
DISS. ETH NO. 21477

**Mechanisms Contributing to Chronic Immune Activation
During HIV-1 Infection**

**A dissertation submitted to the
ETH Zürich**

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

SONIA LILIANA BASTIDAS PATIÑO

MSc in Molecular Bioengineering, TU Dresden

born February 22, 1983

in Bogota, Colombia

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Annette Oxenius (examiner)

Prof. Dr. Alexandra Trkola (co-examiner)

Prof. Dr. Manfred Kopf (co-examiner)

Prof. Dr. David Price (co-examiner)

ZÜRICH, 2013

1.1. English summary

Untreated HIV-1 infection is associated with a state of chronic immune activation of T cells and CD4⁺ T cell depletion; however, their causal relation is poorly defined. Aberrant immune activation is not restricted to CD4⁺ T cells and in fact the extent of CD8⁺ T cell activation is far more pronounced compared to CD4⁺ T cells and the level of chronic immune activation in CD8⁺ T cells is a better prognostic indicator of disease progression than the extent of CD4⁺ T cell activation. While the effects of chronic activation are evident and measurable *in vivo*, the mechanisms by which HIV-1 induces this systemic activation remain unclear. Furthermore, it is unclear whether those activated CD8⁺ T cells are biased with respect to their antigen specificities and how these might be activated *in vivo* in the setting of HIV-1 infection.

Our results reveal that CD8⁺ T cells, in contrast to CD4⁺ T cells, become activated irrespective of their antigen specificity during HIV-1 rebound, suggesting TCR-independent CD8⁺ T cell activation. So far the relevance of TCR-independent T cell activation in chronic HIV-1 infection, involving cytokine stimulation or engagement of pattern recognition receptors (PRRs), is not known, but it is possible that the increased levels of pro-inflammatory cytokines present during untreated HIV-1 infection and the increased levels of systemic microbial translocation have a significant impact on the induction of T cell hyperactivation and consequently contribute to disease progression. Supporting this theory, we found that IL-15; a cytokine that has been shown to be elevated during untreated HIV-1 infection, selectively activates CD8⁺ T cells but not CD4⁺ T cells. Importantly, DCs that have been stimulated with LPS or HIV-1, a milieu that mimics the environment present in HIV-1 infected individuals, activated CD8⁺ T cells in an antigen-independent but IL-15 dependent manner. Furthermore, mDCs from HIV-1 infected patients with active HIV-1 replication produced higher amounts of IL-15 compared to mDCs isolated from the same patients when successfully treated with ART, supporting our *in vitro* results. Based on our data we propose that memory CD8⁺ T cells are efficiently activated by IL-15 and independently of antigen-specificity during untreated HIV-1 infection and that LPS and / or HIV-1 activated DCs are a relevant source of this cytokine. These results may offer an explanation for a link between the generally increased inflammatory milieu during untreated HIV-1 infection and activation of

non HIV-1-specific T cells and moreover for the fact that substantially more CD8⁺ T cells exhibit an activated phenotype compared to CD4⁺ T cells.

HIV-1 infection is tightly linked to the gastrointestinal tract, which serves as a major site of viral replication, in particular during early stages of HIV-1 infection. HIV-1 associated enteropathy is associated with gastrointestinal tract inflammation, increased intestinal permeability and translocation of microbial products. So far there is no data available whether increased exposure to gut microbial antigens results in increased frequencies of CD4⁺ T cells with specificity for gut microbial antigens. It is conceivable that activated CD4⁺ T cells with specificity for gut microbial antigens contribute to the "general" immune activation observed in HIV-1 infected individuals. To test this hypothesis we established an analysis method which allows the quantification of gut microbiota-specific T cell responses in blood samples, by measuring the frequency of cytokine secreting CD4⁺ T cells after stimulation with a selection of sonicated commensal microorganisms. We established and validated this method using blood samples from healthy individuals and from IBD patients. We observed that IBD patients had higher frequencies of cytokine producing CD4⁺ T cells compared to healthy donors. Our results support the specificity of this assay and suggest further application for HIV-1 infected individuals.

In summary, this thesis gained new insights into different and distinct aspects related to HIV-1 pathogenesis and chronic immune activation and provides new cues about the underlying mechanisms.

1.2. German summary

Hauptmerkmale einer unbehandelten HIV-1 Infektion ist die chronische Aktivierung von T-Zellen, sowie eine graduelle Abnahme von CD4⁺ T Zellen. Die Zusammenhänge der Aktivierung von T-Zellen und der Abnahme von CD4⁺ T Zellen sind nur wenig erforscht. Die beobachtete abnormale Immunaktivierung ist nicht nur auf CD4⁺ T Zellen beschränkt, sondern kann sogar deutlicher an Hand des Aktivierungsstatus der CD8⁺ T Zellen verfolgt werden. Das Ausmass der Aktivierung der CD8⁺ T Zellen ist ein besserer prognostischer Indikator für den Fortschritt des Krankheitsverlaufes als dasjenige von CD4⁺ T Zellen. Obwohl die Effekte und Folgen der chronischen Immunaktivierung offensichtlich und *in vivo* messbar sind, bleibt der Mechanismus, der von HIV-1 genutzt wird um eine systemische Aktivierung zu induzieren, weitestgehend ungeklärt. Des Weiteren ist unklar, ob die Aktivierung der CD8⁺ T Zellen einseitig in Bezug auf ihre Antigen Spezifität ist, und wie diese Zellen während einer HIV-1 Infektion *in vivo* aktiviert werden können.

Unsere Daten zeigen, dass CD8⁺ T Zellen im Gegensatz zu CD4⁺ T Zellen stärker und unabhängig von ihrer Antigenspezifität während einer HIV-1 Reaktivierung aktiviert werden, was eine TCR-unabhängige T Zellaktivierung unterstützt. Bis jetzt ist die Relevanz der TCR unabhängigen T Zell Aktivierung in HIV-1 Infektion, über Zytokin-Stimulation oder Aktivierung via „Pattern recognition Rezeptoren“ (PRRs), nicht bekannt, jedoch besteht die Möglichkeit, dass pro-inflammatorische Zytokine, die während einer HIV-1 Infektion in erhöhten Mengen nachweisbar sind, sowie systemische mikrobielle Translokation einen signifikanten Einfluss auf die einsetzende Hyperaktivierung der T Zellen und somit auf das Fortschreiten der Krankheit beitragen. Diese Theorie wird durch unsere Ergebnisse unterstützt, die zeigen, dass IL-15, ein Zytokin, das während einer HIV-1 Infektion vermehrt in höheren Konzentrationen vorkommt, selektiv CD8⁺ T Zellen, nicht aber CD4⁺ T Zellen aktiviert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Dendritische Zellen (DC), die mit LPS oder HIV-1 stimuliert wurden, analog zum Milieu, das während der HIV-1 Infektion vorliegt, CD8⁺ T Zellen in einer Antigen unabhängigen, jedoch IL-15 abhängigen Art aktivieren. Die Tatsache, dass myeloide DCs (mDCs) von HIV-1 infizierten Patienten mit aktiver HIV-1 Replikation höhere Mengen an IL-15 produzierten, verglichen mit mDC die von denselben Patienten unter einer erfolgreichen ART isoliert wurden, unterstützt unsere *in vitro* Resultate zusätzlich. Auf Grund unserer Daten gehen wir davon aus, dass CD8⁺ T Zellen

durch IL-15 effektiv aktiviert werden können, wobei diese Aktivierung, die unabhängig der Antigen Spezifität der Zellen ist, während einer unbehandelten HIV-1 Infektion stattfindet, und dass LPS und oder HIV-1 aktivierte DCs eine massgebende Quelle dieses Zytokines sein können. Diese Resultate könnten den Zusammenhang zwischen generell erhöhtem inflammatorischem Milieu und der Aktivierung von HIV-1 spezifischen T Zellen während einer unbehandelten HIV-1 Infektion erklären. Zusätzlich bieten diese Resultate eine Erklärung dafür, dass quantitativ mehr CD8⁺ T Zellen diesen aktivierten Phänotypen zeigen als CD4⁺ T Zellen.

Die HIV-1 Infektion beeinflusst stark die Integrität des Gastrointestinaltraktes, wo vor allem in den frühen Infektionsstadien das Virus stark repliziert. Neben der Entzündung des Gastrointestinaltraktes wird HIV-1 assoziierte Enteropathy auch mit einer erhöhten Darmdurchlässigkeit und Translokation mikrobieller Produkte in Verbindung gebracht. Bis jetzt gibt es jedoch keine verfügbaren Daten, die aufzeigen, dass vermehrter Kontakt mit Darm-mikrobiellen Antigenen zu einem erhöhten Anteil von CD4⁺ T Zellen führt, die spezifisch für Darm-mikrobielle Antigene sind. Es ist anzunehmen, dass diese aktivierten CD4⁺ T Zellen, die spezifisch für Darm-mikrobielle Antigene sind, zu der in HIV-1 Infektionen beobachteten globalen Immunaktivierung beitragen. Um diese Hypothese zu untersuchen, etablierten wir eine analytische Methode, die es uns erlaubt, die Darm-Microbiota spezifischen T Zellen in Blutproben zu quantifizieren über die Messung der Frequenz an Zytokin-sekretierenden CD4⁺ T Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Ultraschall behandelten kommensalen Darmbakterien. Die Methode wurde mit Hilfe von Blutproben von gesunden Spendern sowie IBD Patienten etabliert und anschliessend validiert. Wir konnten beobachten, dass IBD Patienten tendenziell erhöhte Mengen an Zytokin-produzierenden CD4⁺ T Zellen aufweisen als gesunde Spender. Unsere Resultate unterstützen die Genauigkeit dieses Analysemethoden und schlagen die Anwendung an HIV-1 infizierten Patienten vor.

Zusammenfassend ermöglicht diese Dissertation neue Einblicke in verschiedene Aspekte der HIV-1 Pathogenese und der damit assoziierten chronischen Immunaktivierung und liefert neue Hinweise auf die zugrundeliegenden Mechanismen.