

DISS. ETH NO. 24149

## **T help in the setting of a persistent viral infection**

A thesis submitted to attain the degree of

**DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH**  
**(Dr. sc. ETH Zurich)**

presented by

**Ute Greczmiel**

MSc. Biology, TU München,

born on 24.05.1987

citizen of Germany

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Annette Oxenius (examiner)

Prof. Dr. Manfred Kopf (co-examiner)

Prof. Dr. Sai Reddy (co-examiner)

Zürich, 2017

## Summary

Persistent infections with the murine non-cytopathic Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) have proven instrumental to study immune responses and their regulation upon persistent viral infections and have yielded important basic insights also pertinent to human non-or poorly cytopathic viral infections with Human Immunodeficiency virus (HIV), Hepatitis B virus (HBV) or Hepatitis C virus (HCV). Upon persistent infection with non-or poorly cytopathic viruses, CD8 T cell as well as Th1 CD4 T cell responses undergo physical and functional impairment, collectively termed T cell exhaustion. Interestingly, however, CD4 T cell differentiation is increasingly skewed to T follicular helper (T<sub>FH</sub>) cells throughout persistent viral infection. T<sub>FH</sub> cells are the main regulators of T-help dependent B cell responses, thereby influencing B cell differentiation as well as induction and maintenance of the Germinal Center (GC) response. This implicates an important role of the humoral immune response in control of such persistent viral infections. Especially virus-neutralizing antibodies were shown to be particularly capable of containing viral spread and thereby expediting viral control. However, neutralizing antibodies appear only late upon persistent infection with non-or poorly cytopathic viruses. Furthermore, B cell dysregulations including hypergammaglobulinemia and polyclonal B cell activation occur during such infections, resulting in the production of virus-unspecific antibodies with concomitant impairment of virus-specific humoral immunity and contributing to the delayed emergence of virus-neutralizing antibodies. In addition, persistent non-or poorly cytopathic RNA viruses undergo constant evolution during infection, which often results in escape from virus-specific adaptive immunity.

The aim of this study was to elucidate the long-term function of T<sub>FH</sub> cells and other virus-specific CD4 T cells in the regulation of the virus-specific antibody response and determining the overall regulation of polyclonal B cell activation in the setting of a persistent LCMV infection.

Previous studies showed that constitutive ablation of T<sub>FH</sub> cells abrogated LCMV-specific antibody responses entirely and impaired viral control. However, it is unclear how long T<sub>FH</sub> cells need to be present during persistent viral infections to induce protective virus-specific antibody responses or whether non-T<sub>FH</sub> LCMV-specific CD4 T cells might be capable of taking over some B helper functions once the antibody response has been established. To address these questions, we employed a novel *in vivo* experimental model that allows conditional depletion of CXCR5<sup>+/+</sup> T<sub>FH</sub> cells or total LCMV-specific CD4 T cells at any time point of the persistent LCMV infection. Depletion of these subsets after the initial establishment of the LCMV-specific IgG response revealed that LCMV-specific CXCR5<sup>-/-</sup> CD4 T cells are capable to enter the GC and support the overall maintenance of LCMV-specific IgG titers in serum in absence of CXCR5<sup>+/+</sup> T<sub>FH</sub> cells. However, LCMV-specific CXCR5<sup>-/-</sup> CD4 T cells were qualitatively not comparable to CXCR5<sup>+/+</sup> T<sub>FH</sub> cells, as emergence of protective LCMV-neutralizing antibodies was

dependent on continued presence and activity of CXCR5<sup>+/+</sup> T<sub>FH</sub> cells. Moreover, neutralizing antibodies, and thereby CXCR5<sup>+/+</sup> T<sub>FH</sub> cell, proved to be essential for eventual control of the viral infection.

In addition, T<sub>FH</sub> cells have been implicated in the polyclonal B cell activation and induction of hypergammaglobulinemia upon persistent viral infections. However, the exact kinetics of the LCMV-unspecific B cell response and whether this response is induced in the follicle or at extrafollicular sites is unclear. To address these questions, we studied the antibody response against 2,4-dinitrophenol (DNP)-Ovalbumin and determined the fate of DNP-Ovalbumin-specific B cells in the context of a persistent LCMV infection. We discovered that the induction of the DNP-Ovalbumin-specific B cell response seems to take place predominantly at extrafollicular patches and is rather short-lived. Further, the LCMV-unspecific B cell response is elicited independently of CXCR5<sup>+/+</sup> T<sub>FH</sub> cells, as conditional depletion of these cells did not ablate or alter the emergence of DNP-Ovalbumin-specific antibodies. Surprisingly, however, the induction of LCMV-unspecific B cell responses was entirely dependent on the CD4 T cell response against the immunodominant epitope gp61-81. Ablation of this response impaired polyclonal B cell activation and consequently improved LCMV-specific antibody responses and viral control. However, the frequencies and total numbers of CXCR5<sup>+/+</sup> T<sub>FH</sub> cells were unaltered by this reduced CD4 T cell activation, substantiating that CXCR5<sup>+/+</sup> T<sub>FH</sub> cells were not involved in the induction of polyclonal B cell responses.

In summary, we were able to elucidate the long-term functions of T<sub>FH</sub> cells and non-T<sub>FH</sub> LCMV-specific CD4 T cells in the setting of a persistent viral infection in great detail. CXCR5<sup>+/+</sup> T<sub>FH</sub> cells proved to be essential for the induction of LCMV-neutralizing antibody responses and therefore eventual viral control. Nevertheless, LCMV-specific CXCR5<sup>-/-</sup> CD4 T cells were capable of taking over some B helper functions and thereby ensure the maintenance of the LCMV-specific binding antibody response. However, LCMV-specific CD4 T cells recognizing the gp61-81 epitope, but without T<sub>FH</sub> cell characteristics, were also responsible for the induction of the short-lived, extrafollicular LCMV-unspecific polyclonal B cell response. This response significantly hampered LCMV-specific antibody responses and eventual viral control.

## Zusammenfassung

Das murine nicht-zytotoxische Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) ist ein gut charakterisiertes Modell für persistente Virusinfektionen und hat in den letzten Jahrzehnten wichtige Erkenntnisse geliefert über die Regulation der adaptiven Immunität in persistenten viralen Infektionen, die sich auch übertragen liessen auf humane Infektionen wie z.B. Infektionen mit dem Humanem Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis B Virus (HBV) oder Hepatitis C Virus (HCV). Bei persistenten Virusinfektionen mit nicht-zytotoxischen Viren kommt es zu einer Herrunterregulierung

(„Erschöpfung“) der virus-spezifischen adaptiven Immunantwort. Besonders CD8 T Zellen sind numerisch und funktionell eingeschränkt, aber auch die Funktion der Th1 CD4 Helferzellen ist verändert. CD4 T Helferzellen differenzieren jedoch während solcher persistenten Virusinfektionen vermehrt zu T folliculären Helferzellen ( $T_{FH}$  Zellen). Diese übernehmen Hilfsfunktionen bei der Produktion von Virus-spezifischen Antikörperantworten und bestimmen deren Affinitätsreifung. Dies ist insofern interessant, als neutralisierende Antikörper, welche die Infektion von Zielzellen verhindern können, zur Erniedrigung der Viruslast beitragen und letztendlich ein erfolgreiches Bekämpfen der Virusinfektion ermöglichen. Allerdings werden diese neutralisierenden Antikörper erst spät während einer persistenten Virusinfektion mit nicht-zytopathischen Viren produziert. Ein möglicher Einfluss auf diese verzögerte Produktion von neutralisierenden Antikörpern ist die polyklonale B Zellaktivierung, welche zu der Produktion von Virus-unspezifischen Antikörpern und Hypergammaglobulinemie beitragen. Ausserdem verändern sich RNA Viren fortlaufend während der persistenten Virusinfektion um der adaptiven Immunantwort zu entgehen.

Ziel unserer Studie war es nun die Langzeitfunktion von  $T_{FH}$  Zellen und anderen Virus-spezifischen CD4 Helferzellen in Bezug auf die Produktion von Virus-spezifischen Antikörpern und der Regulation der polyklonalen B Zellaktivierung im Rahmen einer persistenten LCMV Infektion zu untersuchen.

In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass  $T_{FH}$  Zellen essentiell für die Induktion einer LCMV-spezifischen Antikörperantwort sind. Allerdings wurde bisher nicht gezeigt, wie lange solche  $T_{FH}$  Zellen letztlich präsent bzw. funktional sein müssen, um die Antikörperproduktion zu regulieren bzw. ob auch andere LCMV-spezifischen CD4 T Helferzellen B Zellhelferfunktionen übernehmen können, sobald die LCMV-spezifische Antikörperantwort etabliert wurde. Um diese Fragestellung zu beantworten, haben wir ein neues *in vivo* Model verwendet, welches die konditionale Depletion von  $CXCR5^{+/+}$   $T_{FH}$  Zellen und aller LCMV-spezifischen CD4 T Helferzellen nach der Etablierung der LCMV-spezifischen IgG Antikörperantwort erlaubt. Dabei zeigte sich, dass LCMV-spezifische  $CXCR5^{-/-}$  CD4 T Zellen in Abwesenheit von  $CXCR5^{+/+}$   $T_{FH}$  Zellen durchaus in der Lage waren die bindende LCMV-spezifische Antikörperantwort aufrechtzuerhalten. Jedoch, waren diese Zellen nicht in der Lage, die Produktion von LCMV-neutralisierenden Antikörpern zu induzieren, dieser Vorgang war abhängig von der kontinuierlichen Anwesenheit und Aktivität von  $CXCR5^{+/+}$   $T_{FH}$  Zellen. Des Weiteren war die Präsenz von LCMV-neutralisierenden Antikörpern, und damit auch von  $CXCR5^{+/+}$   $T_{FH}$  Zellen, für die Kontrolle der Virusinfektion essentiell.

$T_{FH}$  Zellen werden ausserdem mit der Induktion der polyklonalen B Zellaktivierung, die während vieler persistenten Virusinfektionen mit nicht-zytopathischen Viren beobachtet werden kann, in Verbindung gebracht. Die genaue Aktivierungskinetik von Virus-unspezifischen B Zellen ist bis anhin ungeklärt, sowie ob sie einem folliculären oder einem extrafolliculären Entwicklungspfad folgen. Um diese Fragestellungen, sowie die Rolle von  $T_{FH}$  Zellen oder nicht- $T_{FH}$  LCMV-spezifischen CD4 T Helferzellen

während einer persistenten LCMV Infektion zu beantworten, haben wir die Antikörperantwort gegen ein Modellantigen, das Hapten 2,4-Dinitrophenol gekoppelt mit Ovalbumin (DNP-Ovalbumin), sowie das Schicksal der DNP-Ovalbumin-spezifischen B Zellen genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Aktivierung der DNP-Ovalbumin-spezifischen B Zellen früh nach der Infektion mit LCMV stattfand und die Zellen einem extrafollikulären Entwicklungspfad zu folgen schienen, da die meisten DNP-Ovalbumin-spezifischen B Zellen in kurzlebige Plasmazellen differenzierten. Des Weiteren schienen CXCR5<sup>+/+</sup> T<sub>FH</sub> Zellen für die Induktion solcher B Zelldysregulationen keine Rolle zu spielen, da konditionale Depletion dieser Zellen von Beginn der persistenten LCMV-Infektion an keinen Einfluss auf die Stärke der DNP-Ovalbumin-spezifischen Antikörperantwort hatte. Allerdings, waren CD4 T Helferzellen, welche spezifisch für das immundominante Epitop gp61-81 sind, involviert in die Aktivierung LCMV-unspezifischer B Zellen. Ablation der gp61-81-spezifischen CD4 T Helferzellantwort, und damit drastische Reduktion der CD4 T Helferzellantwort, unterband das Auftreten von DNP-Ovalbumin-spezifischen Antikörpern und verbesserte gleichzeitig die LCMV-spezifische Antikörperantwort und auch die Kontrolle der Virusinfektion. Gleichzeitig waren die Frequenz und die Anzahl von CXCR5<sup>+/+</sup> T<sub>FH</sub> Zellen durch die Ablation der gp61-81-spezifischen CD4 T Helferzellantwort nicht beeinflusst.

Zusammengefasst haben wir während dieser Studie die Rolle und Funktion von T<sub>FH</sub>Zellen und nicht-T<sub>FH</sub> LCMV-spezifischen CD4 T Zellen differenzierter auflösen können. Kontinuierliche Aktivität von CXCR5<sup>+/+</sup> T<sub>FH</sub> Zellen während einer persistenten LCMV Infektion ist essentiell für die Induktion von protektiven, LCMV-neutralisierenden Antikörperantworten und damit für die Kontrolle der Virusinfektion. Jedoch können nicht-T<sub>FH</sub> LCMV-spezifische CD4 T Helferzellen B Helferfunktionen übernehmen und so die Aufrechterhaltung der bindenden LCMV-spezifischen Antikörperantwort gewährleisten. Allerdings sind LCMV-spezifische CD4 T Helferzellen, wahrscheinlich ohne T<sub>FH</sub> Zellphänotyp, auch für die kurzlebige Aktivierung von LCMV-unspezifischen B Zellen verantwortlich, welche LCMV-spezifische Antikörperantworten sowie die Induktion von LCMV-neutralisierenden Antikörpern behindert.