T_{\text{regs}}$ ) sowie die Bedeutung von Kostimulationswegen bei der Modulation von T-Zellantworten soll im Folgenden näher eingegangen werden.

### 1.3.1 Deletion von reaktiven T-Zellen im Thymus

Im Thymus kommt es während der Reifung der T-Zellen zur Induktion von Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen. Es werden die T-Zell-Klone selektioniert, die eine schwache Affinität gegenüber dem körpereigenen MHC aufweisen, solche Klone, die eine hohe Affinität oder gar keine Affinität gegenüber dem eigenem MHC besitzen, werden eliminiert. Damit soll sichergestellt sein, dass T-Zell-Klone, die aus dem Thymus in die peripheren lymphatische Gewebe gelangen, fremde Peptide auf eigenem MHC von körpereigenen Peptiden auf eigenem MHC unterscheiden können. Der Prozess der Deletion von Klonen, die gegen eigenes MHC reaktiv sind, wurde für die Induktion von Toleranz gegen ein Transplantat in verschiedenen Modellen ausgenutzt.

Ein Ansatz um Toleranz gegen ein Transplantat zu erreichen, ist die Verabreichung des Antigens, gegen das Toleranz erzeugt werden soll, in den Thymus. In Kleintiermodellen konnte dieses Konzept erfolgreich angewendet werden. Die Gabe von Alloantigen in den Thymus bewirkte die Deletion von alloreaktiven T-Zellen [43]. Der Nachteil dieser Form der Toleranzinduktion ist die Tatsache, dass das verabreichte Antigen im Thymus nur für einen begrenzten Zeitraum verbleibt, und man somit mit dieser Methode keine langanhaltende Deletion alloreaktiver T-Zellen erreichen wird. In der Xenotransplantation konnte diese Form der Toleranzinduktion nicht erfolgreich eingesetzt werden [44], weil vermutlich die T-Zellantworten gegen Xenoantigen stärker ausfallen und somit schwieriger zu unterdrücken sind als in einem Allomodell [45].

Eine weitere Möglichkeit zur Toleranzinduktion ist die Generierung stabiler Chimären. In Kleintiermodellen war dieses Konzept bei Allo- und bei konkordanten Xenotransplantationen erfolgreich. So haben Sachs *et al.* zunächst Mäuse bestrahlt und anschließend diesen Mäusen eine Mischung aus T-Zell-depletierten Empfänger- und aus Donor-Knochenmark verabreicht, um die Mäuse zu rekonstituieren und konnten anschließend eine spezifische Toleranz gegen allo- und xenogene Donor-Hauttransplantate beobachten [46]. Mittels NOD- (*nonobese diabetic mouse*) /SCID- (*severe combined immunodeficiency*) transgenen Mäusen konnte auch

gezeigt werden, dass die Generierung stabiler Chimären eine humane T-Zelltoleranz gegen porzine Xenoantigene induzieren kann [47, 48]. Mit Primaten war es noch nicht möglich das Konzept erfolgreich umzusetzen, da in Primaten mit den bisher verfügbaren Mitteln keine komplette T-Zelldepletion möglich ist .

### 1.3.2 Rolle von regulatorischen T-Zellen

Nicht alle autoreaktiven T-Zellen werden im Thymus durch Selektionsprozesse eliminiert. Daher gibt es auch in der Peripherie Mechanismen, die autoreaktive T-Zellen, welche aus dem Thymus hinaus gelangen, in ihrer Aktivität zu unterdrücken. Eine Möglichkeit autoreaktive T-Zellen in der Peripherie zu supprimieren stellen Subpopulationen der T-Zellen mit regulatorischer Funktion dar. Die bekannteste Population dieser regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) ist durch CD4-Expression sowie starke CD25-Expression gekennzeichnet. Für diese  $CD4^+CD25^{high}$  Population konnte *in vitro* eine starke supprimierende Wirkung auf die T-Zellaktivierung nachgewiesen werden [49, 50]. Weitere Untersuchungen dieser Zellpopulation in Mäusen zeigten, dass der Transkriptionsfaktor Foxp3 eine wichtige Rolle für die Entwicklung und die Funktion der regulatorischen T-Zellen spielt [51]. Es wird unterschieden zwischen natürlich vorkommenden  $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+T_{reg}$  und Zellen mit gleichem Phänotyp, die durch Konversion aus  $CD4^+CD25^{low}$  T-Zellen entstehen. Die durch Konversion entstandenen sogenannten induzierten  $T_{regs}$  können sich in einem von TGF $\beta$  dominierten Zytokinmilieu entwickeln [52] bzw. können auch durch natürlich vorkommende  $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+T_{reg}$  induziert werden [53].

Wie genau die Suppression konventioneller  $CD4^+$  T-Zellen durch  $T_{regs}$  vermittelt wird, ist bisher nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise, dass immunmodulatorische Zytokine wie IL-10 bei der Suppression durch  $T_{reg}$  eine Rolle spielen [54]. Weiterhin gibt es aber auch Untersuchungen, die zeigen, dass für Suppression von konventionellen T-Zellen durch  $T_{reg}$  ein direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig ist [55, 56], wobei hier nicht geklärt ist welche Rezeptor-Ligand-Interaktionen für die Suppression verantwortlich sind.

Einige Untersuchungen in Allotransplantationsmodellen deuten auf eine Rolle der  $CD4^+CD25^{high}T_{reg}$  bei der Regulation von Immunantworten gegenüber Alloantigen hin. So führte die Depletion von  $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+T_{reg}$  durch anti-CD25-Antikörper in Mausmodellen zu einer chronischen Abstoßung von Transplantaten, wo sonst Toleranz

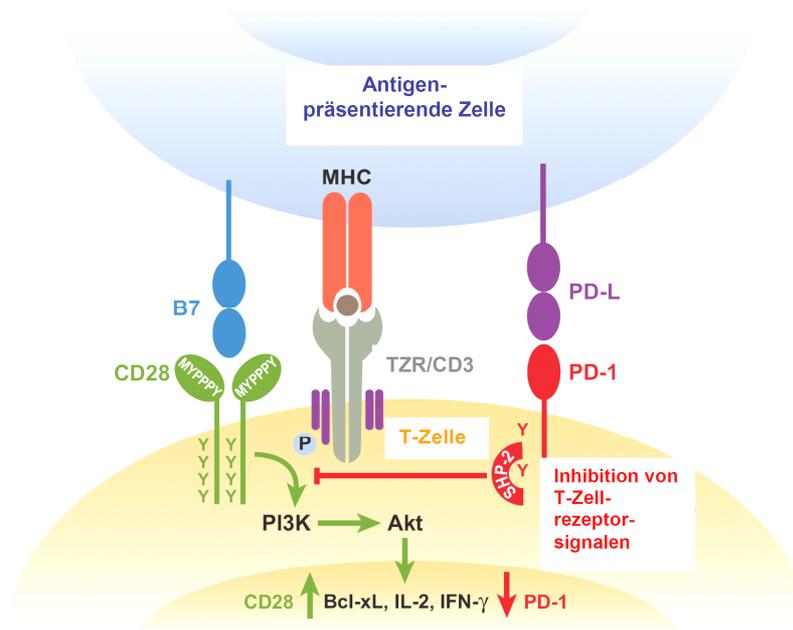
beobachtet wurde [57, 58]. Bei einigen Toleranz-induzierenden Protokollen wurde zudem beschrieben, dass die Generierung von  $CD4^+CD25^{\text{high}} T_{\text{reg}}$  wichtig für die Induktion oder die Aufrechterhaltung von Transplantat-Toleranz ist [59, 60]. Solch eine induzierte Toleranz ist unter den meisten Bedingungen durch einen Transfer der  $CD4^+CD25^{\text{high}} T_{\text{reg}}$ -Population sogar auf naive Empfänger übertragbar [59, 60]. Auch auf dem Gebiet der Xenotransplantation gibt es erste Untersuchungen zu regulatorischen T-Zellen. So konnte für regulatorische T-Zellen aus Primaten und aus dem Menschen *in vitro* gezeigt werden, dass diese auch nach Expansion ein hohes immunsupprimierendes Potential gegenüber der Aktivierung von  $CD4^+$  T-Zellen durch porcines Antigen besitzen [61, 62]. Dies macht die Toleranzinduktion durch den Transfer von *ex vivo* expandierten regulatorischen T-Zellen in den Empfänger nach Xenotransplantation denkbar.

### 1.3.3 Beeinflussung von Kostimulationswegen

Durch die Manipulation von kostimulatorischen Signalen ist es ebenfalls möglich T-Zellantworten zu regulieren. Wird einer T-Zelle das T-Zellrezeptorsignal (Signal 1) ohne positive kostimulatorische Signale (Signal 2) vermittelt, so geht diese T-Zelle in einen anergen Zustand über [63]. Die Blockade von kostimulatorischen Signalen durch Antikörper oder durch Fusionsproteine hat sich als ein erfolgreiches Konzept herausgestellt, um Toleranz gegenüber Allotransplantaten zu erzeugen. So konnte durch die gleichzeitige Blockade der Kostimulatoren CD80/86 und LIGHT ein Langzeitüberleben von Inselzellen nach Allotransplantation erreicht werden [64]. Auch durch die kombinierte Blockade des CD80/86 Signalweges und des CD40 Signalweges konnte in Kleintiermodellen Toleranz gegen Allotransplantate erzielt werden [65]. Die gleichzeitige Hemmung des CD80/86 und CD40-Signalweges war ebenfalls in Xenotransplantations-Kleintiermodellen vielversprechend. Hier wurden deutlich verlängerte Überlebenszeiten von Transplantaten ohne zusätzliche Immunsuppression erreicht [66]. Bei der Transplantation von porcinen Herzen in Primaten führte die Kombination der CD154-Blockade mit gleichzeitiger Gabe von Immunsuppressiva zu einem Transplantatüberleben von 2-6 Monaten [8]. Somit kann durch die Blockade der positiven kostimulatorischen Interaktionen zwar eine verminderte Abstoßungsreaktion gegen Xenotransplantate erreicht werden, aber alleine wird dieser Ansatz vermutlich nicht ausreichend sein, um eine langanhaltende T-Zell-Toleranz nach Xenotransplantation zu erzielen.

Zusätzlich zur Inhibition von positiven kostimulatorischen Signalen durch Blockade ergibt sich aus dem neuem Konzept der negativen Kostimulation eine weitere Möglichkeit T-Zellantworten zu modulieren. Da die Balance zwischen positiv-kostimulatorischen und negativ-kostimulatorischen Signalen zusammen mit einem Signal über den T-Zellrezeptor darüber entscheidet, ob eine T-Zellaktivierung oder eine Toleranz ausgelöst wird, stellt die Verstärkung von negativ-kostimulatorischen Signalen einen weiteren Ansatz zur Inhibition von T-Zellantworten dar. Die Moleküle PD-L1 und PD-L2 gehören zu der Gruppe der Negativ-Kostimulatoren. Im Folgenden wird ein Überblick über die Modulationsmöglichkeiten der T-Zellaktivierung mittels dieser beiden Moleküle gegeben.

Der Rezeptor PD-1 (*programmed death*) und seine Liganden PD-L1 und PD-L2 können negativ-kostimulatorische Signale in T-Zellen auslösen. PD-1 wird auf aktivierten CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen und myeloiden Zellen exprimiert [67-69]. Die Expression von PD-L1 ist hingegen verbreiteter. PD-L1 wird auf verschiedenen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert [11, 70, 71]. Die Expression des zweiten Liganden PD-L2 wurde hauptsächlich auf dendritischen Zellen und auf Makrophagen nachgewiesen [72]. Der Rezeptor PD-1 ist ein Monomer und enthält im zytoplasmatischen Teil eine ITSM- (*immunoreceptor tyrosine based switched motif*) Domäne, die negative Signale in T-Zellen weiterleiten kann [10]. Bindet PD-L1 oder PD-L2 an den Rezeptor PD-1 auf T-Zellen, so kommt es bei gleichzeitigem Signal durch den T-Zellrezeptor durch die ITSM-Domäne zur Rekrutierung von Phosphatasen (SHP-1 und SHP-2), die die T-Zellrezeptor-Signalkaskade abschwächen [73] und somit eine verminderte T-Zellaktivierung nach sich ziehen. Die inhibitorische Funktion von PD-1 geht verloren, wenn die ITSM-Domäne mutiert wird, was auf eine wichtige Rolle dieses Motivs bei der inhibitorischen Funktion von PD-1 hinweist [74]. In Abbildung 1 ist die Bindung von PD-L1 auf Antigen-präsentierenden Zellen an PD-1 auf T-Zellen und die daraus resultierende Wirkung auf die Signaltransduktion der T-Zellen dargestellt.



**Abbildung 1: PD-1-PD-L1-Interaktionen vermindern T-Zellrezeptorsignale.** (nach: Keir *et al.*, *Annual Reviews of Immunology*, 2008) Die Bindung von PD-1 durch PD-L1 führt zu einer verstärkten Assoziation des ITSM von PD-1 mit den Phosphatasen SHP2. Die Rekrutierung von SHP-2 zieht die Dephosphorylierung von Signalmolekülen des PI3K-Signalweges nach sich. Hierdurch wird die Induktion von IFN- $\gamma$  und IL-2 und von Proteinen, die für das Überleben von Zellen notwendig sind (z.B. Bcl-xL), vermindert. Kommt es gleichzeitig zur T-Zellrezeptor- und PD-1-Bindung zu einem Signal durch den CD28-Rezeptor, so können diese Signale der PD-1-vermittelten Inhibition entgegenwirken.

Ursprünglich wurde der Rezeptor PD-1 in Zellen entdeckt, die apoptotisch waren [75]. Einige Untersuchungen weisen auch darauf hin, dass die Interaktion von PD-1 mit PD-L1 Zelltod in T-Zellen auslösen kann [76]. Die Bindung von PD-L1 an den PD-1-Rezeptor scheint also unterschiedliche Wirkungen auf T-Zellen auszuüben, die entweder zu einer Inhibition oder sogar zum Zelltod der T-Zellen führen können. Weiterhin wurde beschrieben, dass PD-L1 auch an CD80 binden kann [77]. Bei der Bindung von PD-L1 auf APC's an CD80 auf T-Zellen wird eine Inhibition in T-Zellen ausgelöst. Weiterhin kann aber auch die Bindung von CD80 auf APC's an PD-L1 auf T-Zellen inhibitorische Signale in T-Zellen bewirken. Unter bestimmten Bedingungen scheint PD-L1 auch als positiv-kostimulatorisches Molekül zu wirken. So wurde bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit anti-CD3-Antikörper stimuliert wurden, eine erhöhte Proliferation der T-Zellen durch die Zugabe von PD-L1-Ig Fusionsproteinen beobachtet [78, 79]. Die Gründe für diese widersprüchlichen Ergebnisse sind noch nicht klar. Eine Möglichkeit ist, dass es einen weiteren noch unbekanntem Rezeptor zusätzlich zu PD-1

gibt, der PD-L1 und PD-L2 binden kann und positive Signale in T-Zellen auslöst. Weiterhin ist es möglich, dass PD-1 abhängig vom Aktivierungsstatus der T-Zellen unterschiedliche Signale in T-Zellen auslösen kann. Die Wirkmechanismen von PD-L1 und PD-L2 sind also noch nicht vollständig geklärt.

Die negativ-kostimulatorischen Signale durch PD-L1 oder PD-L2 spielen eine wichtige Rolle für die Immunregulation von T-Zellaktivierung und für das Aufrechterhalten von peripherer Toleranz [80]. Bei PD-1-*knock-out*-Mäusen wurden Autoimmunkrankheiten beobachtet [81, 82]. Auch T-Zellantworten gegen Infektionen scheinen in PD-1-*knock-out*-Mäusen verstärkt abzulaufen [83]. Untersuchungen in Allotransplantationsmodellen deuten darauf hin, dass PD-L1/2 Signale auch für die Akzeptanz eines Transplantates von Bedeutung sind und somit interessante Zielstrukturen für die Immunmodulation nach Transplantation darstellen. So konnte gezeigt werden, dass eine Blockade dieses Signalweges zu einer beschleunigten T-Zell-vermittelten Abstoßung von Herztransplantaten in Mäusen führt [84]. Eine Verstärkung des PD-1 Signalweges durch den Gen-Transfer von PD-L1 in Mäusen führte hingegen zu einem verlängertem Transplantatüberleben von Herzen [85]. Auch bei Verstärken des PD-1 Signalweges durch die Injektion von PD-L1-Ig wurde ein verbessertes Allotransplantatüberleben in Mäusen beobachtet [86]. Zudem konnten Wang *et al.* kürzlich zeigen, dass auch die Überexpression von PD-L1 auf Inselzellen das Überleben dieser Inselzellen nach Allotransplantation in Mäusen verlängerte [87]. In Xenotransplantationsmodellen wurden noch keine Untersuchungen zu den PD-1:PD-L-Signalwegen durchgeführt, aber die oben beschriebenen Untersuchungen in Allotransplantationsmodellen deuten darauf hin, dass die Verstärkung des PD-1-Signalweges für die Aufrechterhaltung einer Transplantattoleranz auch in der Xenotransplantation von Vorteil sein könnte. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht inwiefern humane anti-porzine zelluläre Immunantworten durch die transgene Expression der humanen Moleküle PD-L1 und PD-L2 auf porzinen Zellen moduliert werden können.

## 2. Diskussion

In Primaten kommt es nach Transplantation von porzinen Organen zu einer hyperakuten Abstoßung, die durch präformierte Antikörper, die gegen Zuckerstrukturen (Gal-Epitope) auf den porzinen Organen gerichtet sind, vermittelt wird. Die Bindung dieser Antikörper führt zu einer Komplementaktivierung, die wiederum die Zerstörung des Transplantates nach sich zieht. Die Generierung von Spendertieren, die keine Gal-Epitope exprimieren sowie die Erzeugung von Tieren, die humane Komplementregulatoren transgen exprimieren, bieten vielversprechende Ansätze um die hyperakute Abstoßung nach Xenotransplantation zu überwinden. Für eine erfolgreiche klinische Xenotransplantation werden nun Strategien zur effektiven Verminderung von zellulären Immunantworten zunehmend wichtiger. Derartige Konzepte müssten einerseits die Aktivität von NK-Zellen, Monozyten und andererseits auch die T-Zellaktivierung vermindern.

Eine vollständige T-Zellaktivierung erfordert ein Signal über den T-Zellrezeptor sowie zusätzlich ein positiv-kostimulatorisches Signal, welches zum Beispiel durch die Bindung von CD80/86 an CD28 vermittelt wird. Zusätzlich zu den positiv-kostimulatorischen Signalen spielen sogenannte negativ-kostimulatorische Signale bei der Regulation einer T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle. Negativ-kostimulatorische Signale können zum Beispiel durch die Moleküle PD-L1 und PD-L2 und deren Interaktion mit PD-1 vermittelt werden. Die Balance zwischen den stimulierenden und den inhibierenden Signalen entscheidet darüber, ob es zu einer T-Zellaktivierung oder zu einer Toleranzinduktion kommt. In einigen *in vivo* Maus-Modellen konnte gezeigt werden, dass die PD-L1:PD-1 Interaktion auch für die Aufrechterhaltung von Transplantattoleranz eine wichtige Rolle spielt. So führte die Blockade des PD-1 Signalweges durch Antikörper zu einer beschleunigten Allotransplantatabstoßung [88]. Eine Verstärkung des PD-1 Signalweges durch agonistische Fusionsproteine hingegen bewirkte ein verlängertes Transplantatüberleben nach Allotransplantation [85].

Bei der Xenotransplantation von porzinen Organen in den Menschen hat man durch die Erstellung transgener Tiere die Möglichkeit porcine Spenderorgane gentechnisch zu verändern. Somit ist es vorstellbar, porcine Gewebe- und Zelltransplantate zu generieren, die durch transgene Expression entsprechender Moleküle ein starkes negativ-kostimulatorisches Potential aufweisen. Ziel dieser Arbeit war zu prüfen, ob die Verstärkung negativer Signale durch die Überexpression von humanem PD-L1/2 auf porcinen Zellen ein wirksames Konzept darstellt, um humane zelluläre Immunantworten gegen porcine Transplantate zu unterdrücken.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die Überexpression von humanem PD-L1/2 auf porzinen APC in der Induktionsphase einer CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung zur Abschwächung der T-Zellaktivierung und sogar zur Induktion von T<sub>regs</sub> führte. Des Weiteren führte die Überexpression von humanem PD-L1 auf porzinen Zellen auch zu einer Inhibition der zytotoxischen Aktivität von humanen CD8<sup>+</sup> Effektorzellen und NK-Zellen. Erste Daten in einem Ratten-Transplantationsmodell zeigen, dass die Transplantation von L23-PD-L1-Zellen im Vergleich zu L23-GFP-Zellen verminderte T-Zell- und NK-Zellinfiltrate am Transplantationsort hervorruft. Zudem wurden verminderte Antikörperantworten in Ratten, die mit PD-L1-Transfektanten transplantiert wurden, beobachtet. Somit scheint PD-L1 auch *in vivo* zur Abschwächung einer xenogenen Immunantwort zu führen. In der folgenden Diskussion wird zunächst auf die Wirkung von PD-L1/2 in der Induktionsphase einer T-Zellantwort gegen Transplantate eingegangen. Anschließend wird die Wirkung von PD-L1 auf die Aktivität humaner Effektorzellen diskutiert. Anhand der ersten *in vivo*-Befunde im Ratten-Modell folgt dann eine Diskussion über die Effekte von PD-L1 *in vivo* und abschließend wird ein Ausblick auf mögliche therapeutische Effekte der PD-L1/2-Expression auf porzinen Organen in der Xenotransplantation gegeben.

### **2.1 Wirkungen von PD-L1/2 auf die Induktionsphase einer T-Zellaktivierung**

Für die Untersuchung der Frage, ob eine Überexpression von humanem PD-L1 oder PD-L2 auf porzinen APC eine Auswirkung auf die humane anti-porzine CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung hat, wurde als Modellzelle die B-Zelllinie L23 gewählt. Diese exprimiert MHC- Klasse I, MHC-Klasse II sowie die positiv-kostimulatorischen Moleküle CD80/86 und CD40 (Anhang A, Abb. 1) und löste in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine starke Proliferation aus (Anhang A, Abb. 2). L23-Zellen hingegen, die humanes PD-L1 oder PD-L2 überexprimierten (L23-PD-L1/2), induzierten eine deutlich geringere Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Anhang A, Abb. 2). Zytokinmessungen in Kulturüberständen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und L23-Transfektanten ergaben, dass auch die Zytokinkonzentrationen von IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4 und IL-5 in Ansätzen, in denen PD-L1 oder PD-L2 Transfektanten eingesetzt wurden, bereits nach 48 h, im Vergleich zu Ansätzen mit L23-Kontroll-Zellen, deutlich vermindert waren (Anhang A, Abb. 4).

Stellt man die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen der verminderten T-Zellreaktivität, so muss zunächst darauf hingewiesen werden, dass der Rezeptor PD-1 nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird [89]. Somit ist davon auszugehen, dass bei der Stimulation humaner T-Zellen mit L23-Zellen der PD-1 Rezeptor auf den xenoreaktiven T-Zellen hochreguliert wird. Werden L23-Kontroll-Zellen zur Stimulation eingesetzt, bleibt dies ohne Wirkung. Werden allerdings L23-PD-L1/2 Transfektanten eingesetzt, so kommt es zur Bindung von PD-L1/2 an PD-1. PD-1 enthält eine zytoplasmatische Domäne mit ITSM Motiv. Es ist beschrieben, dass die Bindung von PD-L1/2 an PD-1 zu einer Rekrutierung der Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 an das ITSM Motiv führt. SHP-1 und SHP-2 bewirken hierbei eine Dephosphorylierung von weiteren Signalmolekülen, was eine verminderte T-Zellrezeptor-Signalkaskade zur Folge hat [73]. Dies könnte die geringere Aktivierung humaner CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Stimulation mit PD-L1/2-Transfektanten erklären.

Geht man davon aus, dass die reduzierte Zytokinsynthese und die schwache Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit L23-PD-L1/2-Transfektanten auf eine Abschwächung der T-Zellrezeptor-Signalkaskade durch PD-1 zurückzuführen ist, so stellt sich die Frage, warum die Synthese des immunsupprimierenden IL-10 in den mit L23-PD-L1/2-Transfektanten stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen unvermindert bzw. leicht erhöht war (Anhang A, Abb. 4). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die IL-10-Synthese bestimmte T-Zellrezeptor-Signale benötigt, die unabhängig von der Modulation durch PD-L1-Signale sind. Eine andere Möglichkeit ist, dass bestimmte Zellpopulationen, die eine starke IL-10-Synthese aufweisen, nicht empfänglich für PD-L1-Signale sind. Da es einige Hinweise gibt, dass PD-1 auch positiv-kostimulatorische Signale vermitteln kann [78, 79, 90], ist es sogar denkbar, dass bestimmte Zellpopulationen ein PD-L1/2-Signal als positiv-kostimulatorisches Signal interpretieren und darauf hin vermehrt IL-10 sezernieren. Andere publizierte Daten deuten ebenfalls auf eine besondere Rolle des PD-L-Weges bei der Kontrolle der IL-10-Synthese hin [79, 91, 92]. Auch wenn nicht endgültig geklärt werden konnte, wie es zu der relativ hohen IL-10-Konzentration in den Kulturüberständen kommt, so ist es doch wahrscheinlich, dass das die IL-10-Dominanz in den Kulturen mit verantwortlich für die verminderte T-Zellantwort ist.

In Langzeitkulturen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit L23-PD-L1/2-Transfektanten tauchten vermehrt CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Zellen auf, die in Kulturen mit L23-Kontroll-Zellen nicht vorhanden waren (Anhang A, Abb. 5A). Eine Untersuchung dieser Zellpopulation ergab, dass die Zellen FoxP3 exprimierten (Anhang A, Abb. 5B) und eine stark supprimierende Wirkung gegenüber einer

CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung aufwiesen (Anhang A, Abb. 6). Somit scheinen sich CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> in den L23-PD-L1/2-Kokulturen anzureichern. Diese Anreicherung kann entweder durch vermehrten Zelltod unter den konventionellen T-Zellen, oder durch eine aktive Expansion der T<sub>regs</sub> zustande kommen. Möglicherweise spielt hierfür das IL-10-dominierte Zytokinmilieu eine Rolle, da für IL-10 bekannt ist, dass es die Generierung von T<sub>reg</sub> induzieren kann [93]. Da auf den T<sub>regs</sub> in den Kokulturen eine starke Expression von PD-1 nachgewiesen wurde (Anhang A, Abb. 5A), ist es auch denkbar, dass die PD-L1-exprimierenden Transfektanten mit den T<sub>regs</sub> in Wechselwirkung stehen und durch PD-L1:PD-1-Interaktionen für deren Aufrechterhaltung oder Expansion sorgen. Unterstützt wird diese Hypothese durch Daten aus einem Maus-Modell, die zeigen, dass PD-L1-Signale für die Entstehung adaptiver T<sub>regs</sub> erforderlich sind [94].

Die Beobachtung der Expansion von T<sub>regs</sub> innerhalb von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit L23-PD-L1/2 stimuliert wurden, führte zu der Frage nach dem Ursprung der expandierten T<sub>regs</sub>. Die Zellen könnten sich aus natürlich vorkommenden T<sub>regs</sub> entwickeln oder sie könnten durch Konversion aus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup> T-Zellen (sogenannte adaptive T<sub>regs</sub>) entstehen. Um dies zu untersuchen, wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Zellen mittels Durchflusszytometrie aus einer CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation depletiert. Die so entstandene CD4<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup> Population wurde mit L23-PD-L2-Transfektanten kokultiviert. In diesen Ansätzen war nach Langzeitkultur keine Entstehung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-Zellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass sich die T<sub>regs</sub> in den hier durchgeführten Experimenten aus den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> natürlich vorkommenden T<sub>regs</sub> entwickeln.

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass die T-Zellantwort gegenüber porzinen APC, die humanes PD-L1/2 überexprimieren, durch eine verminderte Proliferation und eine relativ hohe IL-10-Konzentration in der Frühphase der T-Zellantwort sowie durch die Expansion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> im späteren Verlauf der T-Zellantwort gekennzeichnet ist. Nach einer Xenotransplantation könnte daher die Verstärkung des PD-1/PD-L1-Signalweges zum einen für die Regulation von anti-porzinen T-Zellantworten direkt nach Transplantation bedeutsam sein und zum anderen könnte die Verstärkung des PD-1-Signalweges auch für die Aufrechterhaltung von Langzeittoleranz durch die Induktion von T<sub>regs</sub> eine Rolle spielen.

## 2.2 Wirkung von PD-L1 in der Effektorphase

Die typische Immunsuppression durch Cyclosporin A kann durch die Herunterregulation von IL-2 die Induktion einer T-Zellantwort unterdrücken, allerdings wirkt Cyclosporin A nicht in der Effektorphase und ist daher nicht in der Lage, die zytotoxische Aktivität von T-Effektorzellen zu unterdrücken. Hieraus ergibt sich die Frage ob eine Verstärkung von negativ-kostimulatorischen Signalen das T-Zell-Rezeptor-vermittelte Freisetzen von Effektormolekülen verhindern kann.

Um dieses Konzept zu prüfen, wurde zunächst untersucht, ob starke PD-L1-Signale eine Auswirkung auf die humane CD8<sup>+</sup> T-Zellaktivierung haben. Die Stimulation von humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit L23-Kontroll-Zellen führte zu einer starken Proliferation (Anhang B, Abb. 2). L23-PD-L1 Transfektanten induzierten hingegen eine deutlich verminderte Proliferation (Anhang B, Abb. 2). Auch die zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen war gegenüber L23-PD-L1-Transfektanten herabgesetzt (Anhang B, Abb. 3A). Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Publikationen überein, die zeigen, dass die Hochregulation der PD-L1-Expression auf Endothelzellen eine inhibierende Wirkung auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellaktivierung hat [95, 96]. Anhand der beobachteten Wirkungen stellt sich die Frage nach den Mechanismen, die der verminderten CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort gegenüber PD-L1-exprimierenden Zellen zugrunde liegen. Da auf aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine PD-1 Expression nachweisbar war (Anhang B, Abb. 4A), ist davon auszugehen, dass eine Interaktion zwischen dem ektopisch exprimierten PD-L1 auf den porzinen Zellen und PD-1 auf den humanen Zellen eine Rolle spielt. Hierbei kommt es vermutlich, wie auch für die CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben, zur Rekrutierung von SHP-Phosphatasen, die eine Abschwächung der T-Zellrezeptor-Signaltransduktion bewirken. Kommt es nach Bindung von PD-1 durch PD-L1 zu einer Abschwächung des T-Zellrezeptor-Signals, so geht dies vermutlich wie bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer verminderten Zytokinsynthese der T-Zellen einher, was die verminderte Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit L23-PD-L1-Transfektanten erklären könnte. Da das T-Zellrezeptor-Signal auch einen Einfluss auf die Freisetzung von zytotoxischen Effektormolekülen hat, ist es auch wahrscheinlich, dass die schwächere zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber PD-L1-Transfektanten auf die Hemmung der T-Zellrezeptor-Signaltransduktion durch die PD-1:PD-L1-Interaktion zurückzuführen ist.

Ursprünglich wurde der PD-1-Rezeptor als ein Rezeptor beschrieben, der auf apoptotischen Zellen exprimiert wird [75]. Es gibt auch einige Hinweise, dass der PD-1-Rezeptor auf T-Zellen nach Bindung von PD-L1 Apoptose in den T-Zellen auslösen kann [97]. Um zu untersuchen, ob die Apoptose von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Experimenten dieser Arbeit eine Rolle spielt, wurden voraktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit L23-PD-L1 Zellen bzw. mit Kontroll-L23-Zellen kultiviert und der Anteil apoptotischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Es wurden vermehrt apoptotische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Kulturen mit L23-PD-L1 Zellen detektiert (Anhang B, Abb. 6). Die L23-PD-L1-Zellen scheinen also in einem Teil von CD8<sup>+</sup> T-Zellen Apoptose auszulösen. Die gleichen Experimente mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten hingegen, dass L23-PD-L1-Zellen in CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine erhöhte Apoptose auslösten (Anhang A, Abb. 3B). Dies weist darauf hin, dass das PD-L1-Signal unterschiedlich auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wirkt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine größere Abhängigkeit gegenüber IL-2 aufweisen als CD4<sup>+</sup> T-Zellen [98]. Dies könnte bedeuten, dass ein PD-L1-Signal, das eine verminderte IL-2 Synthese nach sich zieht, eine erhöhte Apoptoseempfindlichkeit in CD8<sup>+</sup> T-Zellen bewirkt. Die Auslösung von Apoptose in CD8<sup>+</sup> T-Zellen und damit die Verringerung reaktionsfähiger Zellen stellt also einen weiteren Wirkmechanismus von PD-L1 dar, der die verminderte Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit L23-PD-L1 erklären könnte. Auch bei der verminderten Lyse von L23-PD-L1-Zellen durch humane zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte die Auslösung von Apoptose eine Rolle spielen. Hierbei ist es denkbar, dass die Effektorzelle nach einem Kontakt mit der PD-L1-exprimierenden Zielzelle ein apoptotisches Signal vermittelt bekommt. Dies bedeutet, dass diese Effektorzelle keine weiteren Zielzellen mehr umbringen kann, was die verminderte Lyse der PD-L1-Transfektanten erklären könnte.

Der Befund, dass auch humane NK-Zellen eine verminderte zytotoxische Aktivität gegenüber L23-PD-L1-Zellen aufweisen (Anhang B, Abb. 3B), deutet darauf hin, dass PD-L1-Signale auch in NK-Zellen eine inhibierende Wirkung vermitteln. Bisher ist nicht viel über die Bedeutung des PD-1:PD-L1-Weges für NK-Zellen bekannt. Eine kürzlich erschienene Publikation beschreibt, dass PD-1 auf humanen NK-Zellen bei Patienten mit chronischer Hepatitis vermehrt exprimiert wird [99], was auf eine funktionelle Rolle des PD-1-Rezeptors auf NK-Zellen hinweist. Die Mechanismen, über die PD-L1:PD-1-Interaktionen in NK-Zellen eine verminderte zytotoxische Aktivität bewirken, sind unklar. Es ist denkbar, dass PD-1, wie für T-Zellen beschrieben, durch die Rekrutierung von SH-Phosphatasen an seine ITSM-

Domäne die NK-Zellaktivierung hemmt, da andere inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen ähnlich wirken [100].

Die Beobachtung, dass die zytotoxische Aktivität von T-Zellen von NK-Zellen durch die Überexpression des humanen PD-L1-Moleküls auf porzinen Zellen vermindert werden kann zusammen mit dem Befund, dass die Induktion der Proliferation von humanen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die PD-L1-Expression auf porzinen APC's gehemmt werden kann, deuten darauf hin, dass die Verstärkung negativ-kostimulatorischer Signale auf porzinen Zellen sowohl die Induktions- wie auch die Effektorphase humaner anti-porziner Immunantworten abschwächen kann.

### **2.3 Schützt die PD-L1-Expression porzine Transplantate vor einer Abstoßung *in vivo*?**

Die *in vitro* Befunde dieser Arbeit zeigen, dass PD-L1 eine dämpfende Wirkung auf die T-Zellreaktivität in der Induktions- und Effektorphase hat. Zur Bewertung dieses Ansatzes für die Xenotransplantation ist eine wesentliche Frage, ob PD-L1 auch porzine Transplantate *in vivo* vor einer Abstoßung schützen kann. Um dies zu prüfen, wurde ein Tiermodell etabliert, bei dem die L23-GFP- oder L23-PD-L1-Zellen unter die Nierenkapsel von Ratten transplantiert wurden. Zunächst wurde die Frage untersucht, ob die L23-PD-L1-Transfektanten eine verlängerte Überlebenszeit haben als die L23-GFP-Zellen. Während an Tag 3 noch L23-Zellen immunhistologisch unter der Nierenkapsel nachgewiesen werden konnten, fanden sich an Tag 7 weder L23-GFP- noch L23-PD-L1-Zellen unter den Nierenkapseln (Daten nicht gezeigt). Dies könnte einerseits bedeuten, dass die L23-Zellen als lymphatische Zellen durch Migration den Transplantationsort verlassen haben, oder dass sie abgestoßen worden sind. Obwohl die Migration der Zellen nicht völlig ausgeschlossen werden kann, scheint eine Abstoßung wahrscheinlicher, da die transplantierten Nieren an Tag 7 deutliche zelluläre Infiltrate von Ratten-T-Zellen aufwiesen (Anhang C, Abb.4 ) und eine Antikörperantwort gegen L23-Zellen in transplantierten Ratten nachgewiesen werden konnte (Anhang C, Abb.2 ).

Ratten, die mit L23-Kontroll-Zellen transplantiert worden waren, zeigten tendenziell höhere anti-L23-Antikörpertiter als Ratten, die L23-PD-L1-Zellen erhalten hatten (Anhang C, Abb. 2). Auch bei einem Vergleich der immunhistologischen Färbungen von Infiltraten in

transplantierten Nieren an Tag 7 wurden Unterschiede zwischen Nieren mit L23-Kontroll- bzw. L23-PD-L1-Zellen ausgemacht. Die Transplantation von L23-Kontroll-Zellen unter die Nierenkapsel bewirkte eine deutliche Infiltration von NK-Zellen und von T-Zellen in die transplantierten Nieren (Anhang C, Abb. 4). In Nieren, die mit L23-PD-L1-Zellen transplantiert wurden, waren hingegen nur schwache NK- und T-Zellinfiltrate zu beobachten (Anhang C, Abb. 4). Zusammengefasst deuten also die bisher erhobenen *in vivo* Daten auf eine inhibierende Wirkung des humanen PD-L1-Moleküls auf Ratten-Immunzellen hin, auch wenn diese Inhibition offensichtlich nicht ausreicht, um die Abstoßung der L23-PD-L1-Zellen zu verhindern. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Rattenlymphozyten mit L23-PD-L1 verglichen zu L23-Kontroll-Zellen eine verminderte Proliferation der Rattenlymphozyten auslöst (Anhang C, Abb. 1). Daher ist anzunehmen, dass funktionelle Interaktionen zwischen dem PD-1 Rezeptor auf Rattenzellen und dem humanem PD-L1 auf den porzinen Transfektanten möglich sind und dass diese inhibitorische Signale in Rattenlymphozyten vermitteln.

In der Xenotransplantation wird von einer wichtigen Rolle der indirekten Antigen-Präsentation bei der T-Zellaktivierung ausgegangen, da nach Xenotransplantation deutlich mehr fremde Peptide vorhanden sind als nach Allotransplantation. Die *in vitro*-Analysen zu PD-L1/2 geben keine Hinweise, ob der PD-L-Ansatz auch Immunantworten beeinflusst, die auf der indirekten Route ausgelöst worden sind. Im *in vivo* Modell ergaben sich jedoch Hinweise auf eine Rolle von PD-L1 bei der indirekten Route der Antigenpräsentation. Die Beobachtung, dass L23-Zellen eine porzine-spezifische Antikörperantwort auslösten, zeigt dass Ratten-B-Zellen L23-Antigen prozessiert und auf ihrem MHC präsentiert haben. Die an der Antikörperproduktion beteiligten CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen sind somit auf der indirekten Route aktiviert. Geht man davon aus, dass die tendenziell schwächere Antikörperproduktion in Ratten, die L23-PD-L1-Zellen erhalten haben, durch PD-L1 vermittelt wird, so ergibt sich hieraus die Frage über welche Wege das PD-L1-Molekül auf porzinen APCs die auf indirektem Weg aktivierten CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen und damit die B-Zellaktivierung beeinflussen kann.

Bei der Transplantation von L23-Zellen unter die Nierenkapsel ist davon auszugehen, dass einige L23-PD-L1-Transfektanten in die Lymphknoten einwandern und dort CD4<sup>+</sup> T-Zellen über die direkte Route der Antigenpräsentation aktivieren. Auf diesem Wege aktivierte Empfänger-T-Zellen sollten laut den *in vitro* Daten einen anergen Phänotyp, der mit einem

immunoregulatorischen Zytokinmilieu und der Expansion von regulatorischen T-Zellen einhergeht, aufweisen. Es ist denkbar, dass dieses Zytokinmilieu und die regulatorischen T-Zellen auch zu einer Inhibition von CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen, die auf der indirekten Route durch Ratten-APCs aktiviert wurden, führen. Da nur aktivierte CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen B-Zellen durch Ausschüttung von Zytokinen wie IL-4 und durch die Interaktion von CD40L:CD40 vollständig aktivieren können, würde die Hemmung der CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen eine verminderte B-Zellaktivierung und Antikörpersynthese erklären.

Die verminderten T-Zellinfiltrate in Nieren, die mit L23-PD-L1-Zellen transplantiert wurden, deuten auf eine geringere Ausbildung von T-Effektor-Zellen, die ins Transplantat einwandern, hin. Dies lässt sich, wie oben beschrieben, durch die Migration von L23-PD-L1-Zellen in die Lymphknoten und der damit verbundenen Unterdrückung der direkten Route der T-Zellaktivierung bzw. den hemmenden Wirkungen auf die indirekte T-Zellaktivierung durch Zytokine oder regulatorische T-Zellen erklären. CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen sind in der Lage, inflammatorische Zytokine zu produzieren und dadurch weitere Immunzellen zum Entzündungsort zu rekrutieren. Die Beobachtung, dass in Nieren, die mit L23-PD-L1-Zellen transplantiert wurden, nur geringe NK-Zellinfiltrate zu sehen waren, könnte also durch die geringere Zytokinausschüttung der T-Zellen vor Ort und der damit verbundenen verminderten Rekrutierung von NK-Zellen erklärt werden. Es ist ebenso denkbar, dass die verminderte NK-Zellinfiltration auf eine direkte Interaktion der NK-Zellen mit den L23-PD-L1 Zellen in den Nieren zurückzuführen ist. Die in dieser Arbeit erhaltenen *in vitro* Daten zeigen, dass die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen durch PD-L1-Transfektanten inhibiert wurde. Es bleibt zu untersuchen, ob auch die Zytokinsynthese der NK-Zellen durch PD-L1-Signale reduziert wird. Geht man hiervon aus, so könnte auch die verminderte Ausschüttung inflammatorischer Zytokine durch NK-Zellen die geringere Anzahl von eingewanderten NK-Zellen in den mit PD-L1-Transfektanten transplantierten Nieren erklären.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Expression von PD-L1 auf L23-Zellen die *in vivo*-Abstoßung dieser Zellen in Ratten nicht verhindern konnte. Allerdings wurde beobachtet, dass das PD-L1-Molekül zu leicht verminderten Immunantworten führte. Die Beobachtung, dass PD-L1 einen Einfluss auf die Antikörperproduktion zu haben scheint, deutet darauf hin, dass durch die PD-L1-Expression auf porzinen APCs auch Reaktionen, die auf der indirekten Route ausgelöst werden, reduziert werden können. Die L23-Zelllinie besitzt aufgrund der hohen Expression positiv-kostimulatorischer Moleküle ein starkes stimulatorisches Potential. Es bleibt zu untersuchen ob die Expression von humanem PD-L1

auf einem Zelltransplantat mit geringerem immunogenen Potential, z. B. porzinen Inselzellen, eine Protektion vor Abstoßung vermitteln kann.

## **2.4 Ausblick: PD-L1 transgene Schweine als Organspender für die klinische Xenotransplantation**

Die erhobenen *in vitro* Daten deuten darauf hin, dass die Überexpression von humanem PD-L1/2 auf porzinen Zellen eine effiziente Modulation der humanen anti-porzinen zellulären Immunantwort bewirkt. Die *in vivo*-Befunde zeigen, dass PD-L1 zwar keinen Schutz vor Abstoßung vermittelt, aber dämpfend auf das Empfängerimmunsystem einwirkt. Somit scheint das Molekül PD-L1 für die Xenotransplantation ein interessantes Zielmolekül darzustellen. Im folgenden Abschnitt wird zunächst auf die Erstellung PD-L1/2 transgener Schweine eingegangen und anschließend wird anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten diskutiert, was die Expression von humanem PD-L1/2 auf porzinen Organen in der Xenotransplantation bewirken könnte.

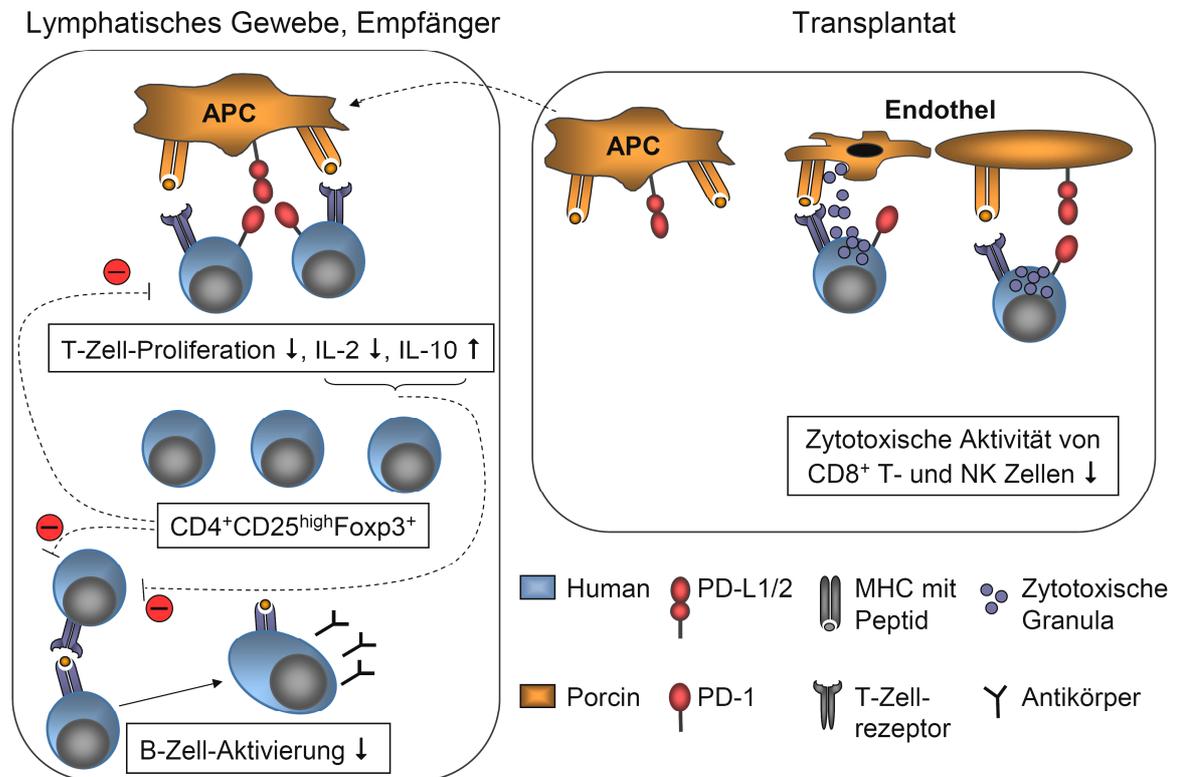
In Maus-Modellen konnte durch das Verstärken des PD-1-Signalweges durch Gabe von PD-L1-Ig verlängertes Transplantatüberleben nach Allotransplantation erreicht werden [86, 101]. Allerdings war es nicht möglich, mittels PD-L2-Ig ein verlängertes Überleben von Transplantaten zu erreichen [86, 88]. Dies deutet auf eine unterschiedliche Rolle der murinen PD-L1 und PD-L2 Moleküle bei der Toleranzinduktion nach Transplantation hin. Die in dieser Arbeit beschriebenen *in vitro* Daten zur humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung (Anhang A) haben hingegen keine unterschiedlichen Wirkungen der humanen PD-L1- oder PD-L2-Moleküle auf die humane T-Zellaktivierung aufgezeigt. Für die Erstellung transgener Schweine mit dem Ziel humane Immunantworten nach Xenotransplantation zu unterdrücken, ist somit davon auszugehen, dass die humanen Moleküle PD-L1 und PD-L2 gleich gut geeignet sind.

Es wurde gezeigt, dass auch porzines PD-L1 an humanes PD-1 binden und inhibitorische Signale in humanen T-Zellen auslösen kann [102]. In den Experimenten dieser Arbeit sollte das keine Rolle spielen, da mittels semiquantitativer PCR gezeigt werden konnte, dass L23-Zellen weder porzines PD-L1 noch PD-L2 in signifikanten Mengen exprimieren (Daten nicht gezeigt). In Hinblick auf die Generierung transgener Schweine ergibt sich aus der Tatsache, dass porzines PD-L1 funktionell mit humanem PD-1 interagiert [102], die Möglichkeit der

Manipulation der endogenen PD-L1-Expression in Schweinen, um humane T-Zellantworten gegen porzine Transplantate zu unterdrücken. Bei diesem Ansatz ist allerdings zu befürchten, dass die erhöhte endogene Expression von porzinem PD-L1 zu einer starken Immunsuppression der Tiere und womöglich sogar zu einer eingeschränkten Lebensfähigkeit durch die inhibitorischen Signale führt. Um zu untersuchen, ob die Überexpression von humanem PD-L1 in Schweinen zu ähnlichen Problemen führen kann, wurden porzine T-Zellantworten auf L23-PD-L1-Transfektanten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die L23-PD-L1-Transfektanten keine verminderte Proliferation der porzinen Zellen bewirkte (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass das humane PD-L1 auf den L23-Zellen nicht funktionell mit dem porzinem PD-1 interagiert. Es scheint also unwahrscheinlich, dass die transgene Expression von humanem PD-L1 in Schweinen zu schwerwiegender Immunsuppression in den Tieren führt.

Bei der transgenen Expression des humanen PD-L1/2-Moleküls in Schweinen sollte die Expression der regulatorischen Moleküle insbesondere auf porzinen APCs, da diese eine T-Zellaktivierung hervorrufen können sowie auf porzinen Endothelzellen, da diese bei vaskularisierten Organen besonders den Angriffen des Empfänger-Immunsystems ausgesetzt sind, verfolgt werden. In Abbildung 2 sind die möglichen Wirkungen der Transgene PD-L1/2 bei Expression auf APCs und Endothelzellen nach einer Xenotransplantation von porzinen Organen in den Menschen zusammengefasst. Es ist zu erwarten, dass die mit dem Transplantat in den Empfänger eingebrachten APCs in die lymphatischen Gewebe des Empfängers einwandern. Hier treffen die porzinen APCs auf humane T-Zellen, welche durch Interaktionen zwischen dem porzinen MHC mit Peptid und dem humanen T-Zellrezeptor sowie Interaktionen zwischen kostimulatorischen Molekülen und Liganden aktiviert werden. Exprimiert die porzine APC humanes PD-L1/2, so sollte dies eine verminderte T-Zellproliferation und IL-2 Synthese, sowie eine erhöhte IL-10-Synthese der T-Zellen und die Expansion von regulatorischen  $CD4^+CD25^{\text{high}}$  T-Zellen bewirken. Das hierbei entstehende Zytokinmilieu zusammen mit den regulatorischen T-Zellen könnte wiederum eine inhibierende Wirkung auf humane  $CD4^+$  T-Zellen, die durch die indirekte Route der Antigenpräsentation zu  $CD4^+$  Helfer-T-Zellen aktiviert wurden, ausüben. Die Hemmung der  $CD4^+$  Helfer-T-Zellen würde dann eine verminderte Kapazität dieser Zellen zur B-Zellaktivierung nach sich ziehen. Darüber hinaus sollte die Expression von humanem PD-L1/2 auf porzinem Endothel zu einem Schutz des Endothels vor der Lyse durch humane  $CD8^+$  und NK-Zellen führen, indem die zytotoxische Aktivität dieser Zellen z. B. durch eine

verminderte Freisetzung von zytotoxischen Granula unterdrückt wird, wenn die Effektorzellen ein PD-L1-Signal erhalten.



**Abbildung 2: Wirkung von PD-L1/2-Expression auf APCs und Endothelzellen nach Xenotransplantation.** Porzine PD-L1/2 exprimierende APCs wandern ins lymphatische Gewebe des Transplantatempfängers, führen hier zu einer verminderten CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation, zur Expansion regulatorischer T-Zellen und bewirken indirekt durch die Inhibition der CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen auch eine verminderte B-Zellaktivierung. Die Expression von PD-L1/2 auf porzinem Endothel im Transplantat sollte zusätzlich zu einer verminderten Lyse der transgenen Endothelzellen durch zytotoxische T-Zellen (wie im Bild dargestellt) sowie zytotoxischen NK-Zellen führen.

Die Verstärkung negativer kostimulatorischer Signale stellt ein Konzept zur Vermeidung von zellulären Immunantworten gegen ein porcines Transplantat im Menschen dar. Wie beschrieben, dürfte dieser Ansatz auf mehreren Ebenen inhibitorische Wirkung zeigen. Allerdings deuten die Daten dieser Arbeit auch darauf hin, dass durch die PD-L1/2 Expression auf porzinen Zellen keine komplette Inhibition der humanen anti-porzinen T-Zell- oder NK-Zellaktivierung erreicht werden wird.

Eine andere Strategie zur Minimierung von T-Zellaktivierung nach Transplantation ist die Blockade positiver kostimulatorischer Signale. Dieses Konzept ist gut etabliert und wurde mit

Erfolg zur Verlängerung des Transplantatüberlebens in verschiedenen Modellen der Allo- und Xenotransplantation eingesetzt [103]. So führte die Blockade von CD80/86:CD28-Interaktionen oder die Blockade von CD40:CD154-Interaktionen in Kombination mit weiterer Immunsuppression zu einem Langzeit-Überleben von porzinen Inselzellen in Primaten [7, 104]. *In vitro* Untersuchungen dieser Arbeit, bei denen humane T-Zellen mit L23-PD-L1-Transfektanten stimuliert wurden und gleichzeitig CTLA4-Ig zur Blockade von CD80/86 auf den L23-Zellen eingesetzt wurde, zeigten, dass die Verstärkung negativer Signale und die Blockade positiver Signale synergistische Effekte haben und zur kompletten Inhibition der T-Zellproliferation führen können (Daten nicht gezeigt). Daher scheint für eine effiziente Inhibition von humanen anti-porzinen T-Zellantworten nach Xenotransplantation eine Kombination der Verstärkung negativer kostimulatorischer Signale zusammen mit der Blockade positiver kostimulatorischer Signale ein vielversprechender Ansatz zu sein.

Auch für die Inhibition von NK-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktionen nach einer Transplantation von porzinen Organen in den Menschen gibt es bereits eine vielversprechende Strategie. Die Überexpression von HLA-E auf porzinen Endothelzellen führte *in vitro* zu einer partiellen Inhibition von NK-Zellen [4, 105] und es stehen bereits HLA-E transgene Schweine zur Verfügung [106]. Ob auch die HLA-E-vermittelte-Hemmung und die PD-L1-vermittelte Hemmung auf humane NK-Zellen synergistische Effekte haben, bleibt zu testen. Sollte dies der Fall sein wäre auch hier eine Kombination beider Strategien sinnvoll.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine effiziente langanhaltende Unterdrückung von humanen anti-porzinen zellulären Immunantworten nach einer Xenotransplantation am ehesten durch die Kombination verschiedener Strategien zur Hemmung einzelner Immunzellen erreicht werden wird. Diese Strategien schließen die transgene Expression regulatorischer Moleküle, den „*knock-out*“ aktivierender Moleküle und auch die Verabreichung immunmodulatorischer Reagenzien, wie z. B. Fusionsproteine zur Kostimulationsblockade, mit ein.

### 3. Referenzen

1. Byrne, G.W., et al., *Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage*. *Transplantation*, 1997. **63**(1): p. 149-55.
2. Phelps, C.J., et al., *Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs*. *Science*, 2003. **299**(5605): p. 411-4.
3. Goodman, D.J., et al., *Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells*. *Transplantation*, 1996. **61**(5): p. 763-71.
4. Lilienfeld, B.G., et al., *Transgenic expression of HLA-E single chain trimer protects porcine endothelial cells against human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. *Xenotransplantation*, 2007. **14**(2): p. 126-34.
5. Tadaki, D.K., et al., *Porcine CD80: cloning, characterization, and evidence for its role in direct human T-cell activation*. *Xenotransplantation*, 2003. **10**(3): p. 252-8.
6. Yamada, K., D.H. Sachs, and H. DerSimonian, *Human anti-porcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition*. *J Immunol*, 1995. **155**(11): p. 5249-56.
7. Cardona, K., et al., *Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways*. *Nat Med*, 2006. **12**(3): p. 304-6.
8. Kuwaki, K., et al., *Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience*. *Nat Med*, 2005. **11**(1): p. 29-31.
9. Rietz, C. and L. Chen, *New B7 family members with positive and negative costimulatory function*. *Am J Transplant*, 2004. **4**(1): p. 8-14.
10. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 515-48.
11. Keir, M.E., L.M. Francisco, and A.H. Sharpe, *PD-1 and its ligands in T-cell immunity*. *Curr Opin Immunol*, 2007. **19**(3): p. 309-14.
12. Galili, U. and K. Swanson, *Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(16): p. 7401-4.
13. Galili, U., et al., *Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(33): p. 17755-62.
14. Michler, R.E., et al., *Immature host for xenotransplantation*. *World J Surg*, 1997. **21**(9): p. 924-31.

15. Yamada, K., et al., *Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 32-4.
16. Saethre, M., et al., *Characterization of natural human anti-non-gal antibodies and their effect on activation of porcine gal-deficient endothelial cells*. Transplantation, 2007. **84**(2): p. 244-50.
17. Niemann, H., et al., *Cytomegalovirus early promoter induced expression of hCD59 in porcine organs provides protection against hyperacute rejection*. Transplantation, 2001. **72**(12): p. 1898-906.
18. Kues, W.A., et al., *Epigenetic silencing and tissue independent expression of a novel tetracycline inducible system in double-transgenic pigs*. Faseb J, 2006. **20**(8): p. 1200-2.
19. Kennedy, S.P., et al., *Protection of porcine aortic endothelial cells from complement-mediated cell lysis and activation by recombinant human CD59*. Transplantation, 1994. **57**(10): p. 1494-501.
20. Menoret, S., et al., *Characterization of human CD55 and CD59 transgenic pigs and kidney xenotransplantation in the pig-to-baboon combination*. Transplantation, 2004. **77**(9): p. 1468-71.
21. Miyagawa, S., et al., *Effects of transfected complement regulatory proteins, MCP, DAF, and MCP/DAE hybrid, on complement-mediated swine endothelial cell lysis*. Transplantation, 1994. **58**(7): p. 834-40.
22. Diamond, L.E., et al., *A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation*. Transplantation, 2001. **71**(1): p. 132-42.
23. Schneider, M.K. and J.D. Seebach, *Current cellular innate immune hurdles in pig-to-primate xenotransplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2008. **13**(2): p. 171-7.
24. al-Mohanna, F., et al., *Activation of naive xenogeneic but not allogeneic endothelial cells by human naive neutrophils: a potential occult barrier to xenotransplantation*. Am J Pathol, 1997. **151**(1): p. 111-20.
25. Lilienfeld, B.G., et al., *Porcine UL16-binding protein 1 expressed on the surface of endothelial cells triggers human NK cytotoxicity through NKG2D*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2146-52.
26. Kirchhof, N., et al., *Reversal of diabetes in non-immunosuppressed rhesus macaques by intraportal porcine islet xenografts precedes acute cellular rejection*. Xenotransplantation, 2004. **11**(5): p. 396-407.
27. Davila, E., et al., *T-cell responses during pig-to-primate xenotransplantation*. Xenotransplantation, 2006. **13**(1): p. 31-40.

28. Lafferty, K.J. and A.J. Cunningham, *A new analysis of allogeneic interactions*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1975. **53**(1): p. 27-42.
29. Mueller, D.L., M.K. Jenkins, and R.H. Schwartz, *Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 445-80.
30. Faustman, D.L., et al., *Prevention of rejection of murine islet allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(12): p. 3864-8.
31. Dorling, A., et al., *Detection of primary direct and indirect human anti-porcine T cell responses using a porcine dendritic cell population*. Eur J Immunol, 1996. **26**(6): p. 1378-87.
32. Rogers, N.J., et al., *Cross-species costimulation: relative contributions of CD80, CD86, and CD40*. Transplantation, 2003. **75**(12): p. 2068-76.
33. Mirenda, V., et al., *Achieving permanent survival of islet xenografts by independent manipulation of direct and indirect T-cell responses*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1048-55.
34. Maher, S.E., et al., *Porcine endothelial CD86 is a major costimulator of xenogeneic human T cells: cloning, sequencing, and functional expression in human endothelial cells*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 3838-44.
35. Auchincloss, H., Jr. and D.H. Sachs, *Xenogeneic transplantation*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 433-70.
36. Tanaka, K., K. Sonoda, and J.W. Streilein, *Acute rejection of orthotopic corneal xenografts in mice depends on CD4(+) T cells and self-antigen-presenting cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(12): p. 2878-84.
37. Chitilian, H.V., et al., *The strength of cell-mediated xenograft rejection in the mouse is due to the CD4+ indirect response*. Xenotransplantation, 1998. **5**(1): p. 93-8.
38. Andres, A., et al., *Macrophage depletion prolongs discordant but not concordant islet xenograft survival*. Transplantation, 2005. **79**(5): p. 543-9.
39. McGregor, C.G., et al., *Cardiac xenotransplantation: recent preclinical progress with 3-month median survival*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005. **130**(3): p. 844-51.
40. Kuwaki, K., et al., *Suppression of natural and elicited antibodies in pig-to-baboon heart transplantation using a human anti-human CD154 mAb-based regimen*. Am J Transplant, 2004. **4**(3): p. 363-72.
41. Teotia, S.S., et al., *Prevention, detection, and management of early bacterial and fungal infections in a preclinical cardiac xenotransplantation model that achieves prolonged survival*. Xenotransplantation, 2005. **12**(2): p. 127-33.

42. Yang, Y.G. and M. Sykes, *Xenotransplantation: current status and a perspective on the future*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 519-31.
43. Jones, N.D., et al., *Deletion of alloantigen-reactive thymocytes as a mechanism of adult tolerance induction following intrathymic antigen administration*. Eur J Immunol, 1997. **27**(7): p. 1591-600.
44. Shen, Z., et al., *Different immune effects on cardiac allografts and xenografts induced by neonatal intrathymic inoculation with allogeneic and xenogeneic antigens*. J Heart Lung Transplant, 1996. **15**(10): p. 1034-8.
45. Tran, H.M., et al., *Intrathymic inoculation of donor antigen: an ineffective strategy for prolonging xenograft survival*. Xenotransplantation, 1999. **6**(2): p. 147-54.
46. Ildstad, S.T. and D.H. Sachs, *Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts*. Nature, 1984. **307**(5947): p. 168-70.
47. Lan, P., et al., *Induction of human T-cell tolerance to porcine xenoantigens through mixed hematopoietic chimerism*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3964-9.
48. Lan, P., et al., *Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation*. Blood, 2006. **108**(2): p. 487-92.
49. Suri-Payer, E., et al., *CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells*. J Immunol, 1998. **160**(3): p. 1212-8.
50. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
51. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
52. Park, H.B., et al., *Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells*. Int Immunol, 2004. **16**(8): p. 1203-13.
53. Zheng, S.G., et al., *Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5213-21.
54. Stassen, M., E. Schmitt, and H. Jonuleit, *Human CD(4+)CD(25+) regulatory T cells and infectious tolerance*. Transplantation, 2004. **77**(1 Suppl): p. S23-5.
55. Shevach, E.M., et al., *Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 58-67.

56. Jonuleit, H., et al., *Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1285-94.
57. Benghiat, F.S., et al., *Critical influence of natural regulatory CD25+ T cells on the fate of allografts in the absence of immunosuppression*. Transplantation, 2005. **79**(6): p. 648-54.
58. Schenk, S., et al., *Alloreactive T cell responses and acute rejection of single class II MHC-disparate heart allografts are under strict regulation by CD4+ CD25+ T cells*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3741-8.
59. Graca, L., et al., *Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5558-65.
60. Bushnell, A., et al., *Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect*. Transplantation, 2003. **76**(3): p. 449-55.
61. Porter, C.M., et al., *Characterization and expansion of baboon CD4+CD25+ Treg cells for potential use in a non-human primate xenotransplantation model*. Xenotransplantation, 2007. **14**(4): p. 298-308.
62. Wu, J., et al., *In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells are potent suppressors of T-cell-mediated xenogeneic responses*. Transplantation, 2008. **85**(12): p. 1841-8.
63. Frauwirth, K.A., M.L. Alegre, and C.B. Thompson, *Induction of T cell anergy in the absence of CTLA-4/B7 interaction*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 2987-93.
64. Fan, K., et al., *Blockade of LIGHT/HVEM and B7/CD28 signaling facilitates long-term islet graft survival with development of allospecific tolerance*. Transplantation, 2007. **84**(6): p. 746-54.
65. Yamashita, K., et al., *Long-term acceptance of rat cardiac allografts on the basis of adenovirus mediated CD40Ig plus CTLA4Ig gene therapies*. Transplantation, 2003. **76**(7): p. 1089-96.
66. Lenschow, D.J., et al., *Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg*. Science, 1992. **257**(5071): p. 789-92.
67. Agata, Y., et al., *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes*. Int Immunol, 1996. **8**(5): p. 765-72.
68. Yamazaki, T., et al., *Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5538-45.
69. Okazaki, T. and T. Honjo, *The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance*. Trends Immunol, 2006. **27**(4): p. 195-201.

70. Sharpe, A.H., et al., *The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 239-45.
71. Tsushima, F., et al., *Preferential contribution of B7-H1 to programmed death-1-mediated regulation of hapten-specific allergic inflammatory responses*. Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2773-82.
72. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 261-8.
73. Chemnitz, J.M., et al., *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*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 945-54.
74. Okazaki, T., et al., *PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13866-71.
75. Ishida, Y., et al., *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. Embo J, 1992. **11**(11): p. 3887-95.
76. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
77. Butte, M.J., et al., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 111-22.
78. Tamura, H., et al., *B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function*. Blood, 2001. **97**(6): p. 1809-16.
79. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1365-9.
80. Fife, B.T. and J.A. Bluestone, *Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways*. Immunol Rev, 2008. **224**: p. 166-82.
81. Nishimura, H., et al., *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 141-51.
82. Nishimura, H., et al., *Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice*. Science, 2001. **291**(5502): p. 319-22.
83. Iwai, Y., et al., *PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver*. J Exp Med, 2003. **198**(1): p. 39-50.
84. Ito, T., et al., *Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo*. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6648-56.

85. Dudler, J., et al., *Gene transfer of programmed death ligand-1.Ig prolongs cardiac allograft survival*. Transplantation, 2006. **82**(12): p. 1733-7.
86. Ozkaynak, E., et al., *Programmed death-1 targeting can promote allograft survival*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6546-53.
87. Wang, C.J., et al., *Protective role of programmed death 1 ligand 1 (PD-L1)in nonobese diabetic mice: the paradox in transgenic models*. Diabetes, 2008. **57**(7): p. 1861-9.
88. Sandner, S.E., et al., *Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3408-15.
89. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 116-26.
90. Tseng, S.Y., et al., *B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells*. J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 839-46.
91. Cao, Y., et al., *Keratinocytes induce local tolerance to skin graft by activating interleukin-10-secreting T cells in the context of costimulation molecule B7-H1*. Transplantation, 2003. **75**(8): p. 1390-6.
92. Ding, Q., et al., *B7H1-Ig fusion protein activates the CD4+ IFN-gamma receptor+ type 1 T regulatory subset through IFN-gamma-secreting Th1 cells*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3606-14.
93. Chen, Z.M., et al., *IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function*. Blood, 2003. **101**(12): p. 5076-83.
94. Wang, L., et al., *Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(27): p. 9331-6.
95. Rodig, N., et al., *Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity*. Eur J Immunol, 2003. **33**(11): p. 3117-26.
96. Mazanet, M.M. and C.C. Hughes, *B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis*. J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3581-8.
97. Hori, J., et al., *B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 5928-35.
98. Carter, L., et al., *PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2*. Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 634-43.
99. Golden-Mason, L., et al., *Cutting edge: programmed death-1 expression is increased on immunocytes in chronic hepatitis C virus and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3637-41.

100. Long, E.O., *Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm*. Immunol Rev, 2008. **224**: p. 70-84.
101. Gao, W., et al., *Stimulating PD-1-negative signals concurrent with blocking CD154 co-stimulation induces long-term islet allograft survival*. Transplantation, 2003. **76**(6): p. 994-9.
102. Jeon, D.H., et al., *Porcine PD-L1: cloning, characterization, and implications during xenotransplantation*. Xenotransplantation, 2007. **14**(3): p. 236-42.
103. Wekerle, T., et al., *Mechanisms of transplant tolerance induction using costimulatory blockade*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(5): p. 592-600.
104. Hering, B.J., et al., *Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates*. Nat Med, 2006. **12**(3): p. 301-3.
105. Forte, P., et al., *HLA-E expression on porcine cells: protection from human NK cytotoxicity depends on peptide loading*. Am J Transplant, 2005. **5**(9): p. 2085-93.
106. Weiss, E.H., et al., *HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity*. Transplantation, 2009. **87**(1): p. 35-43.

## 4. Anhang

### A) Manuskript 1

Suppression of Human T-cell Activation and Expansion of Regulatory T cells by Pig Cells Overexpressing PD-Ligands

Annegret Plege, Katja Borns, Wiebke Baars, and Reinhard Schwitzer

**publiziert in Transplantation 2009; 87: 975-982**

*Aufgrund urheberrechtlicher Gründe kann die PDF-Version des Manuskriptes hier nicht gedruckt werden. Falls sie diese dennoch ansehen möchten, folgen Sie bitte diesem Link:*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19352115>

## **B) Manuskript 2**

Overexpression of human PD-Ligand-1 protects pig cells from lysis by human cytotoxic effector cells

Annegret Plege, Katja Borns, Wiebke Baars, Jürgen Klempnauer, and Reinhard Schwinzer

**Zur Veröffentlichung eingereicht**

**Overexpression of human PD-Ligand-1 protects pig cells from lysis by human cytotoxic effector cells**

Annegret Plege, Katja Borns, Wiebke Baars, Jürgen Klempnauer, Reinhard Schwinzer

Transplantationslabor, Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30623 Hannover, Germany

Running head: PD-L1 mediated protection of pig cells

Address for correspondence: Dr. Reinhard Schwinzer, Transplantationslabor, Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30623 Hannover, Germany. E-mail: [Schwinzer.Reinhard@MH-Hannover.de](mailto:Schwinzer.Reinhard@MH-Hannover.de); Phone: +49/511-532-4204; Fax: +49/511-532-8326.

Key words: cytotoxic effector cells, PD-1/PD-Ligands, Xenotransplantation

Abbreviations: PD-1, Programmed death 1

PD-L, Programmed death receptor ligands

**Abstract:**

**Background:** The recent generation of  $\alpha$ 1,3galactosyltransferase deficient pigs was an important step to overcome hyperacute rejection after pig-to-primate xenotransplantation. However, cellular rejection still remains a hurdle for successful xenograft survival. We have shown previously that the induction of a human anti-pig T cell response (*in vitro* activation of CD4<sup>+</sup> T cells) can be suppressed by overexpression of human negative costimulatory ligands (e.g. PD-L1) on pig antigen presenting cells. Here, we asked whether PD-L1 mediated enhancement of negative signalling might also be efficient during the effector phase of human anti-pig cellular immune responses.

**Methods:** Pig cell lines stably overexpressing human PD-L1 (L23-PD-L1 cells) and appropriate controls (L23-GFP cells) were generated. The effect of PD-L1 expression on cellular cytotoxicity was tested by <sup>51</sup>Cr-release assays using L23-PD-L1 and L23-GFP cells as targets and IL-2-activated human CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells as effectors.

**Results:** CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells acquired cytolytic potential and up-regulated the PD-1 receptor during cultivation with IL-2. Both cell types lysed L23-GFP cells very effectively but were less potent on L23-PD-L1 targets (reduced cytotoxicity of about 50%). When cytotoxic effector cells were used that do not express PD-1 (293-95L cells), L23-GFP and L23-PD-L1 cells were lysed with similar intensity suggesting that PD-1/PD-L1 interactions are required for PD-L1 mediated protection. Flow cytometric studies revealed that a proportion of activated CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T cells underwent apoptosis when exposed to PD-L1 expressing L23 cells.

**Conclusions:** These data suggest that cytotoxicity of PD-1 expressing effector populations can be suppressed by overexpression of PD-L1 on target cells. Binding of PD-L1 to PD-1 may (a) trigger negative signals that prevent release of cytolytic effector molecules and/or (b) induce apoptosis in the attacking effector cells thereby protecting targets from destruction.

## Introduction

Enormous progress has been made in recent years to overcome the barrier of hyperacute rejection after pig-to-primate xenotransplantation. For example, transgenic expression of human complement regulatory molecules in pigs has been shown to be an effective strategy to prevent hyperacute rejection in preclinical models of xenotransplantation [1]. Furthermore, alpha1,3-galactosyltransferase deficient pigs are now available and represent another approach to avoid hyperacute rejection mediated by pre-existing antibodies [2]. Thus, for the further development of clinical xenotransplantation immunological concepts are now required facilitating the control of human anti-pig cellular immune responses.

One approach for the downregulation of human anti-pig T cell responses by genetic modification of pigs may derive from the new concept of “negative costimulation” [3]. It is well established that T cells need more than the signal through the antigen receptor (“signal 1”) to get fully activated. Classical costimulatory molecules like the B7 family members CD80 or CD86 deliver a positive signal (“signal 2”) to T cells which – in concert with “signal 1” – leads to their complete activation. The B7 family of T cell costimulatory molecules has recently acquired several new members. Interestingly, some of them do not deliver a positive costimulatory “signal 2” to T cells but generate negative signals [4]. The PD-1 pathway has already been described in some detail.

The PD-1 (programmed death-1) receptor was initially found in cell lines undergoing programmed cell death and was thought to be involved in this process. Later it was demonstrated that PD-1 is induced by T and B cell activation and plays a role in the regulation of the activation process [5]. PD-1 contains a cytoplasmatic immunoreceptor tyrosine-based switch motif [6]. Binding of the ligands PD-L1 or PD-L2 to PD-1 leads to recruitment of

SHP-phosphatases which downregulate T cell receptor signalling accompanied by reduced T cell proliferation and cytokine production [7].

The efficiency of PD-1/PD-Ligand targeting to modulate immune responses to an allograft has been shown in various models. For example, prolongation of allograft survival could be obtained by transfer of PD-L1.Ig gene to donor hearts in a rat transplantation model [8]. Furthermore, an enhancement of PD-1-mediated negative costimulation by the application of PD-L1.Ig prolonged graft survival in mouse models [9]. Recent data also show that overexpression of PD-L1 on islet grafts in mice can partially prolong islet graft survival [10].

In pig-to-human xenotransplantation there is the chance to create grafts exhibiting a strong negative costimulatory potential. We have previously shown that human CD4<sup>+</sup> T cells respond with reduced proliferation, a cytokine pattern which is dominated by IL-10, and an expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> to stimulation with pig cells ectopically expressing human PD-Ligands [11]. These findings suggested that an enhancement of negative costimulatory signals counteracts with the induction of a human-anti-pig T cell response. Here we investigated the effects of PD-1/PD-L1-mediated negative costimulation during the effector phase of the response. The data suggest that the augmentation of PD-1 signalling in human CD8<sup>+</sup> effector T cells and NK cells decreases their capacity to lyse pig target cells.

## **Materials and methods**

### **Cells**

The porcine peripheral blood B cell line L23 [12] was obtained from the European Collection of Cell Cultures (London, U.K.). L23-PD-L1 transfectants and L23-GFP controls were generated as described [11]. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from leukotrap filters obtained from the Department of Transfusion Medicine (Hannover Medical School) by Ficoll gradient centrifugation. CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell subsets were negatively isolated by MACS (Miltenyi Biotec). Purity of CD8<sup>+</sup> T cells or CD4<sup>+</sup> T cells was usually  $\geq 90\%$ . To purify NK cells, PBMC were stained by monoclonal antibodies directed to CD56 and subsequently CD56<sup>+</sup> cells were isolated by electronic cell sorting (Cell Sorting Core Facility, Hannover Medical School). Human embryonic kidney cell lines 293 transfected with pcDNA3 containing human CD95-L or with pcDNA3 empty vector were generated as described [13].

### **Immunofluorescence staining and flow cytometry**

The following mAb were used: anti-pig MHC class-I (74-11-10), anti-pig MHC class-II (MSA3) both provided by A. Saalmüller, Wien, Austria; anti-human CD8 (AICD8.1, provided by S.C. Meuer, Heidelberg, Germany); anti-human PD-L1-PE (MIH1, eBioscience) and anti-human PD-1-PE (MIH4, BD Biosciences). Binding of unlabeled primary reagents was visualized using FITC-conjugated goat anti-mouse IgG plus IgM (Dianova) or PE-conjugated rat anti-mouse IgG (BD Biosciences). Apoptotic cells were stained by using Annexin-FITC (BD-Biosciences). Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and data processed by using WinMDI software.

### **Activation of human CD8<sup>+</sup> T cells by pig L23 cells**

Amounts of  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells or human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated with  $4 \times 10^3$  L23 transfectants (irradiated with 30 Gray) in microtiter plates in a total volume of 200  $\mu$ l culture medium (RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 50 U/ml penicillin, 4 mM L-glutamin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate and 0.05 mM  $\beta$ -mercaptoethanol). After 6 days <sup>3</sup>H-TdR was added and cultures were harvested after an additional 16 h incubation period.

### **Analysis of Apoptosis**

Amounts of  $4 \times 10^6$  human CD8<sup>+</sup> T cells were incubated with  $5 \times 10^5$  irradiated L23-GFP transfectants for 6 days in a total volume of 10 ml culture medium. Subsequently, CD8<sup>+</sup> T cells were purified by Ficoll gradient centrifugation and cultured for additional 24 h without stimulus. Afterwards  $1 \times 10^5$  CD8<sup>+</sup> T cells were co-cultured with  $2 \times 10^5$  L23-GFP or L23-PD-L1 cells in microtiter plates in 200  $\mu$ l culture medium for 4 h and apoptotic cells were stained by anti-CD8 mAb and Annexin-FITC. Frequencies of Annexin-positive cells were determined within CD8 positive cells.

### **Cytotoxicity assays**

The cytotoxic activity of human effector cells was assessed by <sup>51</sup>Cr-release assays. L23-GFP or L23-PD-L1 cells ( $3 \times 10^6$ ) were labeled with 100  $\mu$ Ci of sodium [<sup>51</sup>Cr]-chromate (Amersham Biosciences) and plated at  $1 \times 10^4$  cells / well in microtiter plates as target cells. To generate NK cells and CD8<sup>+</sup> effector cells with cytotoxic potential purified CD8<sup>+</sup> or CD56<sup>+</sup> cell subsets were cultured with 100 U/ml IL-2 for 4-5 days. Effector cells were added at the indicated effector:target ratios to the target cells in microtiter plates in a total volume of 200  $\mu$ l. The plates were incubated for 4 h at 37°C. The <sup>51</sup>Cr released from dead cells was

measured in the supernatants. The percentage of specific cell lysis mediated by effector cells was calculated as described previously [13].

### **Statistical analysis**

Frequencies of apoptotic cells in activated CD8<sup>+</sup> T cells cultured with L23-GFP or L23-PD-L1 cells were compared by using the Students *t* test.

## Results

### **Pig cells overexpressing human PD-L1 trigger diminished proliferative responses of human T cells**

Promoting receptor/ligand interactions which generate negative costimulatory signals might prevent T cell activation during anti-graft immune responses. To assess the potential of this approach for pig-to-primate xenotransplantation we wanted to create pig cells that enhance negative costimulatory signals in human T cells. Thus, the pig B cell line L23 was transfected with the human negative costimulatory molecule PD-L1. Stable transfectants (L23-PD-L1 cells) strongly expressed human PD-L1 whereas mock transfected controls (L23-GFP cells) were PD-L1-negative (Fig. 1). There was no difference in the expression of MHC class-I and -II molecules between L23-PD-L1 or L23-GFP cells. Furthermore, as previously reported [11] PD-L1 transfectants and control cells expressed similar amounts of the positive costimulatory molecules CD80/86 and CD40 (data not shown).

To assess the effects of PD-L1 expression on the induction of human T cell activation L23-PD-L1 cells and L23-GFP controls were used as stimulators for the entire PBMC population as well as isolated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. These studies revealed that the proliferative responses of all three cell populations were markedly reduced when L23-PD-L1 cells were used for stimulation (Fig. 2) and thus extended previous data demonstrating an inhibitory effect of PD-L1 only in purified CD4<sup>+</sup> T cells [11].

### **PD-L1 protects pig cells from lysis mediated by human cytotoxic effector cells**

The data described above suggested that the induction of a human anti-pig T cell response can be suppressed by an enhancement of negative costimulatory signals. We next asked whether PD-L1 mediated negative signalling might also be efficient during the effector phase of human anti-pig cellular immune responses. To address this question purified human CD8<sup>+</sup> T cells were cultivated with high concentrations of IL-2 and used as effectors in <sup>51</sup>Chromium-release assays. IL-2-induced CD8<sup>+</sup> T cells exhibited a strong cytotoxic potential on L23-GFP targets (Fig. 3A). However, when PD-L1 expressing target cells were used, specific lysis was considerably reduced. At an effector:target ratio of 25, lysis of L23-PD-L1 cells was usually reduced by about 50% compared to lysis of L23-GFP target cells.

In addition to CD8<sup>+</sup> T cells human NK cells have the capacity to lyse porcine target cells [14]. Therefore we asked whether PD-L1 expression on pig cells might also protect against lysis by NK cells. As expected, IL-2-activated NK cells lysed porcine L23 cells very efficiently, even at low effector:target ratios (Fig. 3B). Again, lysis of L23-PD-L1 cells was reduced by about 50% compared to L23 control cells. It should be noted, that complete protection of L23-PD-L1 cells was never observed, irrespective whether activated CD8<sup>+</sup> T cells or NK cells were used as effectors. Thus, PD-L1 expression seems to protect pig cells only partially from lysis by human effector cells.

### **Protection by PD-L1 requires PD-1 expression on cytotoxic effector cells**

The observed protection of PD-L1 expressing transfectants might be mediated by binding of transgenic PD-L1 to PD-1 on human effector cells thereby inhibiting T cell /NK cell-receptor signalling which is required for the release of cytotoxic granules and/or the involvement of CD95L/fasL-mediated killing mechanisms. To approve this assumption we analyzed the expression of PD-1 receptors on CD8<sup>+</sup> T cells and assessed the effects of antibody-mediated

blocking of PD-1/PD-L1 interactions. Resting CD8<sup>+</sup> T cells did not express PD-1 (Fig. 4A). During cultivation in IL-2 containing medium PD-1 was upregulated and was found after 4 days with low but readily detectable amounts on the surface of CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 4A). Similarly, IL-2 activated NK cells weakly expressed PD-1 (data not shown). The polyclonal anti-PD1 Ab (R&D) and anti-PD-L1 mAb (MIH1, eBioscience) were used to block the interaction between the molecules. However, the data obtained were not conclusive, showing borderline effects of the antibodies in some experiments but not in others (data not shown).

Another approach to assess the relevance of PD-1/PD-L1 interactions for the observed protective effects is the usage of killer cells which can lyse L23 cells but do not express PD-1. If the interaction of PD-1 and PD-L is required to prevent lysis PD-1-negative killers should lyse L23 and L23-PD-L1 cells with similar intensity. 293 cells genetically engineered to overexpress the human apoptosis-inducing molecule CD95(fas)L [13] fulfill these criteria. They do not express the PD-1 receptor (Fig. 4B) and exhibit significant cytotoxic potential on L23 cells (Fig. 5). The observation that 293-95L cells lysed L23-GFP and L23-PD-L1 targets to a same extent, supports the assumption that functional interaction of PD-L1 and PD-1 on effector cells is required for the protective effect of PD-L1 molecules.

### **PD-L1 expressing cells induce apoptosis in activated CD8<sup>+</sup> effector cells**

Engagement of PD-L1 by PD-1 induces negative signals but can also result in apoptosis of activated T cells in some experimental settings [15]. To assess whether activated CD8<sup>+</sup> T cells undergo cell death when exposed to L23-PD-L1 transfectants co-culture experiments were performed and the frequency of apoptotic CD8<sup>+</sup> T cells was determined by Annexin-FITC staining. Among activated CD8<sup>+</sup> T cells only a small proportion of cells (1 to 2%) were stained by Annexin (Fig. 6A). This frequency increased when CD8<sup>+</sup> cells were co-cultured with L23-GFP cells and was further augmented by the presence of L23-PD-L1 cells. In a

series of three experiments,  $11 \pm 3\%$  Annexin-positive CD8<sup>+</sup> cells were found in co-cultures containing L23-GFP cells but  $21 \pm 4\%$  in L23-PD-L1 cultures (Fig. 6B). Thus, in addition to switching off the effector potential of PD-1 expressing cells PD-L-1 might protect target cells by inducing apoptosis in the attacking effector population.

## Discussion

Triggering of PD-1-mediated negative costimulation by the application of PD-L1.Ig fusion proteins has been described to prolong allograft survival in various mouse transplantation models [9]. Furthermore, we have recently shown that human CD4<sup>+</sup> T cells respond *in vitro* to PD-L1 expressing porcine transfectants with reduced proliferation, a cytokine pattern which is dominated by IL-10, and an expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> [11]. Thus, an enhancement of negative costimulatory signals in T cells seems to be a promising concept to diminish T cell responses to allo- and xenografts. Here, we addressed the question as to whether negative costimulatory signals might be capable of controlling cellular cytotoxicity during the effector phase of an anti-graft response. We found that PD-L1 expressing porcine target cells are partially protected from lysis by IL-2-activated CD8<sup>+</sup> T cells as well as NK cells.

Unseparated PBMC, and purified CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells responded in xenogeneic MLRs with reduced proliferation to stimulation by L23-PD-L1 cells (Fig. 2). PD-1 is not expressed on resting T cells but is upregulated during T cell activation [7] (Fig. 4). Stimulation of PD-1 by PD-Ligand binding leads to phosphorylation on its two intracellular tyrosines and recruitment of phosphatases (SHP-1/SHP-2) which downregulate TcR signaling through direct dephosphorylation of signaling intermediates [16]. Thus, diminished proliferation of human T cells to stimulation with L23-PD-L1 cells (Fig. 2) in all likelihood results from dampening of TcR signals by PD-1-induced negative costimulation. On the cellular level, decreased production of IL-2 and enhanced synthesis of IL-10 by L23-PD-L1 stimulated CD4<sup>+</sup> T cells [11] might be key elements for the capacity of PD-L1 to counteract the induction of human anti-pig T cell responses.

Activation of naïve/resting T cells requires signalling via the TcR (signal 1) as well as signals generated by triggering of positive costimulatory receptors like CD28 (signal 2). In contrast, in activated CD8<sup>+</sup> effector T cells TcR-signalling alone is sufficient to deliver “death signals” to target cells. Destruction of targets can be mediated by the release of cytotoxic granules or may involve CD95(fas)/CD95L-pathways to induce apoptosis. IL-2-activated CD8<sup>+</sup> T cells exhibited reduced cytotoxicity on PD-L1 expressing targets (Fig. 3A). Thus, PD-1-mediated negative signalling may not only interfere with TcR signals inducing cytokine gene transcription during the induction of immune responses but may also dampen TcR signals required for the administration of effector molecules to target cells during the effector phase of a response. This assumption is also supported by the finding that mouse CD8<sup>+</sup> T cells exhibit reduced cytolytic activity to endothelial cells expressing PD-L1 [17, 18].

Cytotoxicity of human NK cells was also reduced by PD-L1 expression on target cells (Fig 3B). This is, to our knowledge, the first evidence that PD-L1 may not only control T cell but also NK cell activity. The observation that the PD-1 receptor is upregulated on NK cells in patients with chronic hepatitis C infection [19], supports the assumption of a functional role of this molecule on NK cells. The mechanisms underlying the suppressive effect of PD-L1 on NK cell cytotoxicity remains to be determined. PD-1 might recruit SHP phosphatases to its immunoreceptor tyrosine-based switch motif in NK cells as described for T cells since other inhibitory receptors on NK cells act in similar manners [20]. Thus it is conceivable that PD-1-mediated negative signals interfere with signals from activating NK receptors (e.g. NKG2D) thereby diminishing the release of effector molecules.

Interaction of the PD-1 receptor with PD-Ligands does not only result in the generation of negative costimulatory signals but can also induce apoptosis in some experimental settings [21]. Indeed, we found more Annexin-positive CD8<sup>+</sup> T cells in cocultures containing PD-L1

transfectants than in control cultures suggesting that a portion of activated CD8<sup>+</sup> T cells undergoes apoptosis in response to PD-1 triggering (Fig. 6). Thus, it is likely that two different mechanisms are responsible for reduced proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells to stimulation with L23-PD-L1 cells (Fig. 2). First, as discussed above, PD-1-mediated signalling may downregulate TcR signals which are required for the synthesis of growth promoting cytokines (e.g. IL-2), and second, PD-L1-induced apoptosis could decrease the number of cells responding to L23 xenoantigen. It is worth mentioning that we did not observe PD-L1-induced apoptosis in CD4<sup>+</sup> T cells [11] suggesting that the mechanisms leading to reduced proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells to stimulation by L23-PD-L1 cells may not be identical. The pronounced susceptibility of activated CD8<sup>+</sup> T cells to PD-L1-induced apoptosis may also contribute to protection of L23-PD-L1 cells against lysis by CD8<sup>+</sup> effectors. Thus, PD-1 expressing effector cells could achieve a death signal during first contact with PD-L1 expressing targets and die before they can kill further target cells. In this scenario, cell destruction will not proceed but comes to a standstill at low level.

It is well established that blockade of positive costimulatory signals (e.g. inhibition of CD80/86-CD28 interactions) can prolong allograft survival in mice [22]. However, this concept is limited by the fact that CD8<sup>+</sup> T cells seem to be somehow resistant to costimulatory blockade which can result in CD8<sup>+</sup> T cell-mediated graft rejection [23, 24]. As discussed above, our own observations and those of others [9, 25] suggest that CD8<sup>+</sup> T cells are particularly sensitive to PD-1-mediated negative costimulatory signals. Thus, enhancing these signals could be a strategy to suppress the activity of CD8<sup>+</sup> T cells which are resistant to costimulatory blockade.

In summary, we show that cytotoxicity of human CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells can be suppressed *in vitro* by overexpression of human PD-L1 on pig cells. Together with our

previous observation that the induction of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation is inhibited by an enhancement of negative signalling this approach may interfere with both, the induction and the effector phase of human anti-pig cellular immune responses. It should be noted, however, that complete inhibition of cellular cytotoxicity was not achieved. Thus, for an effective control of cytotoxic responses genetically engineered overexpression of human PD-L1 in pigs might be combined with transgenic expression of human HLA-E to further prevent NK activity [26] and/or human TRAIL [27] which is expected to downregulate T cell reactivity.

**Acknowledgments:** We would like to thank Dr. J. Hundrieser for careful reading of the manuscript. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR 535).

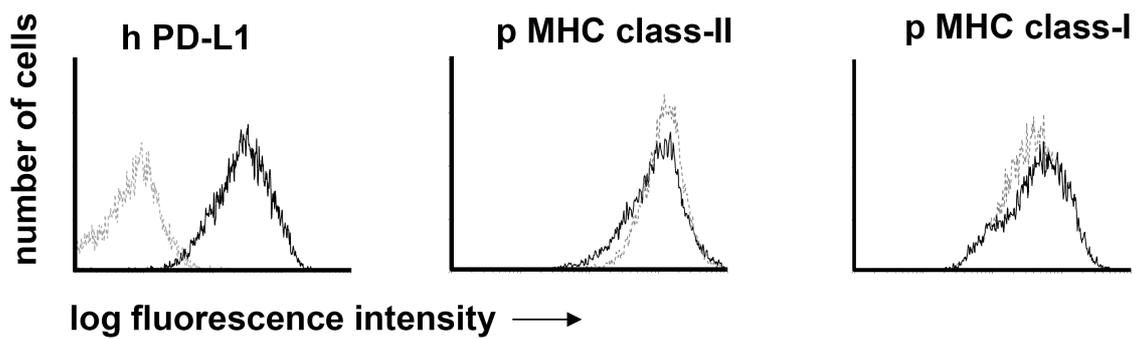
## References

1. BYRNE GW, MCCURRY KR, MARTIN MJ, et al. Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* 1997; 63: 149-155.
2. PHELPS CJ, KOIKE C, VAUGHT TD, et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 2003; 299: 411-414.
3. RIETZ C, CHEN L. New B7 family members with positive and negative costimulatory function. *Am J Transplant* 2004; 4: 8-14.
4. GREENWALD RJ, FREEMAN GJ, SHARPE AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 515-548.
5. KEIR ME, FRANCISCO LM, SHARPE AH. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 309-314.
6. OKAZAKI T, MAEDA A, NISHIMURA H, KUROSAKI T, HONJO T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13866-13871.
7. SHARPE AH, FREEMAN GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 116-126.

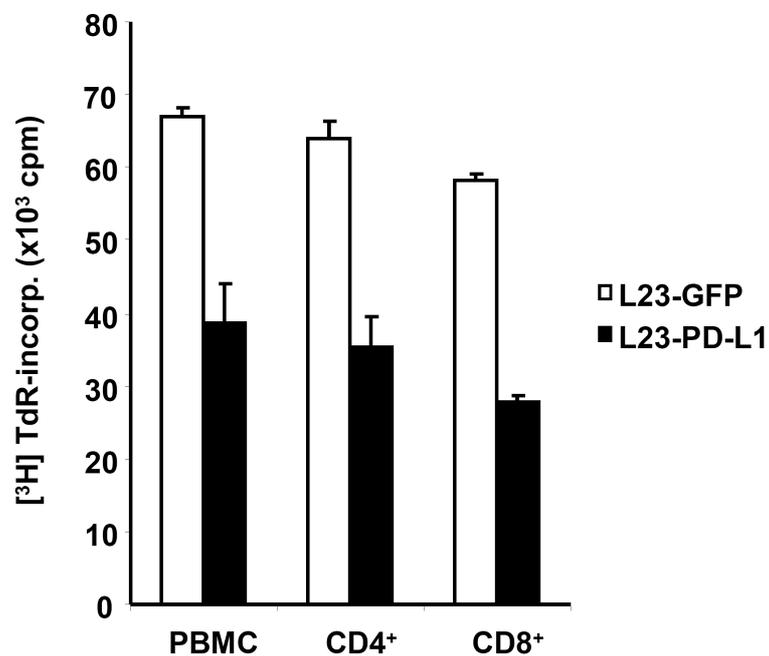
8. DUDLER J, LI J, PAGNOTTA M, et al. Gene transfer of programmed death ligand-1.Ig prolongs cardiac allograft survival. *Transplantation* 2006; 82: 1733-1737.
9. OZKAYNAK E, WANG L, GOODEARL A, et al. Programmed death-1 targeting can promote allograft survival. *J Immunol* 2002; 169: 6546-6553.
10. WANG CJ, CHOU FC, CHU CH, et al. Protective role of programmed death 1 ligand 1 (PD-L1)in nonobese diabetic mice: the paradox in transgenic models. *Diabetes* 2008; 57: 1861-1869.
11. PLEGE A, BORNS K, BAARS W, SCHWINZER R. Suppression of Human T-Cell Activation and Expansion of Regulatory T Cells by Pig Cells Overexpressing PD-Ligands. *Transplantation* 2009; 87: 975-982.
12. KAEFFER B, BOTTREAU E, PHAN THANH L, OLIVIER M, SALMON H. Histocompatible miniature, boar model: selection of transformed cell lines of B and T lineages producing retrovirus. *Int J Cancer* 1990; 46: 481-488.
13. DULAT HJ, VON GRUMBKOW C, BAARS W, et al. Down-regulation of human alloimmune responses by genetically engineered expression of CD95 ligand on stimulatory and target cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2217-2226.
14. LILIENFELD BG, GARCIA-BORGES C, CREW MD, SEEBACH JD. Porcine UL16-binding protein 1 expressed on the surface of endothelial cells triggers human NK cytotoxicity through NKG2D. *J Immunol* 2006; 177: 2146-2152.

15. DONG H, STROME SE, SALOMAO DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8: 793-800.
16. CHEMNITZ JM, PARRY RV, NICHOLS KE, JUNE CH, RILEY JL. 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. *J Immunol* 2004; 173: 945-954.
17. RODIG N, RYAN T, ALLEN JA, et al. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2003; 33: 3117-3126.
18. MAZANET MM, HUGHES CC. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *J Immunol* 2002; 169: 3581-3588.
19. GOLDEN-MASON L, KLARQUIST J, WAHED AS, ROSEN HR. Cutting edge: programmed death-1 expression is increased on immunocytes in chronic hepatitis C virus and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences. *J Immunol* 2008; 180: 3637-3641.
20. LONG EO. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol Rev* 2008; 224: 70-84.
21. HORI J, WANG M, MIYASHITA M, et al. B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *J Immunol* 2006; 177: 5928-5935.

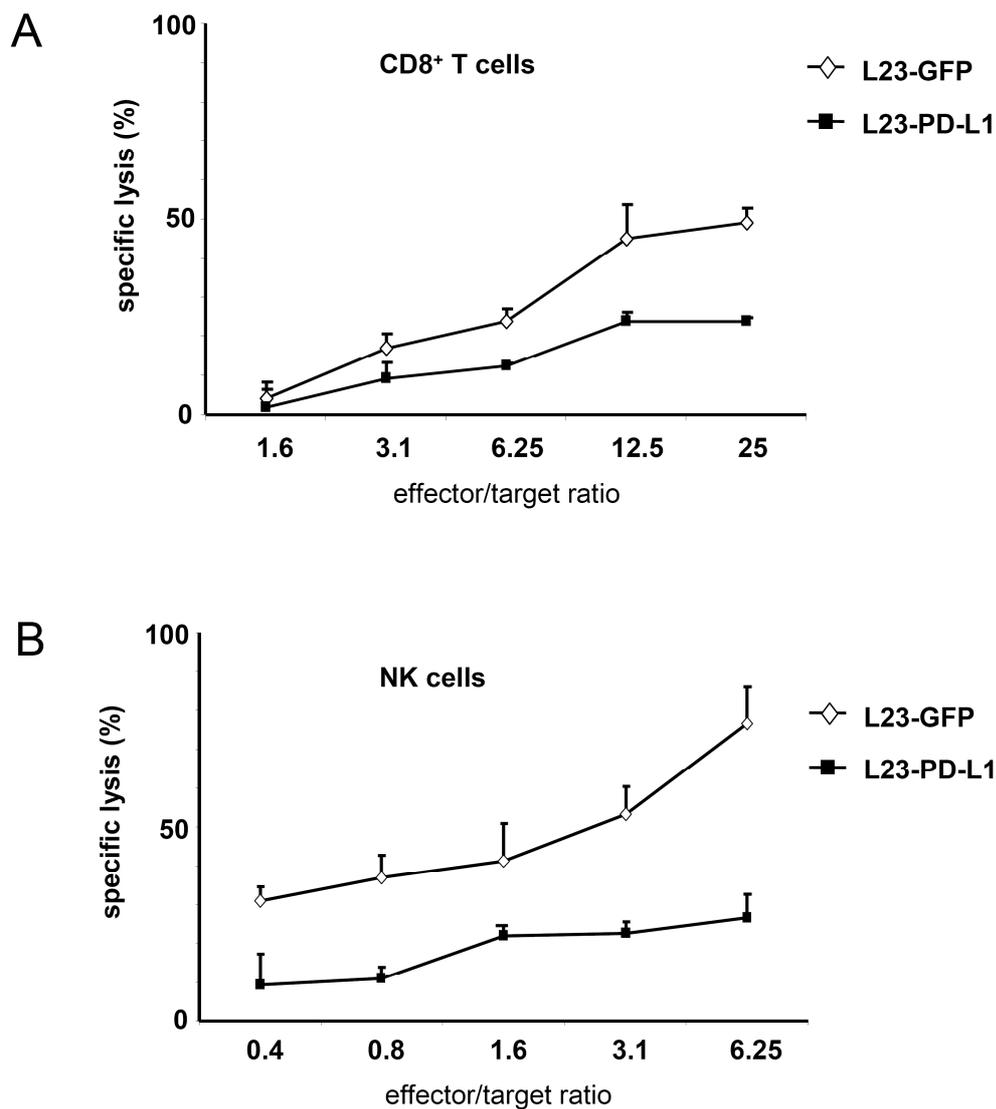
22. LARSEN CP, ELWOOD ET, ALEXANDER DZ, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996; 381: 434-438.
23. TRAMBLEY J, BINGAMAN AW, LIN A, et al. Asialo GM1(+) CD8(+) T cells play a critical role in costimulation blockade-resistant allograft rejection. *J Clin Invest* 1999; 104: 1715-1722.
24. NEWELL KA, HE G, GUO Z, et al. Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD4+ but not CD8+ T cells. *J Immunol* 1999; 163: 2358-2362.
25. CARTER L, FOUSER LA, JUSSIF J, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 2002; 32: 634-643.
26. WEISS EH, LILIENFELD BG, MULLER S, et al. HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity. *Transplantation* 2009; 87: 35-43.
27. KLOSE R, KEMTER E, BEDKE T, et al. Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs. *Transplantation* 2005; 80: 222-230.



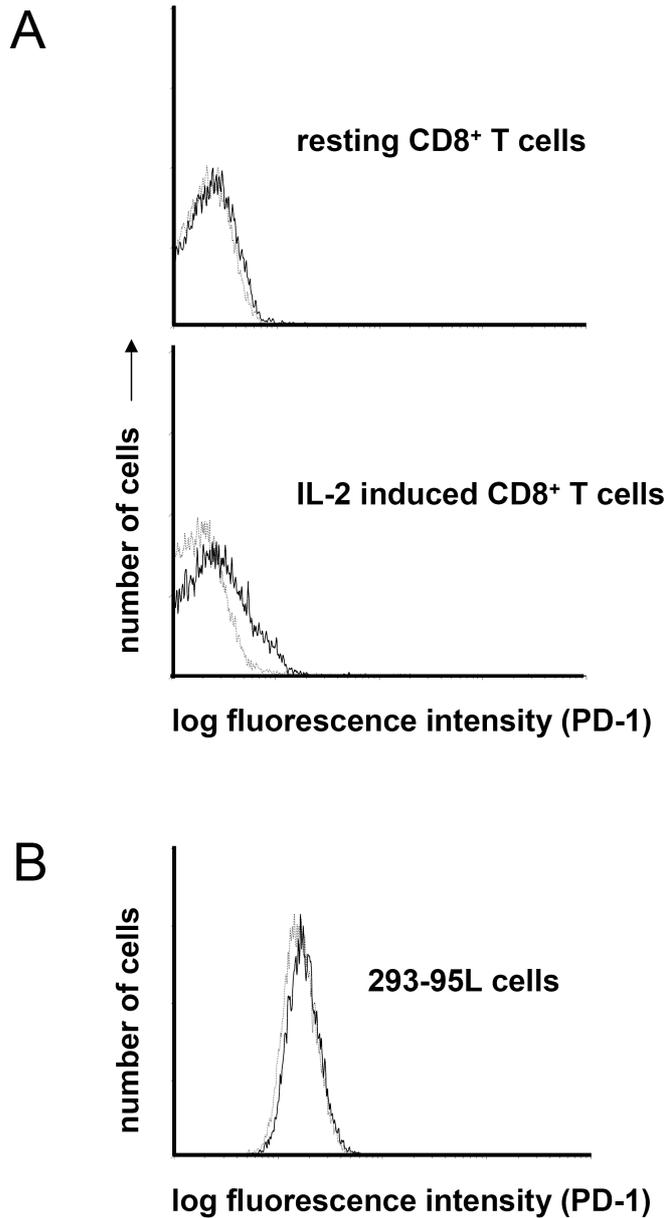
*Fig. 1.* Phenotypic characterization of L23 transfectants. L23 cells transfected with the pIRES2-AcGFP1 vector containing human PD-L1 (L23-PD-L1 cells) or with empty vector (L23-GFP cells) were stained with mAbs directed to human PD-L1, porcine MHC class-II or porcine MHC class-I. Light histograms represent staining of L23-GFP cells by the mAbs, dark histograms represent staining of L23-PD-L1 cells.



*Fig. 2.* Suppression of human T cell activation after stimulation with L23-PD-L1 transfectants.  $1 \times 10^5$  human peripheral blood mononuclear cells, purified CD4<sup>+</sup> T cells or purified human CD8<sup>+</sup> T cells were stimulated with irradiated L23-PD-L1 or L23-GFP cells ( $4 \times 10^3$ /well). Cells were cultured for 6 days, pulsed with [<sup>3</sup>H-TdR] and harvested after 16 hours. Results are expressed as mean cpm  $\pm$  SD of triplicate cultures. Data are representative for at least three independent experiments.



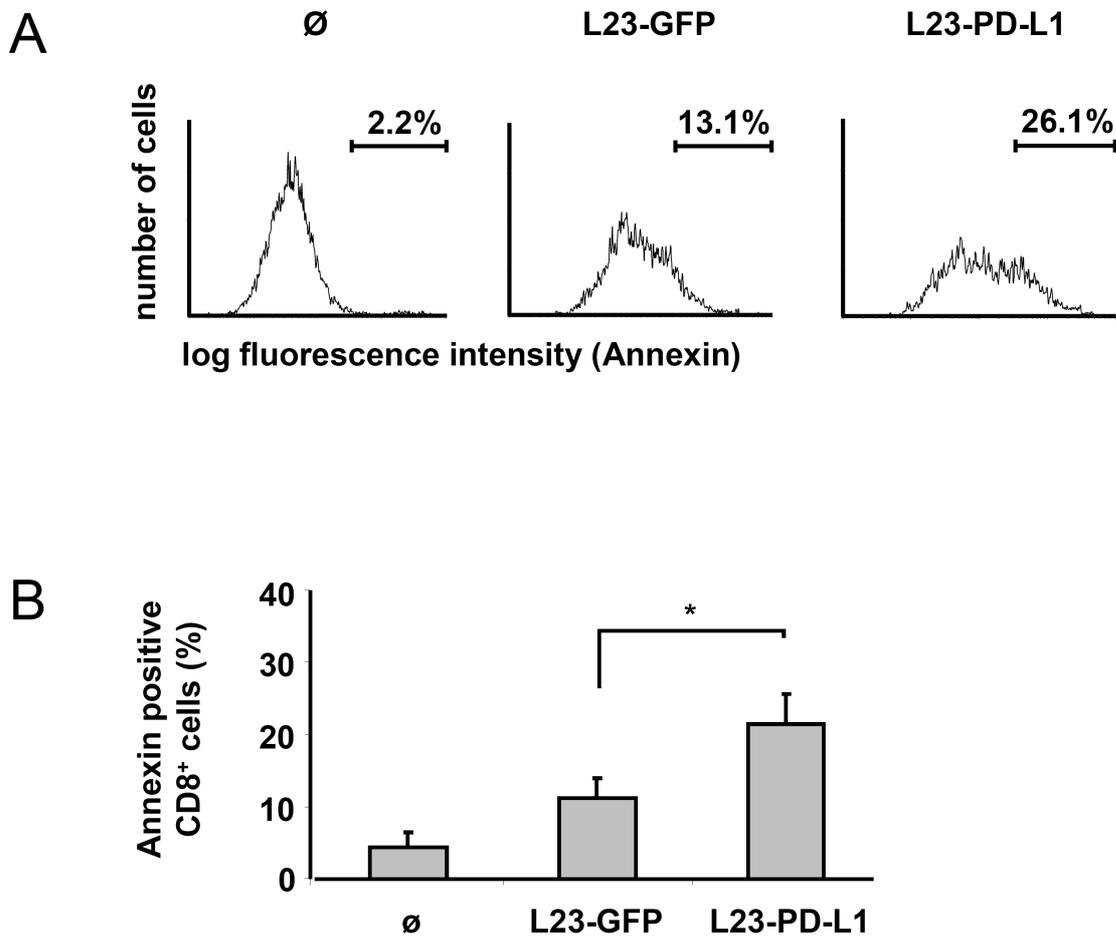
*Fig. 3.* Influence of PD-L1 expression on T- and NK-cell-mediated lysis of L23 cells.  $1 \times 10^4$   $^{51}\text{Cr}$ -labelled L23-GFP or L23-PD-L1 cells were used as targets and cultured with increasing numbers of effector cells. The amount of radioactivity released into the supernatant was determined after 4 hours by measuring an aliquot of 25  $\mu\text{l}$ . The percentage of specific lysis (mean  $\pm$  SD from triplicate cultures) was calculated as described in Materials and Methods. (A) Cytotoxicity of CD8<sup>+</sup> T cells. Effector cells were generated by culturing purified CD8<sup>+</sup> T cells for 4-5 days in medium containing 100 U/ml IL-2. A representative experiment out of a series of four is shown. (B) Cytotoxicity of IL-2 activated NK cells. CD56<sup>+</sup> cells were purified by electronic cell sorting, cultured for 4-5 days in medium containing 100 U/ml IL-2 and used as effector cells. Similar patterns of reactivity were observed using NK cells from three different blood donors.



*Fig. 4.* Flow cytometric analysis of PD-1 expression. Dark histograms represent fluorescence intensity obtained after staining of the cells with anti-PD-1-PE mAb, light histograms were obtained with staining buffer alone. (A) PD-1 expression on resting CD8<sup>+</sup> T cells and cells which had been activated by culturing for 4 days in medium containing 100 U/ml IL-2. (B) Analysis of 293-95L cells.



*Fig. 5.* PD-L1 expression does not influence cytotoxicity mediated by PD-1-negative 293-95L cells.  $1 \times 10^5$  293-95L cells were coincubated with  $1 \times 10^4$   $^{51}\text{Cr}$ -labeled L23-GFP or L23-PD-L1 cells. 293 cells transfected with empty vector (293-pcDNA) were used as negative controls showing no cytotoxicity on L23 targets. The amount of radioactivity released into the supernatant was determined after 4 hours by measuring an aliquot of 25  $\mu\text{l}$ . The percentage of specific lysis (mean  $\pm$  SD from triplicate cultures) was calculated. Similar results were observed in two additional experiments.



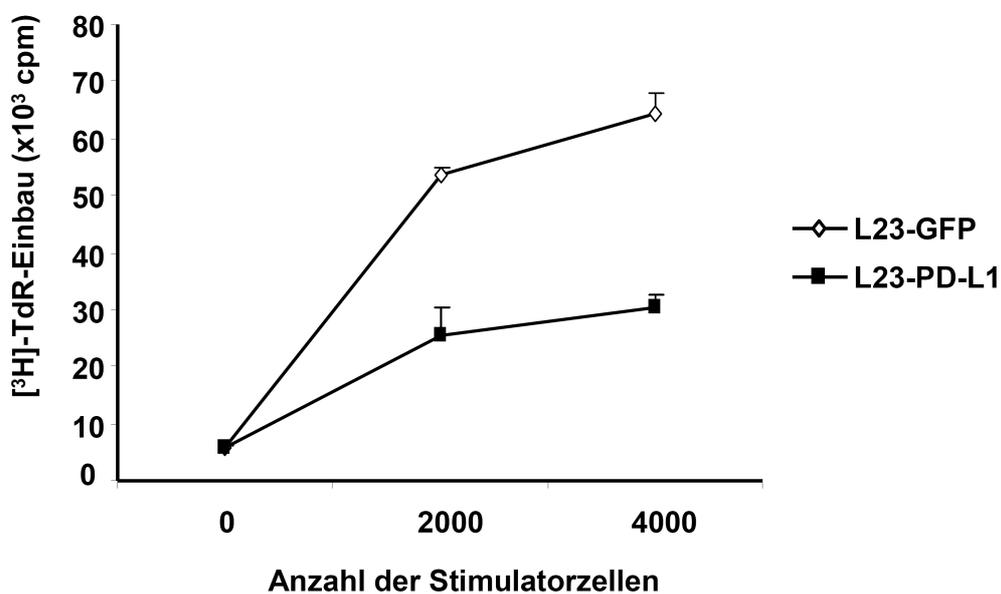
*Fig. 6.* L23-PD-L1 cells induce apoptosis in activated human CD8<sup>+</sup> T cells. Purified CD8<sup>+</sup> T cells were activated by stimulation for 6 days with irradiated L23-GFP cells. The cells were rested for 24 h and restimulated for 4 h with medium alone ( $\emptyset$ ), L23-GFP, or L23-PD-L1 cells. Apoptotic CD8<sup>+</sup> T cells were detected by Annexin-FITC binding. (A) Typical Annexin binding patterns obtained in a single experiment are shown. Numbers represent frequency (%) of Annexin-positive cells. (B) Determination of apoptotic cells from three independent experiments is presented. The mean frequency (%) of Annexin-positive cells  $\pm$  SD found in CD8 cultures is shown. \*  $p < 0.05$

### **C) Zusätzliche unveröffentlichte Daten**

PD-Ligand-1 exprimierende porcine zelluläre Xenotransplantate lösen eine verminderte Immunantwort in der Ratte aus

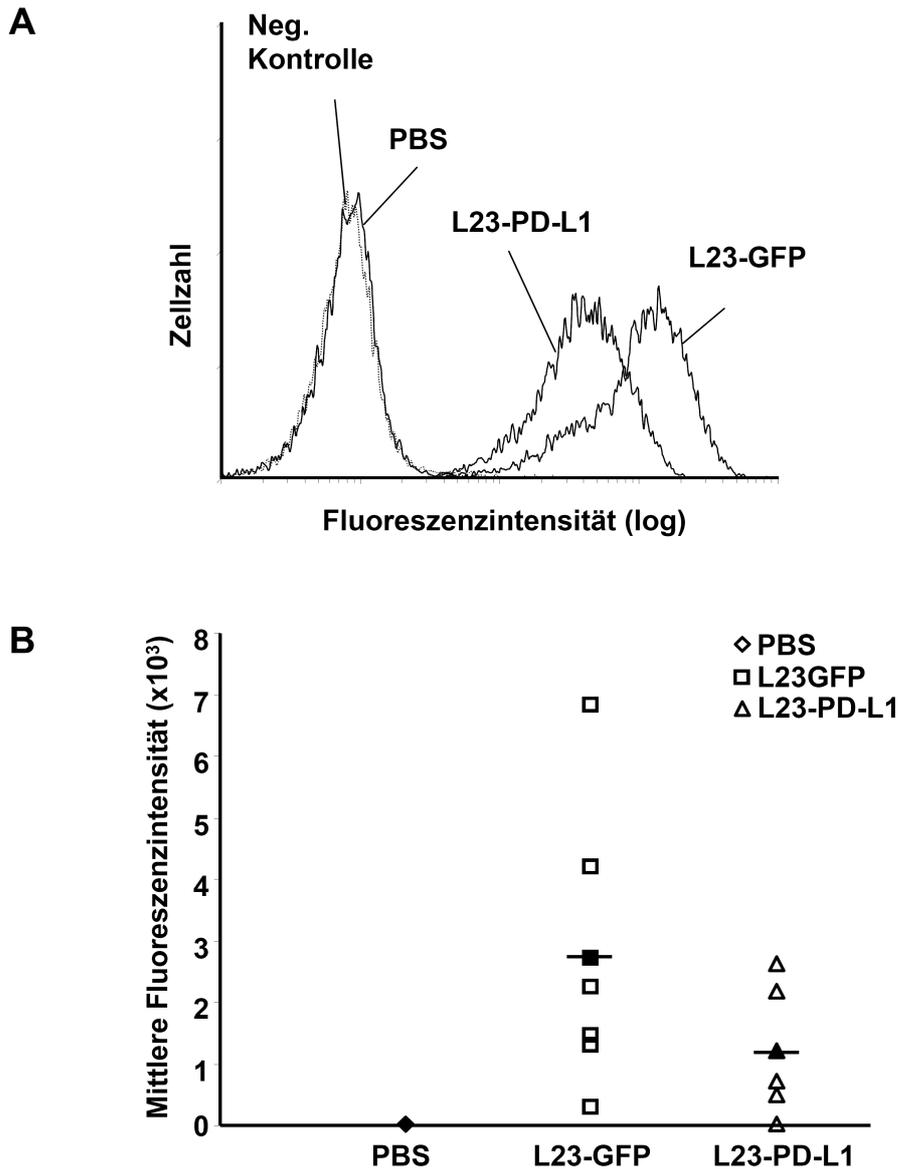
**Zur Veröffentlichung in einem weiteren Manuskript vorgesehen**

Wie in Anhang A und Anhang B beschrieben, führt die Überexpression von humanem PD-L1 auf porzinen Zellen zu einer verminderten *in vitro*-Reaktivität humaner T-Zellen. Ziel der weiteren Untersuchungen war es, diesen Ansatz auch *in vivo* zu prüfen. Hierzu wurde ein Modell für die Untersuchung von Ratten-Immunantworten gegen porzine zelluläre Transplantate etabliert und es wurde untersucht, ob PD-L1 auf L23-Zellen einen Schutz vor einer Abstoßung nach Transplantation vermitteln kann. Da die L23-PD-L1-Transfektanten humanes PD-L1 überexprimierten, musste zunächst geklärt werden, ob das humane PD-L1 funktionell mit dem PD-1-Rezeptor der Ratte interagieren kann. Dazu wurden Rattenlymphozyten *in vitro* mit L23-Kontroll-Zellen (L23-GFP) oder L23-PD-L1-Zellen stimuliert und die Proliferation der Rattenzellen wurde als Maß für deren Aktivierung bestimmt. L23-GFP-Zellen induzierten eine starke proliferative Antwort in Rattenlymphozyten (Abb. 1). Die proliferative Antwort der Rattenlymphozyten nach Stimulation mit L23-PD-L1-Zellen fiel hingegen deutlich geringer aus (Abb. 1). Dies deutet darauf hin, dass das humane PD-L1 Molekül an den PD-1-Rezeptor der Ratte binden kann und auch in der Lage ist, inhibitorische Signale in den Ratten-Lymphozyten zu vermitteln.



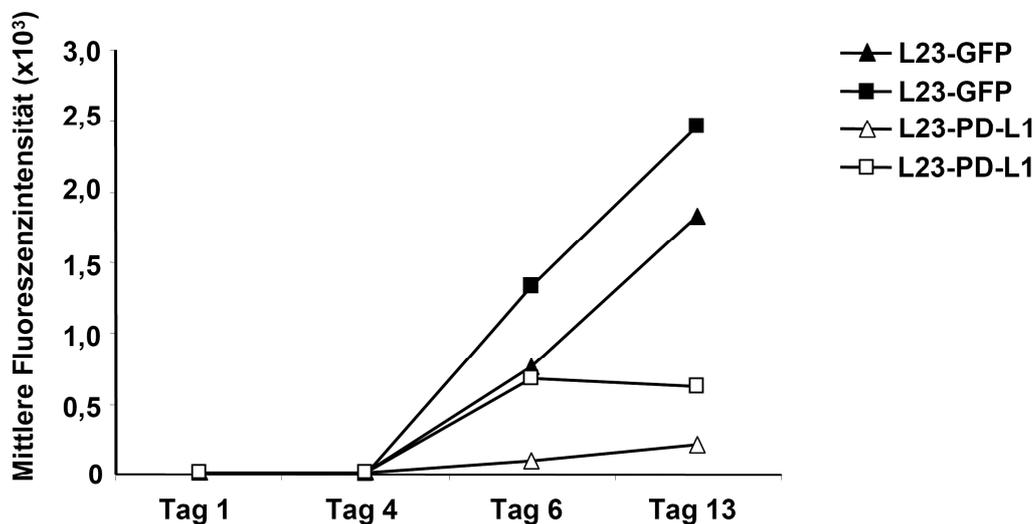
**Abbildung 1: Proliferation von Ratten-Lymphozyten nach Stimulation durch L23-GFP- oder L23-PD-L1-Transfektanten.**  $2 \times 10^5$  Ratten-Lymphknoten-Zellen wurden mit den angegebenen Zellzahlen von L23-GFP- und L23-PD-L1-Zellen für 5 Tage inkubiert. Die Proliferation der Ratten-Lymphknoten-Zellen wurde anhand des Einbaus von [<sup>3</sup>H]-Thymidin während weiterer 16 h bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus Dreifachansätzen. Vergleichbare Reaktionsmuster wurden in zwei weiteren Experimenten beobachtet.

Zur Analyse der *in vivo*-Wirkungen einer PD-L1-Expression wurden die L23-GFP- und L23-PD-L1-Zellen unter die Nierenkapsel von Ratten transplantiert. Die hierfür durchgeführten Tierversuche sind von der niedersächsischen Landesregierung laut Tierversuchsantrag Nr.08/1485 gemäß (§8) des deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt worden. Die L23-GFP und L23-PD-L1-Transfektanten wurden Lewis-Ratten unter die Nierenkapsel transplantiert. An Tag 3 nach Transplantation konnten L23-Zellen unter der Nierenkapsel mittels immunhistologischer Färbungen nachgewiesen werden. Allerdings wurden an Tag 7 weder L23-GFP noch L23-PD-L1-Zellen unter der Nierenkapsel von transplantierten Ratten gefunden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise verlassen die porzinen Zellen den Transplantationsort durch Migration oder es kommt zu einer immunologischen Abstoßung der porzinen Zellen. Um zu untersuchen ob eine Abstoßungsreaktion stattfindet, wurden Seren der Ratten nach Transplantation mittels Durchflusszytometrie auf Antikörper-Titer gegen L23-Zellen analysiert. Hierzu wurden L23-Zellen mit den Seren von transplantierten Ratten inkubiert und die Bindung von Antikörpern wurde durch einen markierten Sekundärantikörper nachgewiesen. An Tag 7 nach Transplantation mit L23-Transfektanten konnten anti-L23-Antikörper detektiert werden, wohingegen keine Antikörper in Seren der PBS-Kontrollgruppe nachgewiesen wurden (Abb. 2A). Eine weitere Analyse dieser Seren ergab, dass die Antikörper spezifisch gegen die porzinen Zellen gerichtet waren, da sie nur schwach mit humanen Zellen reagierten (Daten nicht gezeigt). Um eine erste Abschätzung der Konzentrationen der anti-L23-Antikörper in den Seren von Ratten, die mit L23-GFP oder L23-PD-L1-Transfektanten transplantiert wurden, zu erhalten, wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Färbungen verglichen (Abb. 2B). Hierbei zeigte sich die Tendenz, dass die Konzentration von anti-L23-Antikörpern in Seren von Ratten, die mit L23-GFP-Zellen transplantiert wurden, höher ausfällt als bei Tieren, die L23-PD-L1-Zellen erhielten (Abb. 2B).



**Abbildung 2: Induktion von Antikörpern gegen L23-Zellen in Ratten nach Transplantation von L23-Transfektanten unter die Nierenkapsel der Ratten.**  $3 \times 10^6$  L23-GFP-, L23-PD-L1-Transfektanten wurden Lewis-Ratten unter die Nierenkapsel transplantiert. Als Kontrolle wurde PBS ohne Zellen unter die Nierenkapsel injiziert. Nach 7 Tagen wurden die Tiere getötet und das Serum dieser Tiere wurde durchflusszytometrisch untersucht. Hierzu wurde das Serum (1:50 verdünnt) mit L23-Zellen inkubiert. Bindung von im Serum enthaltenen Antikörpern an L23-Zellen wurde durch einen PE-gekoppelten Sekundärantikörper, der gegen Ratten-Ig gerichtet war, nachgewiesen. *A*) Dargestellt ist ein Einzelexperiment. Die Negativkontrolle stellt die Färbung von L23-Zellen mit dem Sekundärantikörper alleine dar. *B*) In dieser Darstellung sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten, die bei der Austestung der Seren von 14 Ratten (3 x PBS Kontrolle, 6 x L23-GFP, 5 x L23-PD-L1) gemessen wurden, aufgeführt (nicht ausgefüllte Symbole). Die in den jeweiligen Gruppen berechneten Mittelwerte sind als ausgefüllte Symbole mit Strich dargestellt.

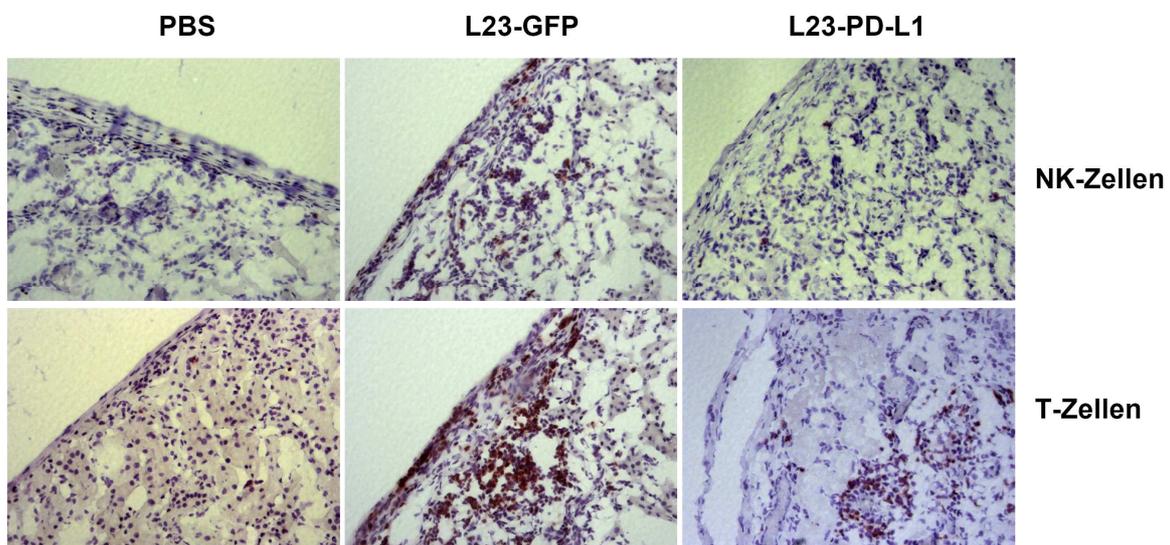
Die Kinetik der Antikörper-Bildung wurde nach intraperitonealer Applikation von L23-GFP-Zellen und L23-PD-L1-Zellen bei Ratten verfolgt. Die anti-L23-Antikörpertiter in den Tieren wurde wie oben beschrieben mittels Durchflusszytometrie verglichen. Auch bei diesen Experimenten, die bisher nur mit einer geringen Gruppenzahl von Ratten durchgeführt wurden, war zu beobachten, dass die L23-GFP-Zellen im Verlauf von 13 Tagen nach Applikation des Antigens eine stärkere Antikörperbildung gegen L23-Zellen bewirkten als L23-PD-L1-Zellen (Abb. 3). Zusammengefasst deuten also sowohl die Daten aus den Transplantationen der L23-Transfektanten unter die Nierenkapsel, wie auch die Daten der intraperitonealen Verabreichung der L23-Transfektanten auf eine inhibierende Wirkung von PD-L1 auf die Antikörperantwort in Ratten hin.



**Abbildung 3: Induktion von Antikörpern gegen L23-Zellen in Ratten nach intraperitonealer Applikation von L23-Transfektanten.**  $1 \times 10^7$  L23-GFP- oder L23-PD-L1-Transfektanten wurden jeweils zwei Lewis-Ratten intraperitoneal injiziert. Die Seren dieser Tiere wurde an Tag 1, 4, 6 und 13 nach Applikation der Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Hierzu wurde das Serum (1:10 verdünnt) mit L23-Zellen inkubiert. Die Bindung von im Serum enthaltenen Antikörpern an L23-Zellen wurde durch einen PE-gekoppelten Sekundärantikörper, der gegen Ratten-Ig gerichtet war, nachgewiesen. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Färbungen.

Zur Analyse der zellulären Immunantworten gegen die Xenotransplantate, wurde untersucht in welchem Umfang es nach der Transplantation der porzinen Zellen unter die Nierenkapsel zur Infiltration von Ratten-T-Zellen und -NK-Zellen in den Nierengewebe kommt. Hierzu wurden immunhistologische Färbungen zum Nachweis von NK-Zellen und T-Zellen durchgeführt. An Tag 7 wurden in Nieren, die mit L23-GFP-Transfektanten transplantiert

wurden, Infiltrate von NK-Zellen sowie starke Infiltrate von T-Zellen beobachtet (Abb. 4). In Nieren, die mit L23-PD-L1-Transfektanten transplantiert wurden, waren hingegen nur sehr schwache Infiltrate von NK-Zellen zu sehen und auch die Infiltrate der T-Zellen schienen vermindert (Abb. 4). Unterstützt werden die Daten von immunhistologischen Färbungen der Nieren an Tag 3. Hier wurden zwei Nieren von Ratten, die mit L23-GFP-Zellen transplantiert wurden, sowie die Niere einer Ratte, die mit L23-PD-L1-Zellen transplantiert wurde, analysiert. In den Nieren, die mit L23-GFP-Zellen transplantiert wurden, waren deutliche NK- und T-Zellinfiltrate zu sehen, wohingegen die Niere mit L23-PD-L1-Zellen weder Infiltrate von NK- noch von T-Zellen aufwies (Daten nicht gezeigt). Somit deuten die immunhistologischen Daten auf eine inhibierende Wirkung des PD-L1-Moleküls auf die T-Zell- bzw. NK-Zellaktivierung der Ratten hin.



**Abbildung 4: Infiltrate in Ratten-Nieren, bei denen L23-Transfektanten unter die Nierenkapsel transplantiert wurden.**  $3 \times 10^6$  L23-GFP- oder L23-PD-L1-Transfektanten wurden Lewis-Ratten unter die Nierenkapsel transplantiert. Als Kontrolle wurde PBS ohne Zellen unter die Nierenkapsel injiziert. Nach 7 Tagen wurden die Tiere getötet und die Nieren der Tiere entnommen und schockgefroren. Nachdem mittels des Kryostaten 5  $\mu$ m-Schnitte der Nieren angefertigt wurden, erfolgte deren Fixierung mit Aceton. Für den Nachweis der NK-Zellen und T-Zellen in den Nieren folgte dann eine Inkubation der Schnitte mit den Antikörpern W 3.2.3 (Ratten NK-Zellen) und R73 (Ratten T-Zellen). Die Bindung dieser Primär-Antikörper wurde durch eine weitere Inkubation mit einem gam-Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper, sowie der Zugabe des Substrates AEC, sichtbar gemacht. Zusätzlich erfolgte eine leichte Gegenfärbung mittels Hämalaun. Gezeigt sind repräsentative Schnitte aus Experimenten mit insgesamt 3 PBS-Kontroll-Tieren, 5 L23-GFP-Tieren sowie 5 L23-PD-L1-Tieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Expression von PD-L1 auf L23-Zellen zwar nicht die Abstoßung der Zellen verhindern kann, dass aber sowohl die Antikörperdaten, wie auch die immunhistologischen Färbungen der Infiltrate, darauf hin deuten, dass die Immunantwort der Ratten gegen die L23-Zellen durch PD-L1 vermindert ist. Es bleibt zu testen ob Zelltransplantate, die ein weniger starkes immunogenes Potential als porcine B-Zellen aufweisen, wie z. B. Inselzellen, durch die Expression von PD-L1 vor einer Abstoßung nach Xenotransplantation geschützt werden können.

## Manuskripte

Plege A., Borns K., Baars W., Schwinzer R.

(2009) Suppression of Human T-Cell Activation and Expansion of Regulatory T Cells by Pig Cells Overexpressing PD-Ligands  
Transplantation Apr 15; 87 (7)

Plege A., Borns K., Baars W., Klempnauer J., Schwinzer R.

(2009) Overexpression of human PD-Ligand-1 protects pig cells from lysis by human cytotoxic effector cells  
zur Publikation eingereicht

Bedke T., Lieke T., Plege A., Baars W., Schwinzer R.

(2009) Downregulation of human anti-pig T cell responses by monoclonal antibodies to pig CD45  
in Vorbereitung

## Publizierte Abstracts

Plege A., Borns K., Schwinzer R.

(2007) Strategies to prevent human anti-pig cellular immune responses.

*Xenotransplantation* 14:371

10<sup>th</sup> Minisymposium Xenotransplantation of the German Working Group  
Xenotransplantation, Berlin. (Vortrag)

Plege A., Borns K., Schwinzer R.

(2007) Downregulation of human anti-pig T cell responses by enhancement of negative costimulatory signals. *Xenotransplantation* 14:435

CTS-IPITA-IXA Joint Conference, Minneapolis. (Vortrag)

Plege A., Schwinzer R.

(2008) Xenotransplantation: immunological barriers and strategies to overcome them.

*Xenotransplantation* 15:296

11<sup>th</sup> Minisymposium Xenotransplantation of the German Working Group  
Xenotransplantation, Berlin. (Vortrag)

## Vorträge und Posterpräsentationen

Plege A., Borns K., Bedke T., Schwinzer R.

(2006) Costimulation of human T cells by porcine cell surface molecules: Role of pCD40 and pCD45.

4. Treffen des Arbeitskreises Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Regensburg. (Vortrag)

Plege A., Borns K., Schwinzer R.

(2007) Downregulation of human anti-pig T cell responses by enhancement of negative costimulatory signals.

5. Treffen des Arbeitskreises Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Leipzig. (Vortrag)

Plege A., Borns K., Schwinzer R.

(2007) Reduction of human anti-pig T cell responses by transgenic expression of human PD-L1 on pig cells.

37. Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg. (Vortrag)

Plege A., Borns K., Schwinzer R.

(2007) Inhibition of human anti-pig T cell reactivity by negative costimulatory signals.

16. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft, Mainz. (Vortrag)

Plege A., Borns K., Baars W.; Schwinzer R.

(2008) Stimulation of human CD4<sup>+</sup> T cells by pig cells over-expressing human PD-1 ligands results in decreased proliferation and the induction of regulatory T cells.

6. Treffen des Arbeitskreises Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Hannover. (Vortrag)

Plege A., Borns K., Ramackers W., Winkler M., Schwinzer R.

(2008) Expression patterns of the negative costimulatory molecules PD-L1 and PD-L2 in porcine cells and tissues.

22nd International Congress of The Transplantation Society, Sydney. (Poster)

Plege A., Borns K., Baars W., Schwinzer R.

(2008) Expansion of regulatory T cells by stimulation of human CD4<sup>+</sup> T cells with pig cells over-expressing PD-1 ligands.

Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies, Wien. (Poster)

Plege A., Borns K., Baars W., Schwinzer R.

(2008) Transgenic expression of human PD-L1, -L2 on pig cells downregulates human anti-pig T cell response and induces the expansion of regulatory T cells.

17. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft, Bochum (Vortrag)

Plege A., Borns K., Baars W.; Schwinzer R.

(2009) Pig cells overexpressing human Programmed Death-(PD)-Ligand-1 induce diminished human CD4<sup>+</sup> T cell responses and are protected from lysis by CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells.

ESOT & TTS Basic Science Symposium, Brüssel (Vortrag)

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

<b>Name</b>	Annegret Plege
<b>Geburtstag</b>	30.03.1981
<b>Geburtsort</b>	Clausthal-Zellerfeld
<b>Familienstand</b>	ledig

### Schulausbildung

---

<b>Juni 2000</b>	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife auf dem Gymnasium Überlingen (Note: 1,7)
------------------	--

### Hochschulstudium

---

<b>Oktober 2000 - Dezember 2005</b>	Studium der Biologie an der Universität Hannover Diplomarbeit zu dem Thema: „Rolle von kostimulatorischen Rezeptor-Ligand-Interaktionen bei der Reaktivität humaner T-Zellen gegen porzines Xenoantigen“ im Transplantationslabor der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. R. Schwinzer Note Diplomprüfung: sehr gut
---	---

### Promotion

---

<b>seit Januar 2006</b>	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Transplantationslabor der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie der MHH mit dem Ziel der Promotion
-------------------------	--

### Preise und Stipendien:

- Reisestipendium im Rahmen der 17. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft (2008)
- Young Investigator Travel Award im Rahmen des ESOT & TTS Basic Science Symposiums (2009)

### **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. R. Schwinzer möchte ich ganz herzlich für die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit danken. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und viele hilfreiche Denkanstöße haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die Bereitstellung des gut ausgestatteten Arbeitsplatzes in dem von ihm geleiteten Transplantationslabor bedanken. Bei Herrn Prof. Dr. R. Jacobs bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats. Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Transplantationslabors für die gute Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft. Besonders bedanken möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei Claudia Pokoyski und bei Thorsten Lieke, ohne den die Tierversuche nicht möglich gewesen wären. Ganz herzlich danke ich auch Katja Borns, Wiebke Baars und Dorothee Römermann, die mich bei der praktischen Arbeit unterstützt haben. Außerdem gilt mein Dank meiner Familie und meinem Freund Christian für die Unterstützung und die Motivation in den letzten Jahren.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Transregio-Forschergruppe „Xenotransplantation“ gefördert (FOR 535).

**Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, und diese Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet habe.

Hannover, im April 2009

Annegret Plege