

DISS. ETH No. 15116

**Specific Cytotoxic T cell Unresponsiveness Due to
Donor Cell Chimerism
and
Contributions of the Orphan Receptor T1/ST2 and of
Promyelocytic Leukemia Protein to Antiviral Immunity**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology
Zurich, Switzerland

For the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by Weldi Bonilla
Dipl. Natw. ETH, born May 19th, 1972
Citizen of Schlieren (Zurich)

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. Hengartner, examiner
Prof. Dr. R. M. Zinkernagel, co-examiner

2003

Reprint: J. Virol. (2002), 76 (8): 3810

Summary

Chapters I and II address the role of donor cell chimerism in specific cytotoxic T cell (CTL) unresponsiveness. This is observed after engraftment of allogeneic cells in early fetal or neonatal life and after successful adult organ transplantation where maintenance of a stable lymphohematopoietic chimerism correlates with organ acceptance. Adoptive transfer of male splenocytes into female recipients (H-Y antigen) or male cells transgenically (H8) expressing a CTL epitope (GP33) derived from the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) were performed in chapter I to obtain transient donor cell chimerism. i) The number of donor cells transferred, ii) the longevity of transferred cells modulated via irradiation or transgenic expression of a survival gene (BCL-2) and iii) reduced host immunocompetence upon cytoablation by irradiation correlated positively with CTL unresponsiveness. CTL priming was only seen after rejection of the transferred cells to below detectable levels. For induction of CTL unresponsiveness the intravenous route was superior to intraperitoneal or even subcutaneous cell transfer.

Adoptive transfer of H8 splenocytes into sex-matched recipients was performed in chapter II to create a life long chimerism with concomitant GP33 specific CTL unresponsiveness. Upon extrinsic termination of H8 chimerism by two independent experimental approaches, GP33 specific CTL responsiveness was restored in a time and thymus dependent fashion reminiscent of thymic *de novo* generation of naïve lymphocytes in an irradiated host. These results indicated that donor cell-specific CD8⁺ T cells undergo peripheral clonal deletion at the encounter of overwhelming numbers of donor cells, excluding an antigen independent, dominant negative mechanism of tolerance. Thus, donor cell chimerism acts to induce and maintain life-long CTL unresponsiveness.

In chapter III, we investigated the role of the orphan receptor T1/ST2 on antiviral T cell responses. We found novel and CD4⁺ T cell independent effects on CTL responses while this protein is commonly associated with Th1/Th2 differentiation. LCMV infected T1/ST2^{-/-} mice generated 30-fold reduced primary *ex vivo* cytotoxic T cell (CTL) activity and considerably reduced numbers of LCMV-specific effector CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes despite normal LCMV propagation. This resulted in reduced susceptibility to virus-induced immunopathologic disease and to delayed

clearance of high LCMV doses. Normal CTL responses against allogeneic cells and against vesicular stomatitis virus (VSV) or vaccinia virus infections rendered a general CD8⁺ T cell defect unlikely and residual LCMV specific CTL activity in T1/ST2 deficient mice was at least partially responsible for virus control. Blockade of a putative T1/ST2 ligand by transgenic expression of a soluble T1/ST2 fusion protein resulted in the same CTL phenotype. Hence the present data suggest a very specific, yet unknown role for the interaction of T1/ST2 with a putative ligand in T cell controlled viral infections like LCMV.

The cellular promyelocytic leukemia protein (PML) reduces propagation of some viruses in cell culture. It was also found to associate intracellularly with proteins from several viruses. In chapter IV we examined the role of PML *in vivo* by comparing immune responses and virus loads of PML deficient and control mice infected with LCMV and VSV. PML^{-/-} mice exhibited accelerated primary footpad swelling reactions to very low dose LCMV, higher swelling peaks upon high dose inoculation and higher viral loads in the early phase of systemic LCMV infection. Lethal LCMV induced T cell mediated hepatitis and choriomeningitis required 10-100 times lower inocula despite normal CTL reactivity in PML^{-/-} mice. Accordingly, ten times lower VSV inocula elicited specific neutralizing antibody responses; a replication-based effect not observed with inactivated virus or after immunization with recombinant VSV glycoprotein. These *in vivo* observations corroborated our *in vitro* results of increased virus production in PML^{-/-} fibroblasts. Thus PML is as a contributor to innate immunity defining host susceptibility to viral infections and to immunopathology.

Zusammenfassung

Die Kapitel I und II befassen sich mit der Bedeutung von zirkulierenden Donorzellen für Spender spezifische cytotoxische T-Zell (CTL) Unreaktivität. Beides sind gängige Befunde bei fetal oder neonatal induziertem Chimerismus ebenso wie bei erfolgreicher adulter Organtransplantation. In Kapitel I, adoptiver Transfer von entweder syngenen männlichen Zellen (sogenanntes H-Y Antigen) oder von männlichen Zellen, die zusätzlich ein Transgen-kodiertes (H8) CTL Epitop des Glycoproteins (GP33) vom Lymphocytären Choriomeningitis Virus (LCMV) exprimieren, resultierte in einem nur transienten Chimerismus weiblicher Rezipienten. i) Die Anzahl transferierter Zellen, ii) deren mittels Bestrahlung oder durch transgene Expression des Überlebens-Gens BCL-2 modulierte Langlebigkeit und iii) reduzierte immunologische Kompetenz des Rezipienten nach cytoablativer Bestrahlung wiesen eine positive Korrelation mit spezifischer CTL Unreaktivität auf. Induktion spezifischer CTLs wurde erst dann erkennbar, wenn kein Persistieren von Spenderzellen mehr nachweisbar war. Intravenöse, intraperitoneale und subcutane Applikation von Spenderzellen ergab eine in der aufgeführten Reihenfolge abnehmende Fähigkeit spezifische CTL Unreaktivität zu induzieren.

In Kapitel II wurde mittels adoptivem Transfer von H8 Milzzellen ein lebenslanger Chimerismus gleichgeschlechtlicher Empfänger induziert, der von GP33 spezifischer CTL Unreaktivität begleitet war. Experimentell konnte dieser Chimerismus mittels zweier unterschiedlicher technischer Ansätze beendet werden, sodass nach einiger Zeit neue GP33 spezifische T-Zellen erschienen. Dies geschah aber nur, wenn die Mäuse nicht vorgängig thymektomiert worden waren, ähnlich der Thymus-abhängigen *de novo* Maturation von naiven T-Zellen nach lymphoablativer Bestrahlung. Diese Ergebnisse zeigen, dass spezifische CD8⁺ T-Zellen beim Zusammentreffen mit überwältigenden Zahlen von Spenderzellen peripher klonal deletiert werden. Somit repräsentiert das Persistieren von Spenderzellen ein effizienter Mechanismus zur Induktion und Aufrechterhaltung spezifischer CTL Unreaktivität.

Kapitel III erläutert die Bedeutung des Rezeptors T1/ST2 mit bislang unbekanntem Ligand für antivirale T-Zell Antworten. Diese Protein verfügt über eine gut dokumentierte Rolle in der Th1/Th2 Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen, wir zeigen

hingegen neuartige und CD4⁺ T-Zell unabhängige Funktionen für die Generierung einer CTL Antwort. LCMV infizierte T1/ST2^{-/-} Mäuse zeigten 30-fach reduzierte primäre cytotoxische Aktivität und beträchtlich reduzierte Populationen CD4⁺ und CD8⁺ LCMV spezifischer Effektorzellen. Damit verbunden war eine deutlich reduzierte Anfälligkeit auf Virus-induzierte Immunpathologie, zusammen mit verspäteter Elimination hoher LCMV Inokula. Normale CTL Antworten gegen allogene Zellen sowie gegen die Infektionen mit Vesikulärem Stomatitis Virus (VSV) und Vaccinia Virus zeigten jedoch keinen allgemeinen CD8⁺ T-Zell Defekt. Ebenso war die Kontrolle der LCMV Infektion mindestens teilweise von restlicher CTL Aktivität abhängig. Transgene Expression eines solublen T1/ST2 Fusionsproteins zur Konkurrenz und Blockade einer hypothetischen T1/ST2 Interaktion ergab denselben CTL Phänotyp. Somit scheint die Interaktion von T1/ST2 mit einem noch unbekanntem Bindungspartner eine wichtige Rolle in der T-Zell medierten Kontrolle von Virusinfektionen wie LCMV zu spielen.

Das zelluläre Promyelozytische Leukämie Protein (PML) inhibiert die Propagation einiger Viren in Zellkultur. Ebenso assoziiert es sich intrazellulär mit Proteinen verschiedener Viren. In Kapitel IV wird die Funktion von PML *in vivo* an Hand von Immunantwort und immunologischer Kontrolle von LCMV und VSV Infektion in PML defizienten und kompetenten Mäusen analysiert. PML^{-/-} Mäuse zeigten eine beschleunigt auftretende Schwellung der Fußsohle nach Infektion mit tiefen LCMV Dosen, verstärkte maximale Schwellungswerte nach hohen Inokulationsdosen und höhere Virämie in der Frühphase einer systemischen LCMV Infektion. Letale, T-Zell medierte LCMV-Hepatitis und -Choriomeningitis traten bereits bei 10-100-fach tieferen Virusdosen auf, dies trotz normaler Funktion zytotoxischer T-Zellen. Ebenso führten bereits 10-fach tiefere VSV Dosen zu einer spezifischen neutralisierenden Antikörperantwort. Letzterer Effekt war abhängig von viraler Replikation. Daher traten nach Immunisierung mit inaktiviertem Virus oder rekombinantem VSV-Glykoprotein keine Unterschiede auf. PML^{-/-} Fibroblasten produzierten *in vitro* mehr infektiöses VSV und LCMV, was obige Schlussfolgerung unterstützt. Somit stellt PML einen Faktor unspezifischer Immunität dar, welcher für die Anfälligkeit eines Wirtes auf virale Erkrankung und viral induzierte Immunpathologie mitverantwortlich ist.