UAB
Universitat Autònoma de Barcelona

PAPER DEL PUNT DE CONTROL IMMUNOLÒGIC KLRG1 EN L'ALTERACIÓ FUNCIONAL DE LES CÈL·LULES NATURAL KILLER EN LA INFECCIÓ PER VIH I RESPOSTA DE LES NATURAL KILLERS RESIDENTS EN AMÍGDALES DAVANT L'ESTABLIMENT DE LA INFECCIÓ

David Perea Pérez

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons: https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons: https://creativecommons.org/licenses/?lang=es

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license: https://creativecommons.org/licenses/?lang=en

DEPARTAMENT DE
BIOLOGIA CEL·LULAR, DE
FISIOLOGIA I
D'INMUNOLOGÍA

FACULTAT DE BIOCIÈNCIES

PAPER DEL PUNT DE CONTROL IMMUNOLÒGIC KLRG1 EN L'ALTERACIÓ FUNCIONAL DE LES CÈL·LULES *NATURAL KILLER* EN LA INFECCIÓ PER VIH I RESPOSTA DE LES *NATURAL KILLERS* RESIDENTS EN AMÍGDALES DAVANT L'ESTABLIMENT DE LA INFECCIÓ

Tesi presentada per David Perea Pérez per optar al títol de Doctor en Immunologia Avançada per la Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. María José Buzón
Directora

Dra. Mónica Martínez Gallo
Tutora

David Perea Pérez
Doctorand

Barcelona, setembre de 2024

TAULA DE CONTINGUTS

ABREVIATURES **1**

I. INTRODUCCIÓ **5**

1. BIOLOGIA DEL VIH 5
1.1. Taxonomia *5*
1.2. Genoma i estructura del VIH-1 ..... *5*
1.3. Cicle de vida del VIH-1 ..... *7*
2. PATOGÈNESI DE LA INFECCIÓ PER VIH-1 9
3. RESPOSTA IMMUNOLÒGICA EN FRONT A LA INFECCIÓ PER VIH 10
3.1. Immunitat innata *10*
3.2. Immunitat adaptativa *11*
4. SITUACIÓ ACTUAL DE LA PANDÈMIA DE VIH 13
5. CONTROL DE LA REPLICACIÓ DEL VIH AMB LA TAR 13
6. MÉS ENLLÀ DE LA TAR: NECESSITAT D'AVENÇOS PREVENTIUS I CURATIUS 14
6.1. Desigualtat mundial en l'accés a la TAR *14*
6.2. Comorbiditats malgrat la TAR *14*
6.3. Resistència antiviral a la TAR *14*
6.4. Reservoris cel·lulars del VIH *15*
6.4.1. Identificació de cèl·lules latentment infectades 18
6.5. Reservoris anatòmics principals del VIH *20*
6.5.1. Centres germinals en els Òrgans Limfoides Secundaris (OLS) 21
6.5.2. Teixit Limfàtic Associat a l'Intestí (GALT) 23
6.5.3. Models de cultiu de teixit *ex vivo* per a l'estudi de la infecció per VIH 23
7. ESTRATÈGIES DE CURACIÓ 26
7.1. Anticossos neutralitzants d'ampli espectre (bnAbs) *26*
7.2. Edició gènica per CRISPR-Cas9 ..... *27*
7.3. Block and Lock *27*
7.4. Shock and kill *28*
7.4.1. Reversió de la latència 29
7.4.2. Afavoriment de l'eliminació de cèl·lules reactivades 30
7.5. Vacunes terapèutiques *30*
8. CÈL·LULES NK 31
8.1. Classificació fenotípica i funcional *31*
8.1. Ontogènia *36*
8.2. Mecanisme d'acció *37*
8.2.1. Detecció de cèl·lules infectades per l'alteració dels lligands de cèl·lules NK 40
8.3. Cèl·lules NK de tipus memòria *41*
8.3.1. Cèl·lules NK de memòria en sang 41
8.3.2. Cèl·lules NK de memòria residents en teixit 42
9. ALTERACIONS FUNCIONALS 45
9.1. Esgotament funcional *45*
9.2. Ineficàcia de les cèl·lules NK per eliminar la infecció per VIH *46*
9.2.1. Les cèl·lules NK $CD56^{-}CD16^{bright}$ de sang en la infecció per VIH 47
9.2.2. Citotoxicitat reduïda de les cèl·lules NK residents en teixit 48
9.1. Alteració poblacional de les ILCs *50*
9.2. Alteració poblacional de les cèl·lules NK residents en teixit *51*
9.3. Estratègies dirigides a potenciar l'eficàcia de les cèl·lules NK *51*
9.3.1. Perfusió de citocines 51
9.3.2. Bloqueig dels punts de control immunològic (ICB) 52
9.3.3. Facilitadors del reconeixement de cèl·lules diana 55

II. HIPÒTESIS I OBJECTIUS **58**

III. RESULTATS 62

1. TREBALL 1 62
2. TREBALL 2 107

IV. DISCUSSIÓ 155

V. CONCLUSIONS 168

VI. LÍNIES DE FUTUR 172

VII. REFERÈNCIES 175

VIII. PUBLICACIONS 201

ABREVIATURES

Llista de les abreviatures més utilitzades a la tesi

ADCC: *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

ADN: àcid desoxiribonucleic

ARN: àcid ribonucleic

ARNv: ARN viral

CRISPR-Cas9: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) i *CRISPR-associated protein 9* (Cas9)

CTLs: *cytotoxic T lymphocytes*

dNTPs: *deoxynucleotide triphosphates*

FasL: *Fas ligand*

FcγRIII: *Fc γ receptor III*

FDC: *follicular dendritic cell*

FRC: *fibroblastic reticular cell*

GALT: *gut-associated lymphoid tissue*

HCMV: *human cytomegalovirus*

HCV: *hepatitis C virus*

HDACi: *histone deacetylase inhibitor*

HLA: *human leukocyte antigen*

IC: *immune checkpoint*

ICB: *immune checkpoint blockade*

IeILC1s: *intraepithelial ILCs*

IFN: interferó

Ig: immunoglobulina

IL: interleucina

ILCs: *innate lymphoid cells*

KIR: *killer Ig-like receptors*

KLRG1: *killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*

LAIR-1: *leukocyte-associated Ig-like receptor 1*

LRA: *latency reversal agent*

LTR: *long terminal repeat*

NK: *natural killer*

OLS: òrgan limfoide secundari

PBMCs: *peripheral blood mononuclear cells*

PVV: persones vivint amb VIH

SHIV: *simian-human immunodeficiency virus*

SIDA: síndrome d'immunodeficiència adquirida

SIV: *simian immunodeficiency virus*

Tfh: *T follicular helper cell*

TGF-β: *transforming growth factor β*

TIGIT: *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*

TLR: *toll-like receptor*

TNF: *tumor necrosis factor*

TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

VIH: virus de la immunodeficiència humana

I. INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ

1. Biologia del VIH

El Virus de la Immunodeficiència Humana (VIH) pertany a la família *Retroviridae*, específicament al gènere dels *Lentivirus*. Sense tractament, la infecció crònica condueix al desenvolupament de la malaltia coneguda com a Síndrome d'Immunodeficiència Adquirida (SIDA).

1.1. Taxonomia

Els retrovirus són virus d'ARN amb envolta que repliquen el seu material genètic a través d'un intermediari d'ADN gràcies a l'enzim viral transcriptasa inversa. Aquest ADN genòmic viral s'integra al genoma de la cèl·lula infectada i el VIH utilitza la maquinària cel·lular d'expressió gènica per a replicar-se[1].

Existeixen dos espècies víriques de VIH, el VIH-1 i VIH-2. Mentre que el VIH-1 és el més abundant a nivell mundial, la infecció per VIH-2 es redueix a l'Àfrica occidental. Tot i que comparteixen el mateix cicle viral i mode de transmissió, es diferencien en l'expressió de proteïnes accessòries virals, i en què la patogenicitat del VIH-2 és menor[2]. En aquesta tesi, quan es faci menció al VIH, s'assumirà que es fa referència al VIH-1, donada la seva rellevància mundial.

El VIH-1 es subdivideix en quatre grups principals en base a la divergència en la seva seqüència: M, N, O i P. Hi destaca el grup M, que es subdivideix en 10 clades, sent el clade C el principal causant de les infeccions (preval a l'Àfrica Subsahariana i l'Índia), mentre que el VIH-1 de clade B és el més estudiat, ja que preval als països del món occidental[3].

1.2. Genoma i estructura del VIH-1

El genoma del VIH-1 conté els següents gens[1] que configuren els virions madurs **(FIG 1)**:

- *gag* (antigen específic de grup): codifica p24 (càpsida viral); p6 i p7 (nucleocàpsida); i p17 (matriu).
- *pol*: codifica els enzims virals, que són la transcriptasa inversa (transcriu l'ARN viral a ADN de doble cadena), integrasa (integra l'ADN viral al genoma de la cèl·lula) i proteasa (escissiona les proteïnes virals per convertir-les en funcionals)

- *env* (envolta): codifica la gp160, que és la precursora de la gp120 i gp41 presents en els virions madurs. Es tracta de les espícules que permeten al VIH reconèixer cèl·lules diana i fusionar les seves membranes.
- *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*: cada gen codifica per a una proteïna accessòria viral que rep el mateix nom. Les seves funcions són variades, ja que ajuden a la correcta producció de virions, eviten la superinfecció de cèl·lules infectades i contraresten la resposta antiviral innata de la cèl·lula hoste.

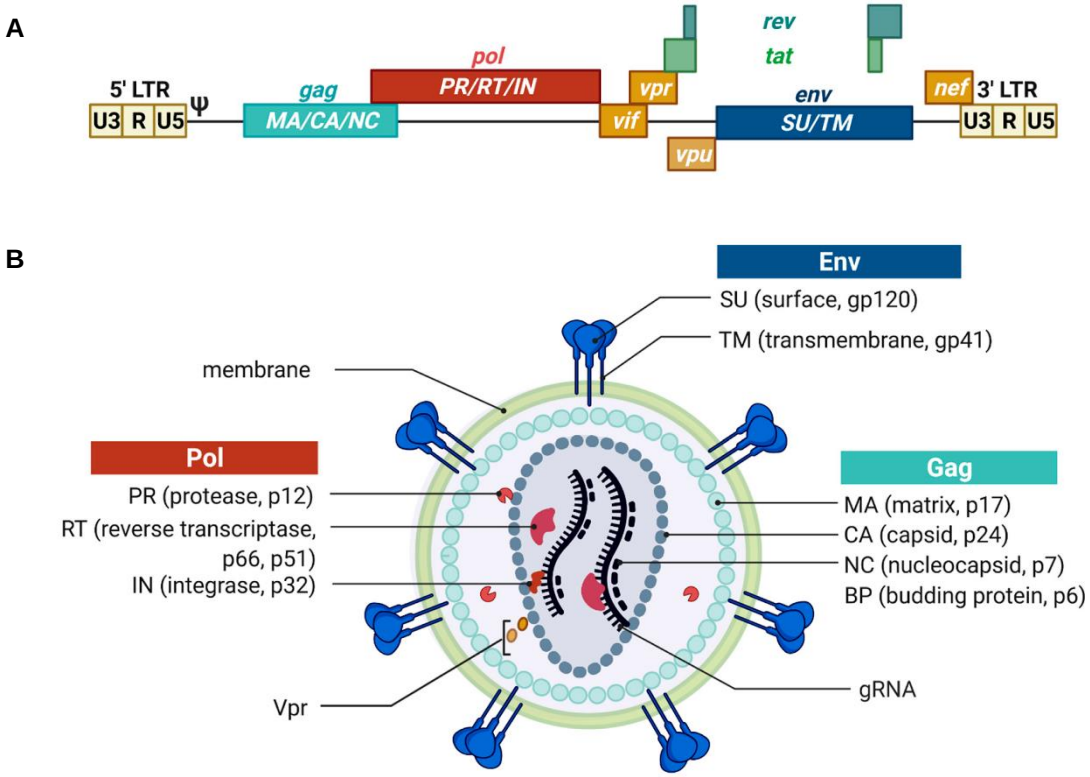


FIG 1. Genoma i estructura dels virions de VIH-1. (A) Representació esquemàtica de l'organització genòmica del genoma del VIH-1 i els marcs oberts de lectura per les diferents proteïnes estructurals, reguladores i accessòries. L'ARN lineal dimèric d'aproximadament 9 kb es troba flanquejat per les 5'- i 3'-LTR (de l'anglès, *long terminal repeats*) que contenen el promotor viral i les seqüències necessàries per a la retrotranscripció, integració i expressió gènica. Els LTR contenen elements reguladors en *cis*, les regions U3, R, i U5, seguides del senyal d'empaquetament Psi (ψ). El *gag* codifica les proteïnes estructurals de matriu (MA), càpsida (CA) i nucleocàpsida (NC), formant el nucli viral. El *pol* codifica els enzims virals proteasa (PR), transcriptasa inversa (RT) i la integrasa (IN). Seguit del gen *pol* es troben els gens reguladors *rev* i *tat* i els gens accessoris *vif, vpr* i *vpu*. El gen *env* codifica per los glicoproteïnes de l'envolta viral gp120 de superfície i gp41 transmembrana. Finalment, seguit de *l'env* es troba el gen accessori *nef*. **(B)** El virió madur presenta una forma esfèrica i està envoltat per una bicapa lipídica derivada de la cèl·lula, que conté 7-35 trímers de la glicoproteïna d'envolta. La capa interna de la membrana ancora les proteïnes de la matriu, Vpr i proteasa. La càpsida es troba en el centre del virió i conté dues còpies d'ARN genòmic, la retrotranscriptasa i la integrasa. L'ARN viral queda estabilitzat per les proteïnes de la nucleocàpsida. Extreta de: [4]

1.3. Cicle de vida del VIH-1

La replicació del VIH-1 **(FIG 2)** consta de vàries etapes detallades a continuació:

1) Unió del VIH-1 a la cèl·lula hoste i entrada:

El reconeixement de les cèl·lules diana es basa en la unió dels trímers de la proteïna de l'envolta al receptor CD4[5] i els coreceptors d'entrada[6] CCR5 o CXCR4. Després que la gp120 s'uneixi al receptor CD4, ocorre un canvi conformacional en la gp41 transmembrana que resulta en la fusió de membranes i l'entrada del virió al citoplasma[7].

2) Complex de preintegració:

Un cop dins d'una cèl·lula, l'ARN viral es retrotranscriu a ADN monocadena i finalment de doble cadena gràcies a la transcriptasa inversa empaquetada en el virió. L'ADN de doble cadena viral forma un complex amb la proteïna de matriu, la integrasa i la Vpr i es transporta activament al nucli[8].

3) Integració:

L'ADN viral aconsegueix integrar-se en el genoma cel·lular gràcies a la integrasa o també pot romandre com cercles d'ADN[9]. Cal destacar que l'ADN viral no s'integra de forma aleatòria, sinó que s'ha demostrat que guarda preferència per llocs de la cromatina amb transcripció activa[10]. La integrasa del VIH-1 pot seleccionar el lloc d'integració a l'interactuar amb la maquinària cel·lular de *splicing* i de remodelat de la cromatina. S'ha demostrat que interactua directament amb la proteïna LEDGF/p75 (de l'anglès, *cellular lens epithelium-derived growth factor*), que interactua amb varis factors de *splicing* i dirigeix la integració del VIH-1 cap a introns de gens transcripcionalment actius[11]. L'ADN viral integrat rep el nom de provirus, i aquest es replica com a part normal del genoma cel·lular durant moltes rondes de divisió mitòtica.

4) Transcripció:

Un provirus conté les seqüències LTR idèntiques en els extrems 5' i 3', però el 5'-LTR inicia la transcripció 20 vegades més sovint que el 3'- LTR oclòs per la ARN polimerasa II (ARNPII) allargadora[12]. Els principals factors de transcripció que s'uneixen al promotor LTR estan relacionats amb l'activació cel·lular, com NF-κB, o AP-1[13] i, per tant, la transcripció del VIH-1 està acoblada a l'activació de les cèl·lules del sistema immunitari.

Però encara que les cèl·lules infectades estiguin activades, inicialment tan sols existeix una feble transcripció del provirus pels factors de transcripció de l'hoste (fase independent de

Tat)[14]. En absència de Tat, l'ARNPII es deté després de la transcripció de *tar*, acumulant-se a +50 nt, que correspon al lloc de pausa majoritari en els gens cel·lulars[15]. En la transcripció independent de Tat, al voltant del 87% dels transcrits del VIH-1 acaben prematurament, a causa de l'activitat de factors d'elongació negatius[14]. Així i tot, alguns dels transcrits generats sí que aconsegueixen la longitud completa i resulten suficients per a expressar *tat*. La proteïna Tat (transactivador de la transcripció) s'uneix a TAR, una forqueta d'ARN de 60 nt present en el 5' de tots els ARNm virals naixents, i així es promou l'elongació de la transcripció del VIH (fase dependent de Tat)[12]. A més, es produeix un bucle de retroalimentació positiva quant a l'elongació dels transcrits del VIH-1 i la producció de Tat, podent-se aconseguir el 99% de transcrits amb longitud completa[14].

5) Assemblatge i alliberament de nous virions:

Quan s'assoleixen uns nivells mínims de proteïnes virals produïdes dins la cèl·lula hoste, les proteïnes que conformen els virions són transportades fins a la membrana plasmàtica[16]. És d'importància que la proteïna Gag primer és produïda com monòmers, però quan oligomeritzen i sofreixen modificacions post-traduccionals poden unir-se a la membrana plasmàtica per conformar virions immadurs. Seguidament, el complex ESCRT (de l'anglès, *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport machinery*) escissiona els virions per alliberar-los de la membrana i, poc després, la proteasa viral s'activa i finalitza la maduració dels virions[17].

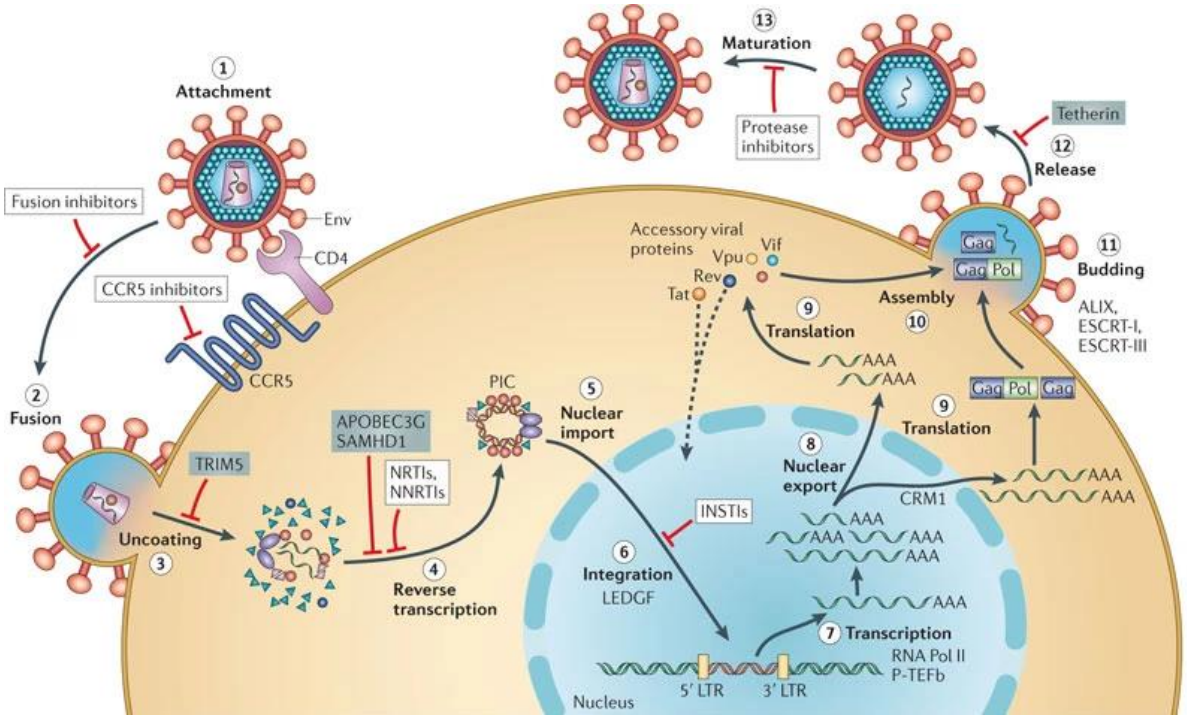


FIG 2. Representació esquemàtica del cicle de replicació del VIH-1. Els factors de restricció de la cèl·lula hoste que juguen un paper en bloquejar el cicle de replicació del VIH-1 s'indiquen en els requadres blaus. Cada pas del cicle de replicació comporta una oportunitat per detenir-lo amb els antiretrovirals que s'indiquen en els requadres blancs. INSTI, *integrase strand transfer inhibitor*; LTR, *long terminal repeat*; NNRTI, *non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor*; NRTI, *nucleoside reverse transcriptase inhibitor*. Extreta de: [18]

2. Patogènesi de la infecció per VIH-1

La transmissió sexual del VIH-1 per via rectal o vaginal requereix que el virus atravessi les mucoses de barrera. En primer lloc, el VIH-1 infecta els limfòcits T $CD4^+$ intraepitelials que es troben al teixit, i pot ser capturat per les cèl·lules de Langerhans i les cèl·lules dendrítiques presents a la làmina pròpia subjacent[19]. La infecció local del virus fundador provoca la producció de citocines proinflamatòries i quimiocines[20,21] que recluten més limfòcits T $CD4^+$ diana i cèl·lules dendrítiques. A més, el VIH-1 és capaç de migrar als ganglis limfàtics regionals gràcies al transport per part de les cèl·lules dendrítiques, on es produeix una infecció massiva dels limfòcits T $CD4^+$, culminant amb la disseminació sistèmica del virus[19].

Fins al 90% de les persones amb infecció aguda pel VIH-1 manifesten simptomatologia inespecífica similar a la mononucleosi dins de les quatre setmanes posterios a la infecció, poc abans d'assolir el pic de virèmia[22]. Al voltant d'un mes després del pic viral, la resposta antiviral aconsegueix resoldre la simptomatologia aguda i estabilitzar els nivells de limfòcits T $CD4^+$[23]. La pressió immunitària fa que el VIH-1 assoleixi uns nivells de replicació estables que poden durar anys sense TAR[24] **(FIG 3)**. Durant aquesta fase crònica, la infecció sovint passa desapercebuda, ja que moltes persones només presenten fatiga i limfadenopatia generalitzada[24]. Sense la TAR, el recompte de limfòcits T $CD4^+$ en sang disminueix de manera sostinguda, i eventualment la infecció pel VIH-1 progressa a SIDA **(FIG 3)**, l'estadi més avançat de la malaltia. En aquesta etapa, es desenvolupen patologies definidores de la SIDA, com ara candidiasi generalitzada, neoplàsies com el sarcoma de Kaposi, i infeccions oportunistes inusuals a nivell pulmonar i disseminades[23].

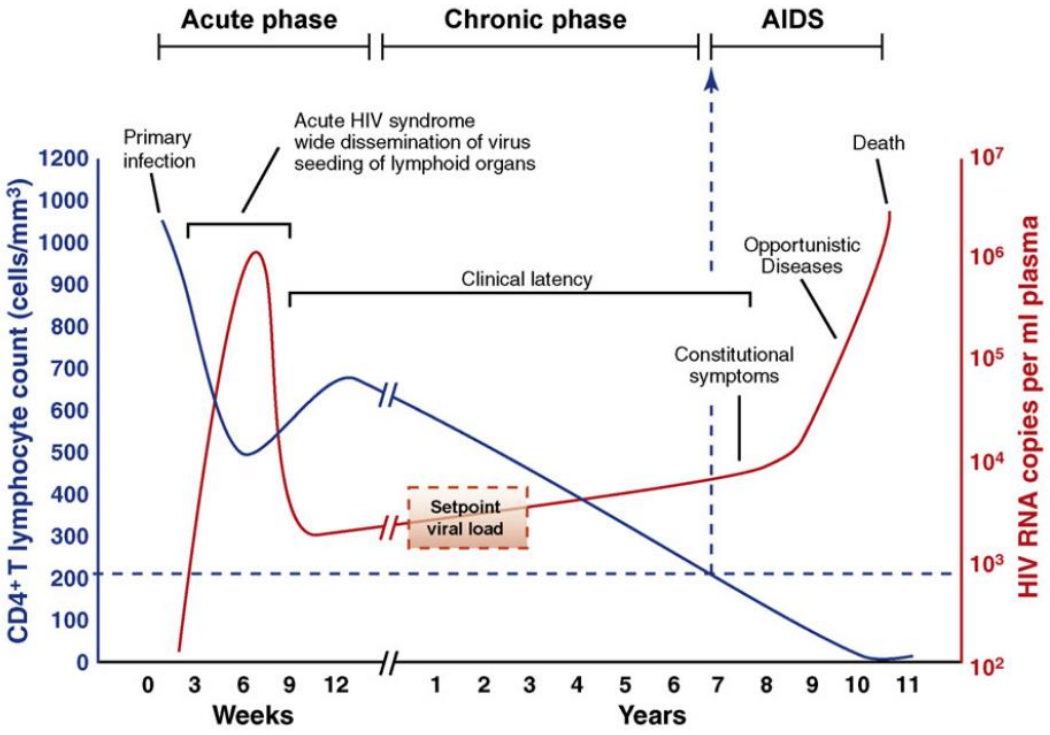


FIG 3. Curs natural de la infecció per VIH. La fase aguda inicial dura entre 6 i 12 setmanes i pot cursar amb símptomes semblants als de la grip, i s'assoleix el pic de virèmia i la vall en el recompte de limfòcits T CD4⁺. A continuació, té lloc la fase crònica asimptomàtica, que pot durar 8-10 anys, i la càrrega viral plasmàtica s'estabilitza. Finalment apareix la SIDA, que s'associa a un increment de la replicació viral i una davallada en el recompte de limfòcits T CD4⁺ per sota de 200/mm^3. El temps en aparèixer la SIDA és molt variable entre individus, des de 2 fins a 15 anys passada la seroconversió. Extreta de: [25]

3. Resposta immunològica en front a la infecció per VIH

3.1. Immunitat innata

En l'inici de la infecció en les mucoses exposades al virus (genital o intestinal), les cèl·lules infectades detecten la presència del VIH a través dels receptors de reconeixement de patògens (PRRs), com varis *Toll-like receptors* (TLRs)[26–28], *RIG-I-like receptors*[29], proteïnes induïdes per interferons (IFIs)[30] i la sintasa de GMP-AMP cíclic[31], que poden detectar el genoma del VIH i productes derivats de la transcripció reversa, així com la càpsida viral. A més, les cèl·lules de l'entorn també detecten i alerten de l'entrada del VIH: els TLR2 i TLR4 en les cèl·lules de la mucosa epitelial detecten la gp120 i desencadena una resposta proinflamatòria i quimiotàctica[26]. D'altra banda, els TLR7 i TLR8 endosomals poden detectar l'ARN genòmic del VIH en les cèl·lules dendrítiques i activar-les[28]. Aquest estat d'alerta provoca el reclutament i activació de cèl·lules antivirals de la immunitat innata, primerament

macròfags i cèl·lules dendrítiques, que són les responsables d'activar i reclutar les cèl·lules NK gràcies a tot un seguit de mediadors proinflammatoris i quimiocines. En sang, podem destacar que l'augment en la virèmia plasmàtica en la infecció aguda s'associa a l'increment dels nivells plasmàtics d'IFN-α, IL-15, CXCL10, TNF-α, MCP-1, IL-6, IL-8, IL18, i IFN-γ, i, més endavant, també s'observa la generació de la citocina immunoreguladora IL-10[32].

Abans de la seroconversió, la resposta VIH-específica per part de limfòcits T $CD8^+$ és menyspreable, mentre que les poblacions de cèl·lules NK s'expandeixen significativament en l'etapa aguda de la infecció **(FIG 4)** i el seu nivell d'activitat es correlaciona directament amb la càrrega viral[33]. En l'activació persistent de les cèl·lules NK en la infecció crònica hi juga un paper clau l'ARN monocadena ric en uridina derivat de la *long terminal repeat* ssRNA40 del VIH. Aquest actua a través dels TLR7/8 expressats en monòcits i cèl·lules dendrítiques plasmacitoides que, per contacte directe, estimulen les cèl·lules NK[34]. S'ha constatat la gran importància de les cèl·lules dendrítiques plasmacitoides, ja que en pacients prèviament tractats que interrompen el tractament, la pèrdua sobtada de funcionalitat d'aquesta població és predictora del rebot viral[35].

3.2. Immunitat adaptativa

Després dels primers esforços de la resposta innata per a combatre l'establiment de la infecció per VIH, s'origina la resposta adaptativa contra el VIH. Per un costat, té lloc la resposta humoral, protagonitzada pels limfòcits B generadors d'anticossos específics contra el VIH. Cal destacar que, a mesura que la infecció per VIH es cronifica, l'afinitat i funció d'aquests anticossos varia: en la fase aguda s'originen anticossos no neutralitzants[36], que poden facilitar respostes efectores com la fagocitosi per macròfags o la citotoxicitat dependent d'anticossos (de l'anglès, ADCC) per part de les cèl·lules NK. Mesos més tard, quan la infecció esdevé crònica, es poden detectar anticossos neutralitzants[37], i al cap d'anys és quan apareixen els anticossos millorats àmpliament neutralitzants[38,39]. D'altra banda, també es genera una resposta cel·lular adaptativa contra el VIH, caracteritzat principalment pels limfòcits T $CD4^+$ i T $CD8^+$. Tot i que els limfòcits T $CD4^+$ s'esgoten ràpidament en la fase aguda, la resposta innata controla parcialment la infecció i es poden recuperar certs nivells de T $CD4^+$ **(FIG 3)**. Entre les funcions d'aquests, hi trobem la producció de citocines indispensables per a la correcta resposta antiviral, com la IL-17, IFN-γ i IL-2[40]. A més, també es produeix una expansió clonal dels limfòcits T $CD8^+$ citotòxics capaços d'eliminar les cèl·lules infectades[41] **(FIG 4)**. Malauradament, l'exposició antigènica continuada esgota funcionalment als CTLs[42,43] i, a part, no poden arribar a tots els reservoris anatòmics on el

VIH pot replicar (p. ex. els centres germinals dels ganglis limfàtics[44]). A més, l'elevada producció de quimiocines produïdes per la defensa antiviral innata promou el reclutament de limfòcits T CD4⁺ a aquests teixits[45,46], en especial l'intestí, i el VIH troba una font contínua de cèl·lules diana on replicar i persistir. En conseqüència, la infecció per VIH no tractada es cronifica i les persones amb VIH poden perdurar 8-10 anys asimptomàtiques, amb recomptes de limfòcits T CD4⁺ que disminueixen progressivament però una càrrega viral en plasma relativament constant. Finalment, s'arriba a la fase final de SIDA i aquests valors s'inverteixen, com a la fase aguda, però el sistema immunològic ja no és capaç de fer front a la infecció **(FIG 3)**.

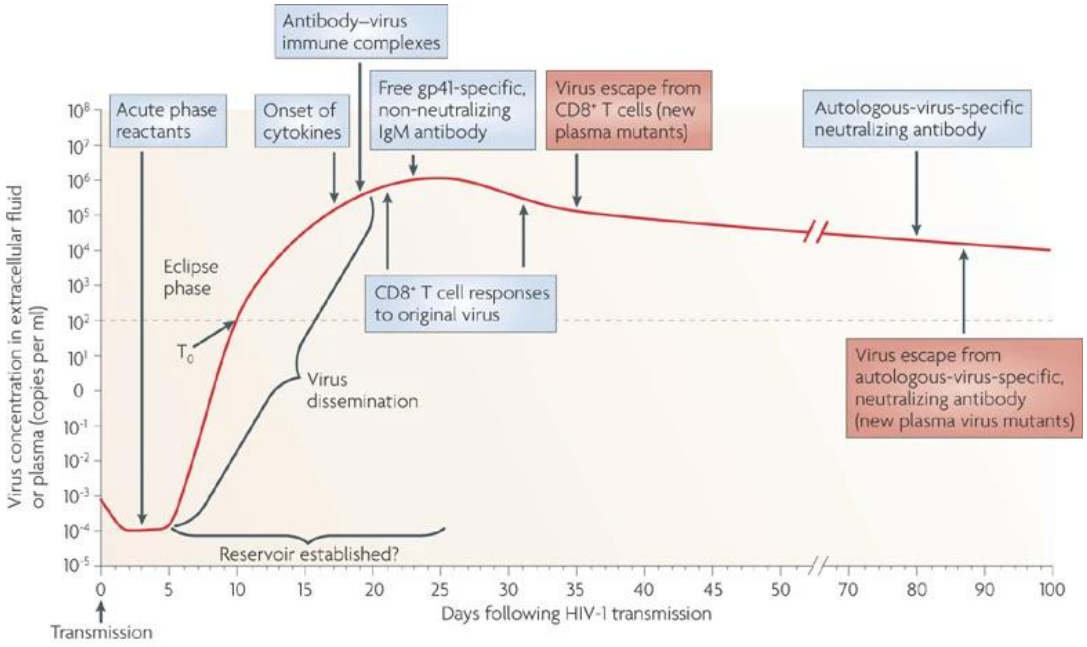


FIG 4. Aparició de les diferents respostes immunològiques innates i adaptatives després de la transmissió del VIH-1. La primera resposta immunològica detectable sistèmicament és l'increment dels nivells de proteïnes de fase reactiva en plasma, que s'observen quan la replicació viral és encara pràcticament restringida als teixits mucosos i als ganglis limfàtics de drenatge. (fase d'eclipsi). Quan el virus es detecta en plasma (T_0), també s'observa un increment dinàmic dels nivells de citocines en plasma. En uns dies, mentre la virèmia plasmàtica es troba encara en augment potencial, es detecten els primers immunocomplexos d'anticossos units a virus. L'expansió de les primeres respostes de limfòcits T CD8⁺ VIH-específiques s'inicia abans del pic de virèmia, seguit de la detecció dels primers anticossos IgM no neutralitzants contra la glicoproteïna (gp) 41 lliure. L'escapament viral complet de les primeres respostes de limfòcits T CD8⁺ pot ocórrer ràpidament, dins dels 10 primers dies de l'expansió dels limfòcits T. En aquest moment, ja existeixen reservoris virals, els quals possiblement s'han establert pocs dies després de la infecció. Els primers anticossos neutralitzants del VIH-1 apareixen al voltant de 80 dies després de la infecció, quan la càrrega viral encara es troba en declivi abans d'assolir el punt d'equilibri viral. Els virus amb mutacions d'escapament d'aquests anticossos poden aparèixer una setmana després. Extreta de: [21]

4. Situació actual de la pandèmia de VIH

El VIH és un dels virus més estesos a nivell mundial: al tancament de l'any 2023 es va estimar que 39,9 milions de persones vivien amb el VIH en tot el món, amb 1,3 milions de noves infeccions i 630.000 morts relacionades amb la SIDA[47]. D'entre totes les persones infectades, es calcula que 30,7 milions van tenir accés a la TAR[47]. Actualment, el VIH/SIDA es pot tractar i controlar efectivament amb la teràpia antiretroviral combinada (TAR), que actua sobre diferents etapes del cicle de replicació del VIH. Tot i així, la TAR és incapaç d'eliminar el VIH integrat de forma latent en les cèl·lules T $CD4^+$ d'una persona infectada i, per tant, la infecció per VIH roman incurable[48].

5. Control de la replicació del VIH amb la TAR

Els objectius de la TAR són aconseguir la màxima i més duradora supressió de la càrrega viral en plasma, restablir i preservar la funció immunològica, reduir la morbiditat associada a la replicació del VIH, augmentar la supervivència i prevenir la transmissió del VIH. La TAR s'ha d'iniciar sempre tan aviat com sigui possible[49].

A l'actualitat, el "Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por VIH"[49] recomana que la TAR consisteixi en una combinació de dos a tres fàrmacs basats en un inhibidor de la integrasa (INI) de segona generació (dolutegravir o bictegravir). Com a pauta doble, la única recomanada com a TAR d'inici consisteix en dolutegravir més lamivudina. Altres pautes eficaces però no preferents es basen en l'ús d'inhibidors de la proteasa potenciats o els inhibidors de la transcriptasa inversa no anàloga dels nucleòsids (ITINN). Amb aquestes combinacions s'aconsegueix una càrrega viral indetectable (límit de detecció <50 còpies/mL) a les 48 setmanes de tractament en el 85% dels casos[49].

Des de l'aparició de la teràpia antiretroviral combinada a mitjans de 1990, el tractament ha sigut constantment refinat i s'ha aconseguit augmentar la potència, reduir els efectes secundaris i les resistències als antiretrovirals i facilitar l'adherència reduint la ingesta diària de pastilles, ja que inclús existeixen combinacions d'antiretrovirals injectables de llarga vida, que es poden aplicar setmanalment o mensualment[50].

6. Més enllà de la TAR: necessitat d'avenços preventius i curatius

6.1. Desigualtat mundial en l'accés a la TAR

En la última dècada s'ha constatat una progressió constant en l'abordatge de la pandèmia de VIH a nivell mundial, ja que a finals de desembre de 2023, 30,7 milions [27-31,9 milions] de persones van poder accedir a la TAR, davant als 7,7 milions [6,7-8 milions] de l'any 2010[47]. Si bé a l'any 2023 es va assolir un 77% [61-89 %] de persones vivint amb VIH amb accés a la TAR a nivell mundial[47], l'accés és molt desigual als països amb baixos ingressos econòmics, malgrat els esforços per abaratir la TAR combinada principal (tenofovir + lamivudina + dolutegravir) produint-lo com a medicament genèric[51]. Un dels casos més extrems és Madagascar, on de les 70.000 persones que es calcula que viuen amb VIH, només el 18% va rebre la TAR al 2022[52].

6.2. Comorbiditats malgrat la TAR

Malgrat l'eficàcia de la TAR en frenar dràsticament la progressió de la infecció per VIH cap a SIDA i, finalment, la mort, existeixen certes comorbiditats en els pacients tractats amb la TAR i amb càrrega viral suprimida, principalment arran de l'existència d'una activació immunològica contínua a baix nivell però que pot augmentar el risc de patir malalties no infeccioses[53]. S'ha constatat que algunes persones amb TAR efectiva presenten alguns marcadors d'activació immunològica, inflamació i coagulació sanguínia que poden romandre elevats i conduir a morbiditats no associades a la SIDA, com les malalties cardiovasculars[54]. A més, la seva esperança de vida es pot veure reduïda i poden mostrar prematurament malalties associades amb l'edat avançada[55]. D'altra banda, si bé els controladors d'elit poden assolir una càrrega viral indetectable sense la presa de la TAR, presenten una major activació elevada de cèl·lules T $CD4^+$ i $CD8^+$, així com major translocació bacteriana intestinal, pel que pot contribuir a l'existència de comorbiditats[56].

6.3. Resistència antiviral a la TAR

Un altre dels motius que incentiven la cerca d'una cura definitiva de la infecció per VIH és que el virus pot adquirir resistència a tots els antiretrovirals coneguts. Certs factors socioeconòmics influencien que les resistències als antiretrovirals emergeixin en major freqüència en els països subdesenvolupats, com l'ús inicial d'antiretrovirals menys tolerats, interrupcions en el subministrament dels medicaments, i monitoreig insuficient de l'eficàcia del tractament[50]. A més, cal tenir present que la majoria dels estudis se centren en el VIH-1

subtipus B, que és el més freqüent en els països occidentals però només representa el 10% de les infeccions mundials[57]. En els països del primer món, en canvi, les resistències deriven més freqüentment de problemes en l'adherència al tractament.

Tenint en compte que el VIH pot adquirir resistències a tots els antivirals, en major o menor mesura, resulta imprescindible millorar l'adherència al tractament, realitzar un monitoreig periòdic de la càrrega viral del pacient, i dur a terme un estudi rutinari a nivell poblacional de les mutacions circulants en el virus que puguin provocar resistència als antiretrovirals. Cal destacar que l'inhibidor de la càpsida lenacapavir injectat cada 6 mesos ha demostrat suprimir la càrrega viral en pacients amb VIH multiresistent[58] i, a més, aquest any 2024 s'ha demostrat que el lenacapavir pres com a profilaxis pre-exposició (PrEP) ofereix prevenció total de la infecció en comparació a la PrEP actual d'ingesta diària (emtricitabine i tenofovir).

6.4. Reservoris cel·lulars del VIH

El principal factor que impossibilita la cura del VIH és l'existència d'un reservori cel·lular del VIH latent que persisteix malgrat l'ús prolongat de la TAR. La descripció més acurada defineix a una població de cèl·lules que ha de contenir VIH integrat competent per a la replicació, que pugui ser reactivat a través de l'estimulació limfocitària, que sigui demostrable en tots els individus infectats i que persisteixi indefinidament fins i tot en les persones tractades amb una TAR òptima. Únicament els limfòcits T $CD4^+$ de memòria en repòs compleixen tots aquests requisits[12]. En comparació amb els limfòcits T $CD4^+$ activats productors de virus, que tenen una vida mitja d'$\sim$1 dia[59], els limfòcits T $CD4^+$ latentment infectats compten amb una vida mitja de 44 mesos en persones tractades amb TAR[60], i poden proliferar homeostàticament amb la IL-7 i/o IL-15 sense reactivar el provirus integrat[61], així com expandir-se clonalment pel reconeixement antigènic[62]. Tot i que s'ha confirmat aquesta vida mitjana del reservori viral de 44 mesos durant els primers 7 anys de TAR, el declivi del reservori viral no es manté indefinidament. Les persones que han rebut TAR durant períodes molt prolongats (>20 anys) continuen presentant virus competents per a la replicació, tot i estar en forma latent[63]. Això concorda amb el fet que, malgrat la latència persistent sostinguda per la TAR al llarg dels anys, el reservori cel·lular del VIH latent pot provocar un rebot viral tan ràpidament com dues setmanes després d'interrompre el tractament[64].

Realment però, la infecció directa i integració proviral del VIH-1 en els limfòcits T $CD4^+$ de memòria en repòs és infreqüent[65], ja que expressen nivells insuficients del coreceptor CCR5 i sobreexpressen SAMHD1 (de l'anglès, *SAM domain and HD domain-containing protein*

1)[66], un factor de restricció amb activitat dNTPasa que redueix la quantitat de dNTPs disponible per a la retrotranscripció del VIH i impedeix la integració dels provirus[67]. Per contra, els limfòcits T CD4⁺ activats representen la principal diana del VIH, però normalment són eliminats per l'apoptosi induïda després que els limfòcits T activats deixin de trobar-se l'antigen cognat, els efectes citopàtics desencadenats pel VIH o la funció efectora de limfòcits citotòxics[68]. Els estudis inicials de Shan *et al*. van determinar que la latència concretament s'establiria quan s'infecten els limfòcits T CD4⁺ activats a comptar des de 6-12 dies enrere[68]. Una fracció minoritària d'aquesta població realitza una transició de cèl·lules efectores a de memòria en repòs (EMT), i les seves característiques afavoreixen que el VIH estableixi la latència directament sense produir virions que la farien susceptible a la mort: alta expressió de CCR5, suficients dNTPs i expressió gènica viral reduïda, ja que factors de transcripció d'activació cel·lular com NF-κB i NFAT, estan segrestats al citoplasma[68]. El fet que la petita població de T CD4⁺ EMT sigui la més permissiva amb la latència explicaria la baixa freqüència de cèl·lules latentment infectades *in vivo* (~1 per cada 10^6 T CD4⁺)[68]. Tanmateix, altres estudis sí que han observat que la infecció latent es pot establir a partir de la infecció directa de tant limfòcits T CD4⁺ activats com en repòs[69]. Aleshores, el VIH-1 establiria la latència en els limfòcits T CD4⁺ de memòria en repòs tant de forma directa com transitant prèviament per cèl·lules T CD4⁺ activades **(FIG 5)**.

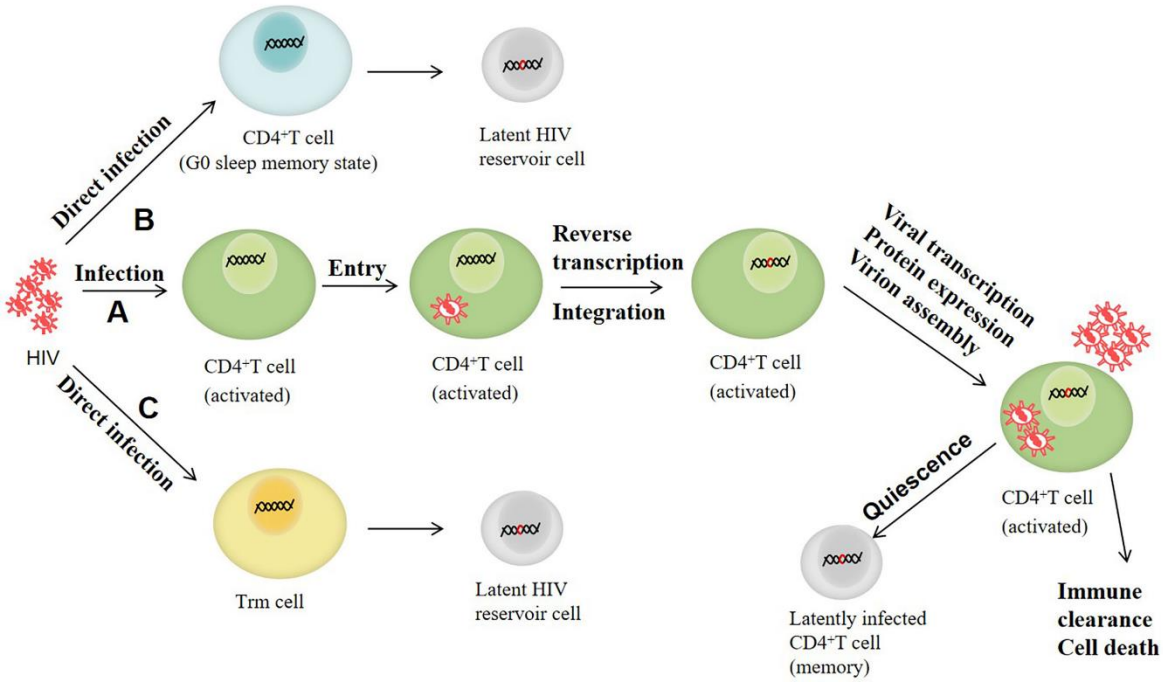


FIG 5. Procés de formació inicial del reservori latent del VIH-1. (A) El VIH infecta principalment els limfòcits T CD4⁺. Quan entra a la cèl·lula, l'ARN viral primer es retrotranscriu a ADN viral, i és integrat al genoma dels limfòcits T CD4⁺. Alguns limfòcits T CD4⁺ amb ADN viral integrat poden derivar a un estat de repòs i el VIH-1

es torna latent. **(B)** El VIH-1 infecta directament els limfòcits T CD4⁺ que retornen a un estat de memòria quiescent en fase G0, i així el VIH-1 entra en latència. **(C)** El VIH-1 estableix la latència infectant directament limfòcits T CD4⁺ de memòria en repòs (cèl·lules Trm). Extreta de: [70]

Per últim, el pes de cada subpoblació de limfòcits T CD4⁺ en contenir provirus latents és diferent **(FIG 6)**. Els limfòcits T CD4⁺ de memòria central són la subpoblació majoritària, mentre que els limfòcits T CD4⁺ naïve i els T CD4⁺ diferenciats terminalment són els menys representats[61]. No obstant, aproximadament el 90% dels provirus integrats contenen mutacions deletèries que els tornen defectius per a la replicació[71]. Així, no s'han trobat diferències significatives en el reservori de provirus amb el genoma intacte entre les diferents subpoblacions de limfòcits T CD4⁺ de memòria[72]. En canvi, els limfòcits T CD4⁺ efectors de memòria són els més fàcilment induïbles per a produir virus competents per a la replicació després de vàries rondes d'activació, però quan es normalitza a la freqüència poblacional en sang, la contribució al reservori viral induïble és similar entre les subpoblacions de memòria[72].

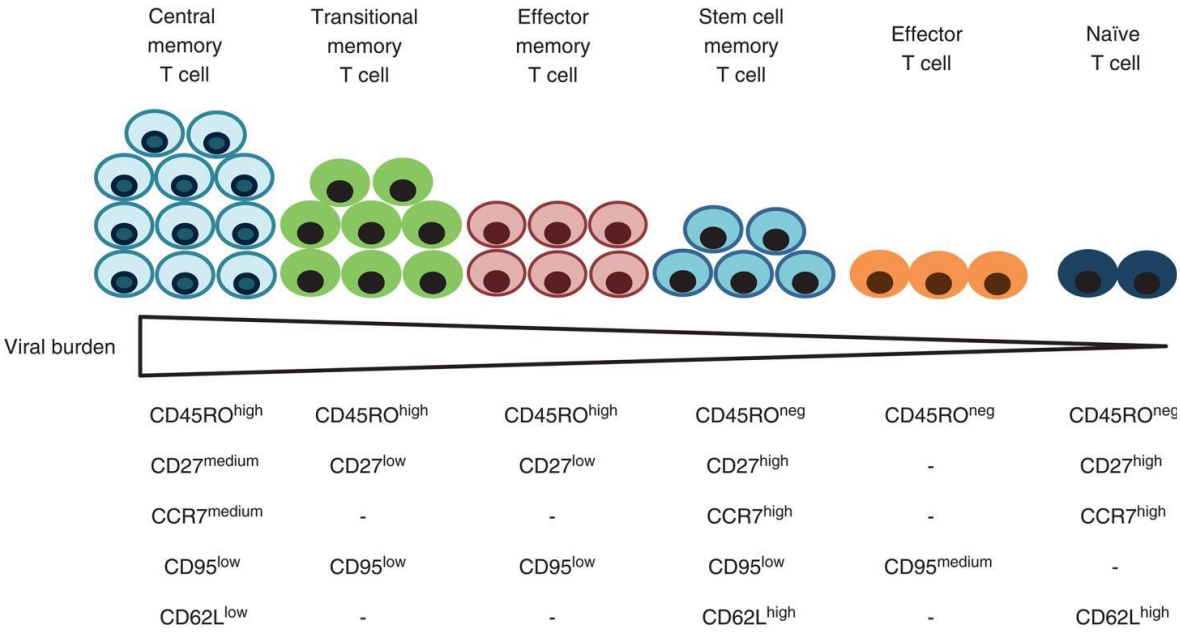


FIG 6. Reservori viral latent total en els subgrups de limfòcits T CD4⁺. Es mostra la contribució de cada subgrup de limfòcits T CD4⁺ al reservori de VIH-1 latent total juntament al fenotip de marcadors de superfície. Extreta de: [73]

6.4.1. Identificació de cèl·lules latentment infectades

L'existència d'un marcador de superfície que s'expressi exclusivament en cèl·lules latentment infectades seria una gran fita en la lluita contra el VIH, ja que possibilitaria el disseny de teràpies cel·lulars de citotoxicitat dirigida exclusivament contra aquestes cèl·lules, així com l'administració selectiva d'agents reversors/promotors de la latència i antiretrovirals. A més, també permetria l'aïllament enriquit de cèl·lules latentment infectades procedents de la sang per a l'estudi experimental de la latència del VIH.

Els primers resultats prometedors sobre un biomarcador indicador de cèl·lules latentment infectades va ser presentat per Descours *et al*., que van proposar el CD32a (receptor de baixa afinitat per a la Fc de la IgG, FcγRIIa) com a biomarcador de limfòcits T $CD4^+$ portadors de virus competents per a la replicació en individus amb TAR supressiva (<50 còpies/mL)[74]. Van calcular, mitjançant una anàlisi qVOA (de l'anglès, *quantitative viral outgrowth assay*), que les unitats infeccioses per milió de cèl·lules en els limfòcits T $CD4^+$ totales era d'entre 2,2 i 5,7, però de 2.158 a 16.422 en els limfòcits T $CD4^+CD32a^+$, un enriquiment de fins a 3000 vegades en cèl·lules latentment infectades[74].

La població minoritària T $CD4^+CD32a^+$ només representava el 0,012% del total de limfòcits T $CD4^+$ en sang, però contenia una mitja de 0,56 genomes d'ADN viral per cèl·lula, el que es traduiria en una aportació d'entre el 26,8 i el 86,3% del total d'ADN viral[74]. També cal destacar que en un altre estudi es va descobrir que la població T $CD4^+$ en teixit limfàtic que expressa CD32a són les T $CD4^+$ *helper* fol·liculars (de l'anglès, Tfh), que mostren els majors nivells de replicació viral tant en persones virèmiques com sota tractament amb TAR[75]. S'ha descobert que els limfòcits T $CD4^+$ s'uneixen a immunocomplexos d'agregats d'IgG a través del CD32a i s'incrementa la seva activació i proliferació[76]. Traslladat a la infecció crònica per VIH, els immunocomplexos d'anticossos anti-VIH poden activar crònicament les cèl·lules T $CD4^+$, entre elles les cèl·lules latentment infectades, i provocar la reactivació dels provirus[77]. A més, s'ha descobert que són més resistents a la mort per ADCC mediada per les cèl·lules NK degut a la unió subòptima dels anticossos anti-VIH[77].

Si bé el CD32a va ser un biomarcador prometedor, diversos grups independents van obtenir resultats contradictoris a l'intentar reproduir els resultats del grup de Descours[78–81]. Per exemple, Osuna *et al*. van recriminar que la isoforma de CD32 que marcava a les cèl·lules T $CD4^+CD32^+$ seria en realitat la CD32b, un marcador de limfòcits B. Van revelar artefactes produïts durant l'aïllament cel·lular per citometria de flux, que consistiria de doblets de limfòcits T i B, on els limfòcits T adquiririen el CD32b per trogocitosi[79]. A més, s'ha criticat

que la similitud dels dominis extracel·lulars de CD32a i CD32b impossibilita la correcta separació per citometria de flux, degut a la falta d'anticossos comercials que els distingeixin[76]. Un altre estudi va arribar a la conclusió que, més que considerar-se el CD32a un marcador de cèl·lules latentment infectades, es tractaria d'un biomarcador que indica cèl·lules que transcriuen activament el VIH inclús en persones amb càrrega viral suprimida per la TAR[81]. Tot i aquest seguit d'estudis rebatent la descoberta inicial del CD32a com a biomarcador del reservori cel·lular latent, al 2020 es va publicar un altre estudi que defensa les observacions de Descours *et al*., ja que, primer, van trobar una correlació entre el CD32 i la quantitat d'ADN viral integrat en sang perifèrica, i segon, van optimitzar l'aïllament de cèl·lules T $CD4^+CD32^+$ realment pures, aconseguint enriquir l'ADN viral integrat en 292 vegades, però no l'ARN viral, pel que es tractaria de cèl·lules latentment infectades[82]. A més, els provirus de les cèl·lules T $CD4^+CD32^+$ van poder ser reactivats *ex vivo*[82].

Una altra proposta de biomarcador ha sigut el CD30, que pertany a la superfamília de receptors de TNF, i es troba expressat en cèl·lules de tumors Hodgkin i altres limfomes agressius, a més de la infecció pel virus d'Epstein-Barr, però no en limfòcits de persones sanes[83]. De funció incerta, suposadament estaria implicat en la activació, proliferació i mort cel·lular[84]. Es van comparar les cèl·lules T $CD4^+CD30^+$ contra les $CD30^-$ en tres cohorts de pacients: persones infectades amb càrrega viral suprimida, virèmics i controladors sense TAR (càrrega viral plasmàtica <500 còpies/mL). La freqüència mitjana d'expressió de CD30 va ser de 3,97%, 1,05% i 0,03%, respectivament. Malgrat la raresa d'aquestes cèl·lules en sang, se'ls va atribuir el 21%, 28% i 51,4% de l'ARN viral associat a cèl·lules, respectivament. En el cas de l'ADN viral, la major contribució va ser en els pacients amb TAR, on de mitjana el 18,3% de limfòcits T $CD4^+$ amb ADN viral integrat expressaven CD30, i hi destaquen dos pacients amb més del 50% d'ADN viral integrat en la fracció $CD30^+$. En els virèmics i controladors, va ser d'un 2,2% i 0,05%, respectivament. En l'estudi de mostres d'íleum i recte de persones amb la càrrega viral suprimida, es va detectar un 88% de col·localització de l'ARN viral amb l'ARNm de CD30, major que l'observat en individus virèmics (32,5%, P= 0,008)[84]. Un apunt interessant d'aquest estudi va ser que una persona infectada per VIH amb càrrega viral suprimida va estar rebent infusions repetides de brentuximab vedotina per atacar les cèl·lules $CD30^+$ de limfoma, i no se li va detectar VIH associat a les cèl·lules en sang. Es va concloure que el CD30 podria considerar-se un marcador de cèl·lules infectades residuals que transcriuen activament el VIH inclús sota la TAR supressora[84].

Per últim, també s'han establert associacions entre l'expressió augmentada del punt de control immunològic KLRG1 i la presència d'ADN proviral clonal intacte integrat en les

cèl·lules T CD4^{+}[85]. En concordança, en el **TREBALL 1** es demostra que l'ús d'un anticòs anti-KLRG1 té la capacitat de reactivar les cèl·lules latentment infectades.

6.5. Reservoris anatòmics principals del VIH

Un reservori anatòmic es considera un teixit que conté cèl·lules latentment infectades[86] **(FIG 7)**, i hi destaca que en pacients amb càrrega viral indetectable en sang, sovint hi segueix havent cèl·lules produint contínuament nous virions en els reservoris anatòmics[87]. A més, es poden distingir els santuaris anatòmics, que són estructures anatòmiques no accessibles per als limfòcits citotòxics ni pels antiretrovirals (a concentracions terapèutiques)[87]. Els ganglis limfàtics, sistema nerviós central, tracte genital masculí, teixit adipós i retina són els millors documentats[88].

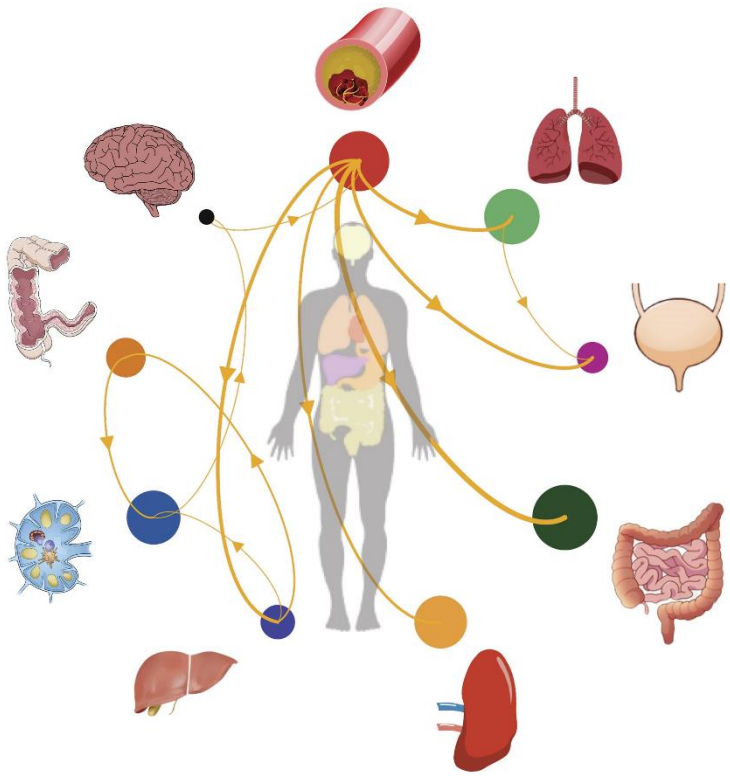


FIG 7. Reservoris anatòmics principals del VIH-1. Els reservoris de VIH-1 persisteixen en els teixits profunds, i la sang és la font principal de disseminació. La mida dels cercles indica l'abundància de cada reservori. Extreta de: [89]

Es calcula que hi ha 5-10x10^9 limfòcits T en sang perifèrica, els quals només representarien el 2% del total present al cos humà, ja que s'estima que en teixits com la pell, pulmons, intestins i teixit limfàtic, s'acumulen 10 vegades més limfòcits T. Malgrat ser doncs la sang el reservori anatòmic del VIH més reduït, és el més estudiat gràcies a la facilitat en la presa de mostres[90]. Per aquest motiu, en aquesta tesi doctoral s'ha estudiat un dels reservoris anatòmics principals, el teixit limfàtic.

6.5.1. Centres germinals en els Òrgans Limfoides Secundaris (OLS)

En els ganglis limfàtics, els limfòcits T $CD4^+CTLA4^+$ serien la principal diana per a la infecció en la zona T, mentre que els limfòcits T $CD4^+$ *helper* fol·liculars en el fol·licle B conformarien el compartiment principal on replica el VIH[91]. En la infecció per VIH, les cèl·lules dendrítiques fol·liculars (de l'anglès, FDC), que resideixen en els centres germinals, presenten partícules de VIH en la seva superfície per activar selectivament als limfòcits B. Malauradament, com els limfòcits T $CD4^+$ de l'àrea paracortical migren als centres germinals en resposta a l'activació dels limfòcits B, amb el temps s'infecten[92]**.** Tot i que els limfòcits T $CD8^+$ poden eliminar cèl·lules infectades en la zona T, compten amb un accés molt restringit a la zona B[73] **(FIG 8)**. Per a entrar-hi, han de modificar el seu fenotip a $CCR7^{low}CXCR5^{high}$, i si bé s'ha observat la presència de limfòcits T $CD8^+$ fol·liculars tant en pacients virèmics com sota TAR, presenten una pobra secreció de citocines, segurament condicionada per l'alta expressió dels punts de control immunològic PD-1 i TIGIT[91]. Per tant, els fol·licles B serien santuaris que faciliten la persistència del VIH-1, per estar protegits de la citòlisi dels limfòcits citotòxics, sumat a la biodisponibilitat limitada de la TAR[12,87,93]. També cal destacar que si la infecció per VIH no es tractada amb rapidesa en la fase aguda, s'ha demostrat que els ganglis limfàtics poden perdre la xarxa de cèl·lules fibroblàstiques reticulars i patir la deposició de col·lagen[94], que pot alterar els limfòcits citotòxics [95] i la funció inductora de respostes immunològiques, empitjorant la patologia per VIH i derivar a SIDA.

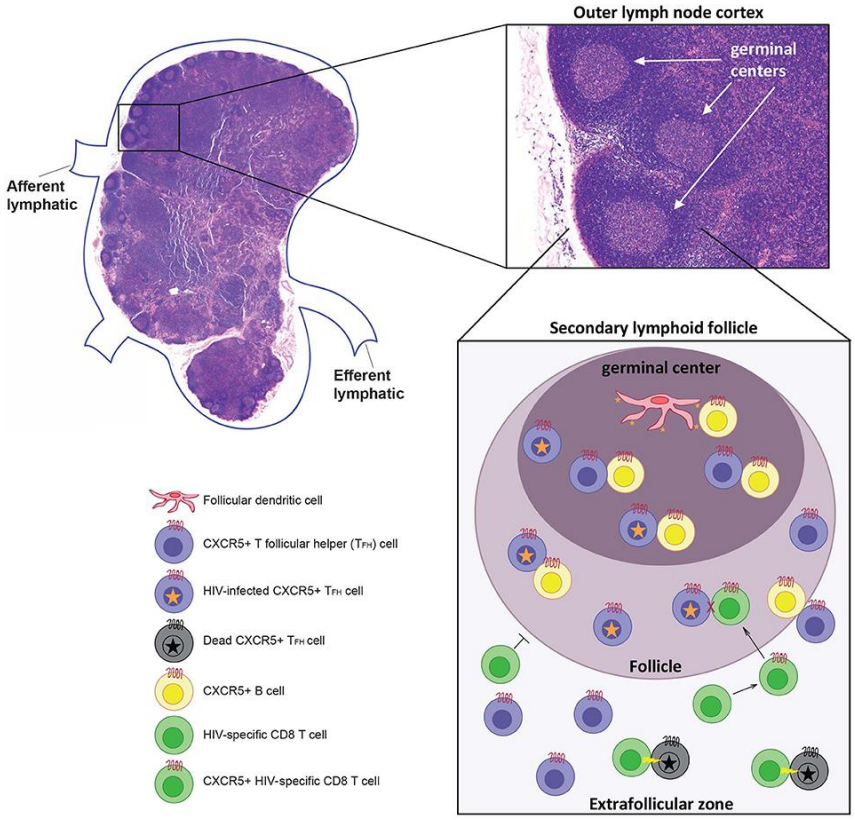


FIG 8. Els fol·licles B dels ganglis limfàtics com a sanctuaris per a la replicació del VIH-1. El fluid limfàtic aferent entra al còrtex del gangli limfàtic, i el fluid limfàtic eferent surt per l'híl·lus a través dels vasos limfàtics. El gangli limfàtic està format tant per cèl·lules limfocitàries com miel·loides, i s'organitzen en una xarxa limforeticular entrellaçada que organitza aquestes cèl·lules immunitàries, promovent l'activació i l'expansió clonal. El còrtex del gangli limfàtic es divideix en un còrtex extern, que conté fol·licles limfoides primaris i secundaris, i un còrtex intern. Els fol·licles primaris es componen principalment de cèl·lules B i no contenen un centre germinal, mentre que els fol·licles secundaris, que es formen després de l'activació immunitària, es componen d'una capa de cèl·lules B que envolta un centre germinal central format per centroblasts i cèl·lules dendrítiques fol·liculars (FDC). Les cèl·lules T *helper* fol·liculars (Tfh) es poden trobar a la zona extrafol·licular (zona de cèl·lules T) i als fol·licles de cèl·lules B. Les cèl·lules Tfh són un subset únic de cèl·lules T $CD4^+$ dins dels teixits limfoides secundaris que interaccionen amb les cèl·lules B a la zona B:T. Es caracteritzen per una alta expressió del receptor de quimiocina CXCR5, que permet a les cèl·lules Tfh migrar al lloc d'activació de cèl·lules B mediada per cèl·lules T en els teixits limfoides secundaris. Les FDC poden presentar virions de VIH infecciosos durant períodes prolongats, la qual cosa condueix a la infecció de les Tfh dins del centre germinal. També és possible que les cèl·lules T $CD4^+$ estiguin infectades fora del fol·licle i es diferenciïn en Tfh dins dels fol·licles. Les cèl·lules Tfh infectades es localitzen principalment dins dels fol·licles de cèl·lules B i centres germinals perquè els CTL no poden entrar en aquestes zones a menys que expressin CXCR5. Si els CTL expressen CXCR5, poden entrar al fol·licle, però s'ha demostrat que no són capaços de matar les cèl·lules Tfh infectades pel VIH. No obstant això, les Tfh infectades que surten del fol·licle poden ser assassinades per CTL específics contra el VIH. Extreta de: [96]

6.5.2. Teixit Limfàtic Associat a l'Intestí (GALT)

La mucosa gastrointestinal es considera una de les fonts principals de la replicació del VIH ja que hi abunden limfòcits T $CD4^+CCR5^+$ activats[97,98]. Durant la infecció primària per VIH, s'ha observat la ràpida depleció dels limfòcits T $CD4^+$ en el subcompartiment efector (lamina propria) en comparació amb la sang i, a més, la pèrdua roman irreversible inclús després de 5 anys de TAR sostinguda[99]**.** En un model d'NHP (de l'anglès, *non-human primate*) es va estimar que el GALT contenia el 62,3% de cèl·lules $ARNv^+$ abans d'iniciar la TAR, i el 98% després d'iniciar-la, convertint-se en el major santuari per a mantenir la latència del VIH[93] **(FIG 9)**.

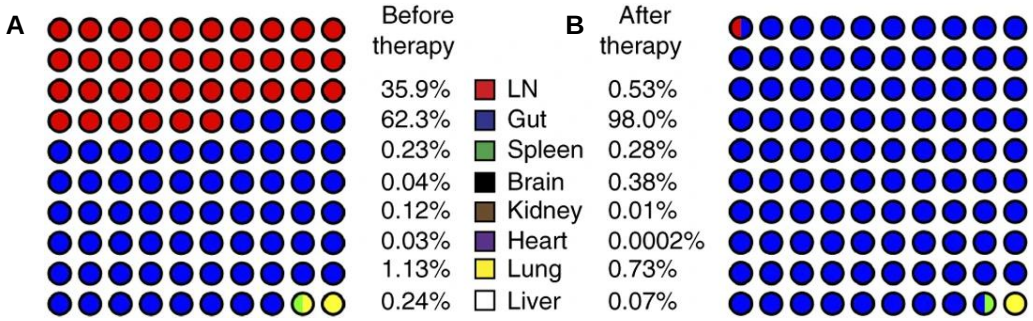


FIG 9. Representació gràfica de la proporció de cèl·lules $ARNv^+$ en cada òrgan dels macacos rhesus (A) abans i (B) després de la presa de TAR. Extreta de: [93]

En humans també s'ha pogut confirmar que la replicació viral persisteix en el colon malgrat la TAR[100] i els limfòcits T $CD4^+$ rectals tenen la major freqüència d'ADN viral integrat comparat amb la sang (4,26 vegades més) i els ganglis limfàtics (2,32 vegades més)[101]. A més, cal destacar que la infecció per VIH provoca canvis significatius en l'homeòstasi de la mucosa intestinal, per exemple, altera l'expressió d'E-cadherina en l'epiteli intestinal[102] i augmenta la deposició de col·lagen[103], el que dificultaria l'acció dels limfòcits citotòxics contra les cèl·lules infectades.

6.5.3. Models de cultiu de teixit *ex vivo* per a l'estudi de la infecció per VIH

La dificultat per estudiar les cèl·lules immunitàries en teixit en relació amb el VIH es demostra a la **TAULA 1**, on queda reflectit que les cèl·lules en sang són les més estudiades, i amb les NK és precisament on la diferència és més notable. L'estudi amb mostres de sang té els avantatges de la facilitat d'obtenció de mostres i la possibilitat d'analitzar cohorts clarament

definides de pacients. A més, l'aïllament de les cèl·lules d'interès, principalment les PBMCs, es pot realitzar amb kits comercials. En canvi, l'obtenció de mostres de teixit sanes depèn en gran mesura de reseccions de tumors, biòpsies invasives, o post-mortem. Això implica que l'obtenció de les mostres no pot ser definida per cohorts, sinó per la disponibilitat segons les malalties condicionants a sotmetre's a una operació quirúrgica, per exemple. Tot i així, són mostres molt valuoses perquè poden permetre l'estudi dels reservoris anatòmics en humans i establir models sobre l'adquisició del virus emprant explants de teixit, entre d'altres.

Cèl·lules immunitàries	Sang	Teixit	nº de vegades més estudiat
Total	**15.299**	**9.581**	**1,6**
Limfòcits T $CD4^+$	5.714	2.348	2,4
Limfòcits T $CD8^+$	1.696	455	3,7
Macròfags	605	375	1,6
Cèl·lules dendrítiques	505	302	1,7
Cèl·lules NK	**279 (1,82 %)**	**58 (0,61 %)**	**4,8**

TAULA 1. Recompte d'articles científics publicats fins al 2023 que tracten sobre cèl·lules immunitàries en el context de la infecció per VIH en sang vs. teixits. Per a la quantificació d'articles en sang es va seguir la següent estratègia de cerca en el repositori PubMed®: Human[Title/Abstract] *AND* HIV[Title] *AND* (blood *OR* circulation *OR* circulating *OR* periphery *OR* peripheral *OR* PBMCs) *AND* Journal Article[Publication Type] *NOT* Review[Publication Type]. En el cas d'articles relacionats amb teixits, l'entrada de cerca va ser la següent: Human[Title/Abstract] *AND* HIV[Title] *AND* (tissue *OR* mucosa *OR* resident *OR* residency *OR* anatomic reservoirs *OR* sanctuaries *OR* gut *OR* rectal *OR* intestine *OR* GI tract *OR* GALT *OR* vaginal *OR* cervix *OR* genital *OR* fluid *OR* brain *OR* central nervous system *OR* lymph node *OR* lymphatics *OR* tonsil *OR* spleen *OR* liver *OR* adipose *OR* fat *OR* bone marrow) *AND* Journal Article[Publication Type] *NOT* Review[Publication Type].

En el model emprat en el **TREBALL 2**, es duu a terme la infecció per VIH en explants de teixit humà, que es disseciona en petits blocs (8 mm^3) i es cultiva sobre esponges de gelatina de col·lagen per a oferir un suport estructural per a la supervivència, renovant-se el medi de cultiu freqüentment[104]. En el cas del teixit limfoide amigdalí, la replicació *ex vivo* del VIH pot desenvolupar-se en format de blocs de teixit (histocultiu limfoide humà, HLH) o de cèl·lules disperses (cultiu d'agregat limfoide humà, HLAC)[105] i ha facilitat l'estudi de paràmetres clau de la patogenicitat del VIH[106–108]. En el cas de teixits mucosos barrera com el cervicovaginal i el rectosigmoid, els explants han permès identificar factors determinants en l'entrada del VIH[109], així com agents microbicides que impedeixen l'adquisició de la infecció[110].

En el **TREBALL 2** s'ha utilitzat aquest model amb reseccions d'amígdales humanes, un teixit limfàtic secundari. Aquest mètode permet estudiar l'evolució de la infecció inicial per VIH en les cèl·lules residents en teixit, observant-se pics d'infecció *ex vivo* després d'una setmana aproximadament[105,111]. Els avantatges d'aquest enfocament inclouen la preservació de les diferents poblacions cel·lulars i la microestructura del teixit, a diferència de les cèl·lules cultivades en suspensió. No obstant això, els explants de teixit pateixen una degradació contínua i només permeten l'estudi durant un període d'1 a 2 setmanes. Malgrat aquesta limitació, per a l'estudi del comportament de les cèl·lules NK a l'inici de la infecció per VIH pot ser suficient. Per exemple, en models murins d'infecció cutània, s'ha observat que les cèl·lules NK de memòria residents a la pell s'expandeixen amb un pic de 7 dies postinfecció i després es contrauen i mantenen[112]. Una altra limitació és que, tot i que aquest model permet l'estudi de les cèl·lules NK residents al teixit, aquest es troba aïllat, i no es pot conèixer si existeix un reclutament de noves cèl·lules NK efectores. Tot i així, en models tumorals murins, s'han identificat dues categories de cèl·lules NK residents: les que resideixen al teixit i controlen inicialment l'aparició dels tumors gràcies a la producció local d'IL-15, necessària en la conversió a $CD49a^{+}CD103^{+}$; i les que s'infiltren en el tumor des de la sang i no depenen de la IL-15 sinó del factor de transcripció Nfil3[113]. Per tant, el model d'infecció per VIH-1 en explants d'amígdales humanes podria proporcionar informació valuosa sobre el comportament de les cèl·lules NK ja presents en el teixit limfàtic durant la infecció inicial per VIH, essent aquestes les primeres cèl·lules NK en combatre l'establiment del VIH.

7. Estratègies de curació

S'han definit dues formes possibles de curació del VIH: funcional i esterilitzant. En una curació funcional, existeix una supressió viral permanent, però no completa, que prevé la immunodeficiència i la transmissió en l'absència de teràpia. En canvi, en la cura esterilitzant, es busca erradicar completament totes les formes de virus competents per a la replicació[114].

Actualment, només existeixen 7 persones al món que s'haurien curat totalment de la infecció per VIH-1. La majoria coincideixen en que van rebre un transplantament hematopoètic amb cèl·lules mare d'un donant amb la deleció homozigòtica de 32 parells de bases en l'al·lel *CCR5*[115]. Com que en el transplantament s'eliminen les cèl·lules hematopoètiques del pacient i es reemplacen amb les del donant, que no expressen CCR5, el VIH no pot infectar les cèl·lules trasplantades i decau amb el temps. Per exemple, en el "Pacient de Berlín" es va observar una reducció de 3,5 logs en el seu reservori latent, i des del 2008 va reduir la virèmia fins a nivells indetectables sense necessitat de la TAR[116]. Recentment, però, també s'ha documentat la curació d'una persona amb VIH-1 que va rebre un transplantament hematopoètic de cèl·lules mare sense la mutació protectora de CCR5[117], i d'una altra persona en que les cèl·lules donants només contenien una deleció heterozigòtica per CCR5[118].

Existeixen també algunes persones conegudes com a controladores d'elit excepcionals, que no progressen en la malaltia perquè són capaces de suprimir la virèmia fins a nivells indetectables sense necessitat de TAR durant més de 25 anys[119]. En alguns casos molt específics, fins i tot podrien haver aconseguit una curació funcional espontània[120]. D'altra banda, les persones controladores post-tractament poden mantenir la càrrega viral suprimida si el tractament s'inicia de manera precoç després de la infecció[121,122]. En aquests casos, la resposta mediada per les cèl·lules NK podria tenir un paper determinant[123,124].

L'obstacle principal per assolir una cura són el reservoris cel·lulars, en els quals el VIH-1 roman latent per un llarg període d'anys, i promouen la reaparició de la virèmia tan aviat com 2 setmanes després de suspendre el tractament antiretroviral en la majoria de persones[73]. A continuació es detallen diverses estratègies enfocades a reduir i eliminar el reservori latent del VIH-1 en la població general de persones vivint amb VIH.

7.1. Anticossos neutralitzants d'ampli espectre (bnAbs)

Els anticossos neutralitzants d'ampli espectre (bnAbs, de l'anglès *broadly neutralizing antibodies*) han demostrat la capacitat de reduir el reservori viral[125], i poden afavorir la inducció de respostes T $CD8^+$ específiques contra el VIH a través dels immunocomplexos[126].

Els resultats més prometedors provenen del fet que la combinació de múltiples bnAbs pot suprimir de manera prolongada la replicació viral en absència de TAR[127]. A més, en models NHP, s'ha aconseguit induir una producció sostinguda de bnAbs[128], la qual cosa ha motivat el desenvolupament de vacunes dirigides a promoure aquesta producció sostinguda per aconseguir una remissió prolongada del VIH[129–131].

7.2. Edició gènica per CRISPR-Cas9

L'edició gènica per CRISPR-Cas9 (de l'anglès, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated system 9 (Cas9) proteins*) ha sigut estudiada per inactivar permanentment els provirus integrats per l'escissió d'un fragment[10] o la generació de grans mutacions deletèries[132]. L'endonucleasa Cas9 indueix trencaments de doble cadena (DSB) en seqüències específiques de l'ADN proviral, i la reparació de les DSB per la maquinària cel·lular tendent a l'error *non-homologous end joining* (NHEJ) condueix a mutacions d'insercions i delecions (InDel) en el provirus i suprimeix la replicació del VIH[133]. Malauradament, el provirus pot tornar-se resistent a l'acció de CRISPR-Cas9, ja que es poden generar mutacions que impedeixin l'atac de la Cas9 al prevenir la unió de l'ARN guia del sistema CRISPR/Cas9[134]. Però Wang *et al*. van identificar combinacions d'ARN guia dirigides a seqüències essencials altament conservades de l'LTR i Gag que van hipermutar el provirus generant InDels extenses, assolint-se el bloqueig sostingut de la replicació viral *in vitro* sense observar mutacions d'escapament viral[135].

7.3. *Block and Lock*

Consisteix en silenciar permanentment als provirus del VIH integrats en les cèl·lules latentment per a generar una latència profunda que bloquegi la reactivació viral. En aquest cas, s'empren agents promotors de la latència, que poden actuar sobre diferents punts de la reactivació de la transcripció dels provirus latents **(FIG 10)**. Per una banda, existeixen fàrmacs dirigits a bloquejar l'activació cel·lular i la transcripció general, però poden tenir efectes generalitzats en la transcripció cel·lular[136]. En canvi, els inhibidors del trans-activador de la transcripció (Tat) serien més prometedors, ja que la Tat és essencial per a la transcripció exponencial del provirus un cop s'ha començat a transcriure a nivell basal per la maquinària transcripcional pròpia de la cèl·lula i, per tant, seria un mecanisme dirigit específicament al VIH[137]. De totes maneres, seria necessari que els inhibidors de la Tat fossin capaços de penetrar als santuaris de la persistència del VIH, teixits com l'intestí, els ganglis limfàtics i el cervell.

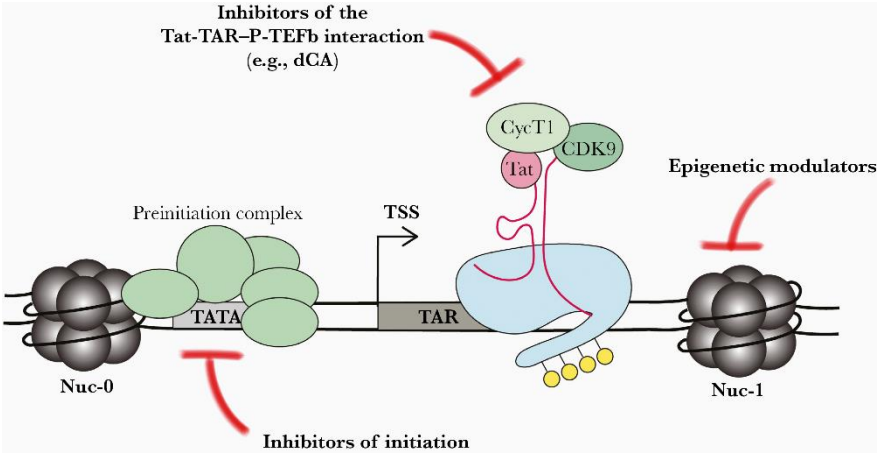


FIG 10. Dianes potencials per a l'estratègia de *block-and-lock.* La transcripció del VIH es pot bloquejar en diferents etapes. Els factors de l'hoste, com els components del complex de preinició de la transcripció, poden convertir-se en dianes per a bloquejar l'inici de la transcripció viral. D'altra banda, la Tat o altres components involucrats en la interacció amb *Tat–transactivation response element RNA (TAR)–positive elongation factor b* (P-TEFb) es poden atacar per bloquejar l'elongació de la transcripció. Per últim, amb la modulació dels factors epigenètics es pot bloquejar la transcripció. Abreviació: TSS, *transcription start site*. Extreta de: [138]

7.4. *Shock and kill*

D'altra banda, l'estratègia "*shock and kill*" consisteix en purgar a les cèl·lules latentment infectades per tal que produeixin virions i les cèl·lules infectades puguin ser eliminades naturalment per l'apoptosi induïda, efectes citopàtics del VIH-1 o el reconeixement dels limfòcits citotòxics[139]. Paral·lelament, s'administra la TAR per a bloquejar la infecció d'altres cèl·lules sanes. Tot i així, seria necessari potenciar la fase d'eliminació de les cèl·lules reactivades, ja que el VIH-1 posseeix mecanismes per a inhabilitar l'acció del sistema immunològic sobre les cèl·lules infectades[140]. A l'apartat *9.5. Estratègies dirigides a potenciar l'eficàcia de les cèl·lules NK*, així com al **TREBALL 1**, es descriuen estratègies per millorar l'eliminació de les cèl·lules reactivades per part de les NK.

7.4.1. Reversió de la latència

En el primer pas de l'estratègia de "*shock and kill*", es busca reactivar els provirus integrats en les cèl·lules latentment infectades mitjançant els agents de reversió de la latència (LRAs, de l'anglès, *latency reversal agents*) **(FIG 11)**.

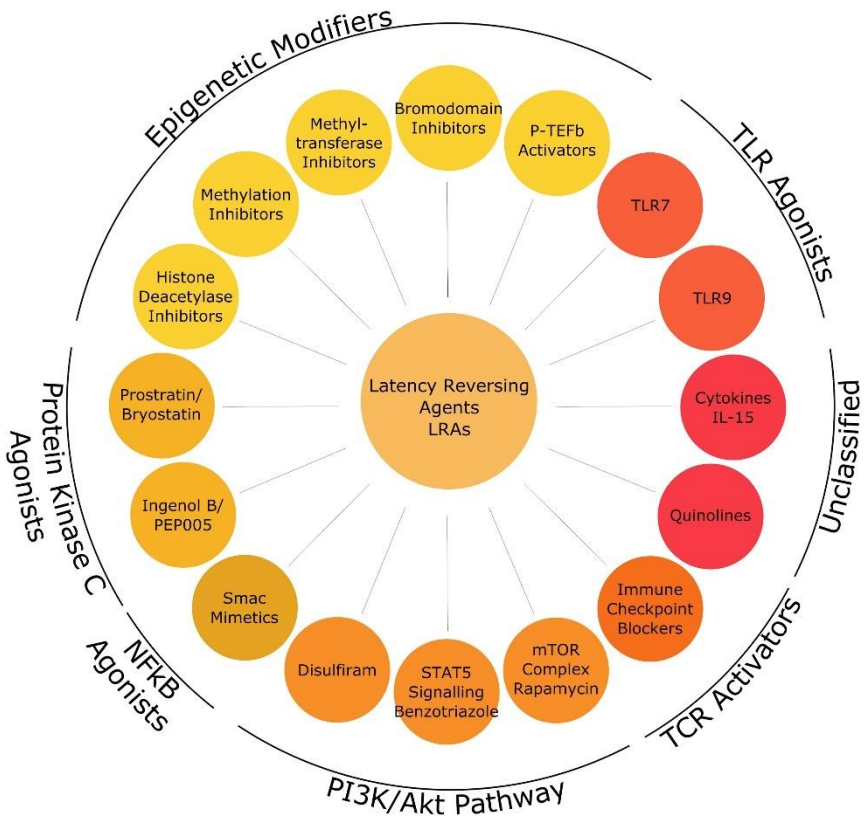


FIG 11. Classes d'agents de reversió de la latència. Els LRA poden actuar sobre diferents vies cel·lulars, resultant en la transcripció del VIH i/o la producció de virions. Extreta de: [140]

Varis LRA han demostrat la seva eficàcia modesta *in vitro*[141–143], i alguns s'han assajat *in vivo*[144–146], demostrant l'augment en la transcripció del VIH latent, però l'administració en solitari no aconsegueix disminuir el reservori viral. Per tal de mitigar els possibles efectes tòxics dels LRA i, alhora, augmentar la reactivació dels provirus, s'han dut a terme assajos preclínics amb combinacions sinèrgiques d'LRA, que actuen en diferents punts de la cascada de senyalització que promou la reactivació dels provirus integrats en latència[15,147]. En una estratègia "*shock and kill*", es van estudiar nanopartícules lipídiques (LNP) amb l'agonista de PKC briostatina-2 i l'HDACi butirat de sodi per a potenciar el seu efecte en limfòcits T $CD4^+$ de ratolins humanitzats. Les cèl·lules latents reactivades van representar

l'1,51% i el 2,99% tractades amb LNP amb briostatina-2 o butirat de sodi, respectivament, però quan els dos LRA es combinaven en una única nanopartícula, es va assolir el 33,2% de cèl·lules reactivades[148].

Altres estratègies es dirigeixen a matar directament a les cèl·lules que poden estar enriquides amb provirus del VIH. En aquest sentit, la inhibició pro-apoptòtica selectiva de Bcl-2 va eliminar *ex vivo* els limfòcits T $CD4^+$ de PVV que contenien provirus intactes del VIH i, en ratolins humanitzats, va endarrerir l'aparició del rebot viral[149].

Per últim, el bloqueig simultani de varis punts de control immunològic ha demostrat bona eficàcia per revertir la latència de les cèl·lules infectades[150]. En el **TREBALL 1** s'ha descobert que el bloqueig de KLRG1, un punt de control immunològic, pot derivar en la reactivació de cèl·lules latentment infectades, i concorda amb el fet que l'expressió de KLRG1 en la superfície de les T $CD4^+$ identifica notablement la presència d'ADN viral intacte integrat[85].

7.4.2. Afavoriment de l'eliminació de cèl·lules reactivades

Tot i que s'aconseguís la reactivació completa de les cèl·lules infectades latentment, caldria comptar amb l'eliminació eficaç d'aquestes per a realment curar la infecció per VIH. Malauradament, el sistema immunològic n'és incapaç, ja que la infecció crònica per VIH provoca una activació contínua de les principals cèl·lules citotòxiques (T $CD8^+$ i NK) i contrauen un esgotament funcional[151–154]. Les estratègies per a potenciar l'eliminació de cèl·lules infectades per part de les NK són múltiples, però es poden englobar en dues categories: la infusió de noves cèl·lules NK potenciades *ex vivo*[155,156] i l'administració de fàrmacs dirigits a potenciar les cèl·lules NK ja presents en les persones amb infecció per VIH[157,158]. A la secció *9. Alteracions funcionals*, es detallen varis mecanismes que inhibeixen la funció de les cèl·lules NK i com es poden revertir. A més, en el **TREBALL 1** es descriu una forma de millorar la resposta de les NK contra les cèl·lules infectades per VIH.

7.5. Vacunes terapèutiques

Una última estratègia dirigida a curar la infecció per VIH són les vacunes terapèutiques, que s'han centrat en induir respostes amb limfòcits T $CD8^+$ específics contra el VIH per a matar selectivament a les cèl·lules productores de virus, de forma que serien d'utilitat per a culminar l'estratègia de *shock and kill* [86]. L'objectiu de les vacunes terapèutiques seria generar una resposta immunològica antiviral ferma i sostinguda en el temps capaç de controlar per si sola, sense necessitat de la TAR, la càrrega viral i l'aparició de malalties secundàries derivades de la infecció per VIH.

L'únic assaig clínic que ha aconseguit reduir el reservori viral en humans ha sigut el REDUC (NCT02092116), que va reduir en un 40% el reservori dels participants gràcies a la immunització amb la vacuna peptídica terapèutica Vacc-4x, G-CSF (de l'anglès, *granulocyte-colony stimulating factor)* i seguit del tractament amb romidepsina, un HDACi[159]. Tot i així, no va endarrerir el rebot viral després d'interrompre la TAR. En canvi, una combinació de la vacuna terapèutica Ad26/MVA amb l'agonista de TLR-7 GS-986 en macacos rhesus infectats amb SIV i tractats amb TAR, a part d'aconseguir una disminució de la càrrega d'ADN viral en sang i ganglis limfàtics, va endarrerir l'aparició del rebot viral després de la interrupció de la TAR[160].

Moltes altres vacunes terapèutiques també han aconseguit generar respostes robustes de T $CD4^+$ i $CD8^+$ específiques contra el VIH (p. ex. AELIX-002, NCT03204617), però no van assolir cap dels objectius cabdals, reduir el reservori viral i/o endarrerir el rebot viral després de la interrupció de la TAR. Es pot trobar un recull d'aquests assajos clínics conclosos i d'altres en marxa a les revisions bibliogràfiques: [161,162]. Així, s'evidencia la necessitat de desenvolupar una vacuna terapèutica combinada amb altres elements potenciadors. Un dels assajos clínics més prometedors en marxa, l'HIVACAR (NCT03619278), està estudiant l'efectivitat d'una vacuna terapèutica combinada amb anticossos àmpliament neutralitzants i l'LRA romidepsina per assolir la remissió de la infecció crònica per VIH en persones amb TAR.

8. Cèl·lules NK

8.1. Classificació fenotípica i funcional

Les cèl·lules NK són cèl·lules granulars grans pròpies de la resposta immunitària innata que comprenen el 10-15% dels limfòcits trobats a la sang perifèrica. Principalment s'encarreguen d'eliminar cèl·lules alterades, ja sigui per una infecció viral o transformació tumoral, no requereixen d'una sensibilització antigènica prèvia, i poden perfilar la resposta immunitària adaptativa[163].

La classificació fenotípica general es basa en l'expressió en superfície del receptor CD56, sumat a l'absència dels receptors de superfície CD3 i TCR, els quals són específics de limfòcits T. Dins de les cèl·lules NK $CD3^-CD56^+$ hi trobem dues subpoblacions principals que es diferencien pels nivells d'expressió alts de CD56 ($CD56^{bright}$) o mitjans ($CD56^{dim}$) i, a més, exerceixen funcions clarament separades[163].

En sang perifèrica, el 85-90% de cèl·lules NK són CD56^{dim} (CD16^{bright}) i són potents mediadors de citotoxicitat. La senyalització a través del receptor CD16 (FcγRIII) desencadena la citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos units a les cèl·lules diana, on s'alliberen grànuls que contenen mediadors citotòxics com la perforina i diverses granzimes[163].

Per contra, la resta de cèl·lules NK són CD56^{bright} (CD16$^{-/low}$), i seguit de la seva activació, exerceixen funcions reguladores per la secreció predominant de citocines (IFN-γ, TNF-α) i quimiocines (CCL3, CCL4, CCL5)[164]. Aquestes també poden provocar respostes citotòxiques a través de l'apoptosi relacionada amb el lligand Fas (FasL) i el factor de necrosi tumoral alfa (TNF-α)[163].

D'altra banda, els seus patrons de receptors de quimiocines també difereix **(FIG 12)** i, per tant, així ho fa el seu trànsit a diferents localitzacions. Les dues subpoblacions NK expressen el receptor de quimiocina CXCR3, que guia a les NK cap als ganglis limfàtics, tot i que les CD56^{bright} l'expressen en major mesura. En canvi, receptors de quimiocines relacionats amb la inflamació de teixits (CXCR1 i CX3CR1) es troben altament expressats en les cèl·lules NK CD56^{dim} CD16^{bright}[165]. Aquestes quimiocines s'associen a respostes inflamatòries locals que es poden originar per infeccions virals agudes, així com tumors sòlids. Per tant, els hi permet migrar fins a les àrees inflamades i així poder exercir les seves respostes antivirals i antitumorals[163].

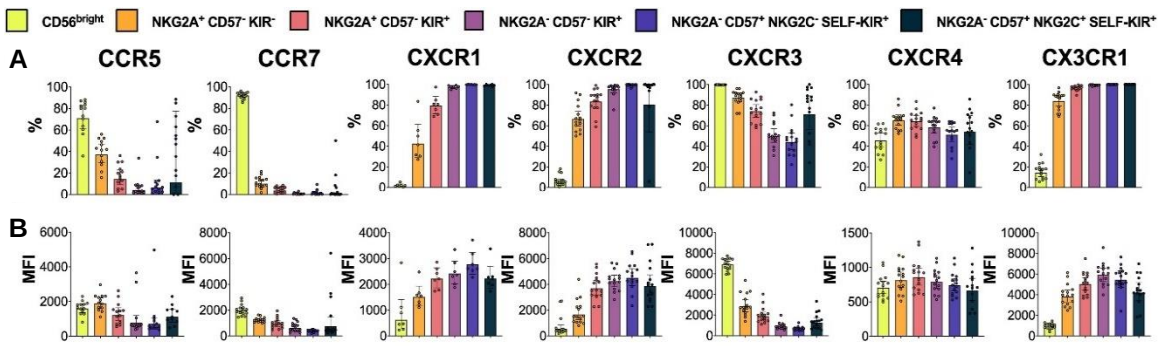


FIG 12. Els efectes de la diferenciació de les NK en l'expressió de receptors quimiotàctics. Les subpoblacions de cèl·lules NK s'identifiquen per l'expressió de CD56, NKG2A, CD57, NKG2C i KIRs, i s'ordena en base al seu estat de diferenciació. L'expressió dels receptors de quimiocines es representa com (A) % de cèl·lules que expressen el receptor i (B) *median fluorescent intensity (MFI)* dels receptors de quimiocines en la població positiva. Extreta de: [165]

Per últim, la distribució anatòmica de les dues subpoblacions també difereix. Podem trobar els òrgans limfoides secundaris enriquits en cèl·lules NK CD56^{bright}, les quals poden influenciar la resposta immunitària adaptativa mitjançant la secreció de factors solubles, en aquest cas quimiocines i citocines. Aquestes cèl·lules NK CD56^{bright} posseeixen uns llindar d'activació menor per a la secreció de citocines, si bé s'ha demostrat que el reconeixement de cèl·lules diana provoca una major producció de citocines i quimiocines en les NK CD56^{dim}[164].

En els teixits, les cèl·lules NK comparteixen espai amb les cèl·lules limfoides innates (ILCs, de l'anglès *innate lymphoid cells*), que resideixen localment sobretot en teixits de mucosa i/o inflamats[166] **(FIG 13)**.

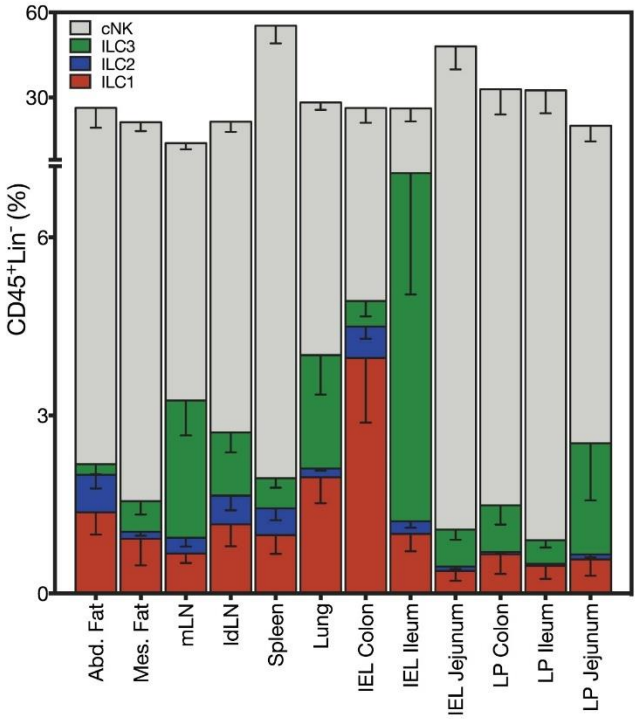


FIG 13. Distribució espacial de les subpoblacions d'ILCs humanes. Freqüència dels limfòcits quantificats per citometria de flux en 9 teixits aïllats de 44 òrgans de donants. Freqüència mitja de cèl·lules NK convencionals (gris), ILC1 (vermell), ILC2 (blau), i ILC3 (verd) expressat com el percentatge total de CD45^{+}Lin^{-} en cada teixit. Extreta de: [167]

Les ILCs es classifiquen en tres subgrups en base al seu perfil transcripcional, la seva estimulació diferencial per citocines i les seves funcions exclusives. Les cèl·lules NK s'inclouen dins del subgrup d'ILC1s. Les ILCs en general es poden identificar per l'expressió constitutiva de la cadena α del receptor de la IL-7 (CD127), i les diferents subpoblacions es

defineixen d'acord amb l'expressió de CRTH2, c-Kit (CD117) i CD56: les ILC1s són CRTH2^{-} CD117^{-}CD56^{-}, les ILC2s són CRTH2^{+}CD117$^{+/-}$CD56^{-} i les ILC3s són CRTH2^{-}CD117^{+} CD56$^{+/-}$[168] **(FIG 14)**. Resulta interessant que les característiques i funcions d'aquests tres grups de limfòcits de la immunitat innata es troben solapades amb les de les diferents subpoblacions de limfòcits T, on les cèl·lules NK s'assemblarien a les T CD8^{+}, les ILC1s a les cèl·lules Th1, les ILC2s a les Th2 i les ILC3s a les Th17.

Tant les cèl·lules NK com la resta d'ILC1s es troben íntimament relacionades en tant que les dues es caracteritzen per la producció d'IFN-γ i TNF-α en resposta a citocines. A més, requereixen la IL-15 per a la seva diferenciació, homeòstasi i funcionalitat. Els dos tipus cel·lulars també expressen els factors de transcripció T-box i HOBIT, però es diferencien en que les ILC1s necessiten el T-bet per a desenvolupar-se i les NK per madurar i, a més, les NK també requereixen d'Eomes per a la seva diferenciació i funció final[168].

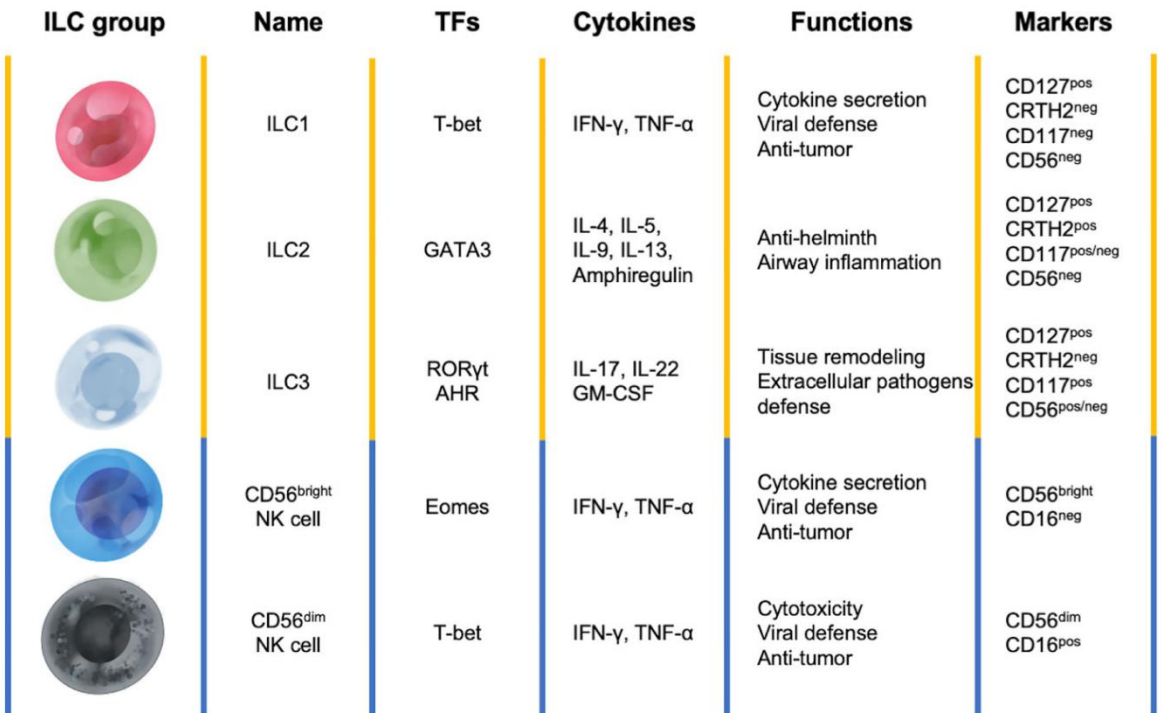


FIG 14. Funcions principals de les subpoblacions d'ILCs. Taula sumari que recull els principals factors de transcripció que governen el seu desenvolupament, la producció de citocines, les seves funcions i l'expressió de marcadors en les diferents subpoblacions d'ILCs. Extreta de: [168]

Dins de les ILC1s, recentment s'ha descrit una subpoblació citotòxica en la mucosa intestinal i de les amígdales molt similar a les cèl·lules, les cèl·lules intraepitelials de tipus ILC1s (de l'anglès, *intraepithelial-like ILC1s*, ieILC1s)[169].

Aquestes es defineixen per l'expressió de CD56, Eomes, T-bet, nivells variables de NKp44 i CD103, i baixos nivells de CD94 i CD127. Els assajos funcionals *in vitro* demostren que poden respondre a l'estimulació amb IL-12 i IL-15 secretant IFN-γ, i degranulen molècules citolítiques quan s'exposen a cèl·lules diana[170]. Així doncs, la seva identitat com vertaderes ILC1s i no pas cèl·lules NK residents en teixit es troba en disputa perquè expressen mediadors citolítics, T-bet i Eomes[169].

A més a més, s'ha descobert que les ILC3s poden adquirir característiques pròpies de les cèl·lules NK quan també s'estimula la seva diferenciació amb IL-12 i IL-15, ja que actuen sobre l'expressió d'Eomes, el factor de transcripció principal de la citotoxicitat. Això provoca que les ILC3s es converteixin en cèl·lules citotòxiques amb expressió de marcadors de cèl·lules NK com CD16, NKG2C, perforina i granzimes[171].

Donat aquests fets, cal destacar que la comunitat científica considera que el mapa precís de les ILCs humanes en teixit encara es troba sota construcció. Principalment és degut a que hi ha marcadors que no són del tot exclusius de cada subpoblació i que les ILCs sofreixen el fenomen de la plasticitat i, per tant, poden interconvertir-se en diferents subpoblacions en funció dels estímuls de l'entorn **(FIG 15)**. Resumidament, les ILC2s i ILC3s es transdiferencien a ILC1s en resposta a la IL-1β i IL-12, mentre que la IL-1β i la IL-23 poden derivar a les ILC1s i ILC2s en ILC3s. Les ILC2s també requereixen de TGF-β a part de IL-1β i IL-23 per convertir-se en ILC3s i, a més, la IL-4 reverteix la transdiferenciació de les ILC2s. En el cas de la transició d'ILC3s productores d'IL-22 a ILC1s productores d'IFN-γ, s'ha trobat decisiu el factor de transcripció Aiolos[172]. Per últim, quan les cèl·lules NK es troben en un microambient ric en TGF-β, com en el cas dels tumors, es transdiferencien a cèl·lules de tipus ILC1s que han perdut la seva activitat citotòxica[173,174]. Es considera que la plasticitat de les ILCs és un mecanisme de les ILCs residents en teixit per a adaptar-se dinàmicament als estímuls, com en el cas d'un estat inflamatori[175].

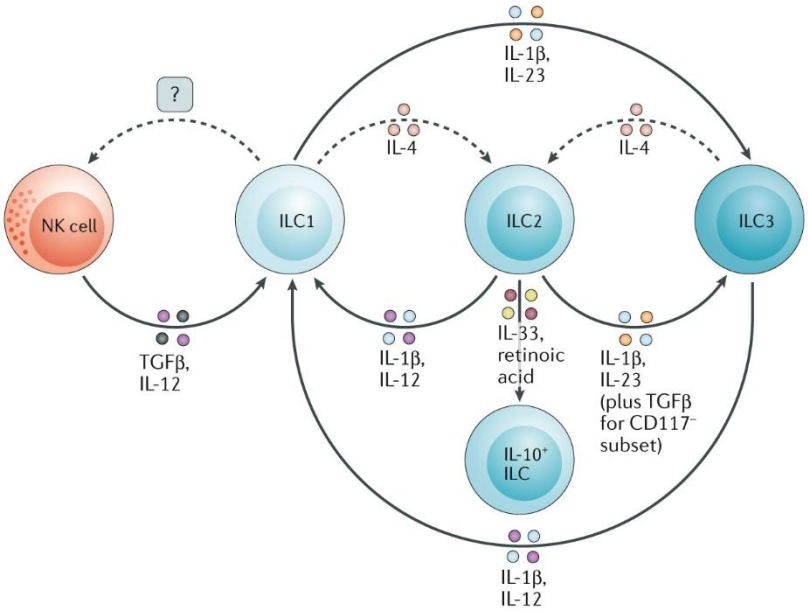


FIG 15. Plasticitat de les cèl·lules limfoides innates (ILCs). Les ILC2s i ILC3s es poden transdiferenciar a ILC1s en resposta a la IL-1β i IL-12, mentre que la IL-1β i IL-23 poden convertir les ILC1s i ILC2s a ILC3s. La transdiferenciació d'ILC2s a ILC1s o ILC3s es pot revertir amb la IL-4. Les ILC2s també poden guanyar la producció d'IL-10 en resposta a IL-33 i àcid retinoic. El TGF-β i la IL-12 poden induir un fenotip de tipus ILC1s en las NKs. La subpoblació d'ILC2s CD117⁻ també requereix de TGF-β sumat a la IL-1β i IL-23 per a diferenciar-se a ILC3s. Les línies sòlides indiquen les vies demostrades de transdiferenciació, mentre que les línies puntejades fan referència a vies menys ben definides. Extreta de: [176]

8.1. Ontogènia

Les ILCs majoritàriament resideixen en teixits, mentre que en circulació es troben els precursors d'ILCs (pan-ILCPs), els quals són $CD127^+CD117^+$ i generen in situ les diferents ILCs en resposta als senyals de l'ambient local[177]. Els precursors són cèl·lules $CD34^+CD45RA^+$ que s'originen en la medul·la òssia i migren als teixits extramedul·lars on tenen lloc els estadis més tardans del desenvolupament de les cèl·lules NK. Concretament, les amígdales, els ganglis limfàtics i la melsa es consideren els OLS que principalment acullen el desenvolupament i maduració de les NK[178] **(FIG 16)**.

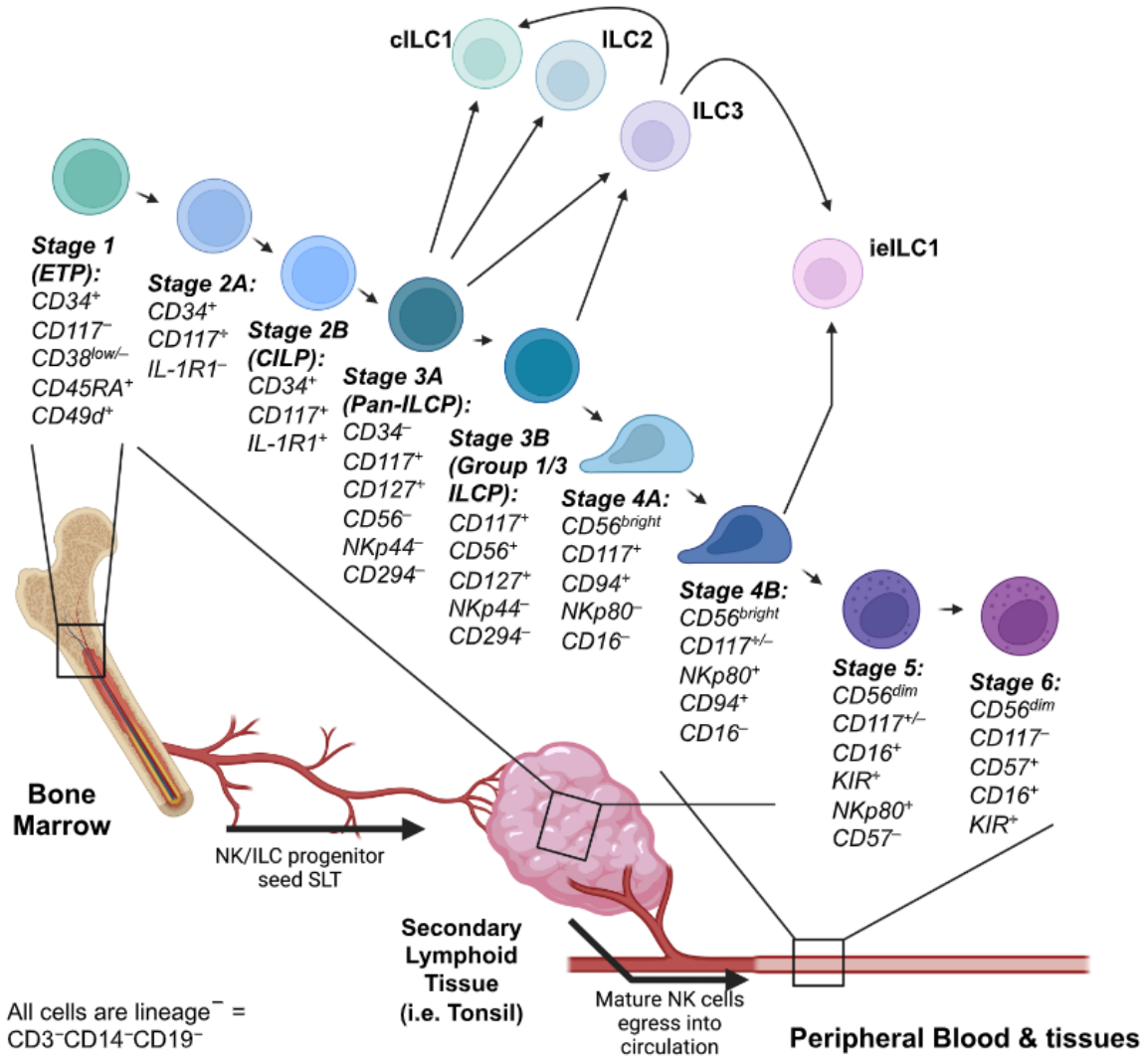


FIG 16. Les trajectòries de desenvolupament de les cèl·lules NK humanes i les ILCs es troben marcades per la pèrdua de potencials llinatges i canvis en el repertori de receptors de superfície. Aquest model representa als progenitors CD34+ sortint de la medul·la òssia per migrar als lloc perifèrics de diferenciació, com els teixits limfoides secundaris, on les NK i ILCs poden finalitzar la seva maduració abans d'accedir a la circulació o establir la residència en els teixits. Extreta de: [179]

8.2. Mecanisme d'acció

Les funcions efectores de les cèl·lules NK es troben controlades per una extensa família de receptors activadors i inhibidors **(TAULA 2)**, on la integració dinàmica dels senyals que transdueixen condueix a un balanç final que determina l'activació o inhibició de la cèl·lula NK quan "escorcolla" una possible cèl·lula alterada en busca de proves que així ho demostrin [6]. Segons el model del reòstat, un cop decideix si la cèl·lula que està escanejant està alterada, la cèl·lula NK degranularà compostos citotòxics **(FIG 17)** i/o secretarà citocines i

quimiocines per alterar l'entorn i modular la resposta immunitària. Així doncs, la decisió final d'activar-se o no és complexa, com queda reflectit a la **TAULA 2**.

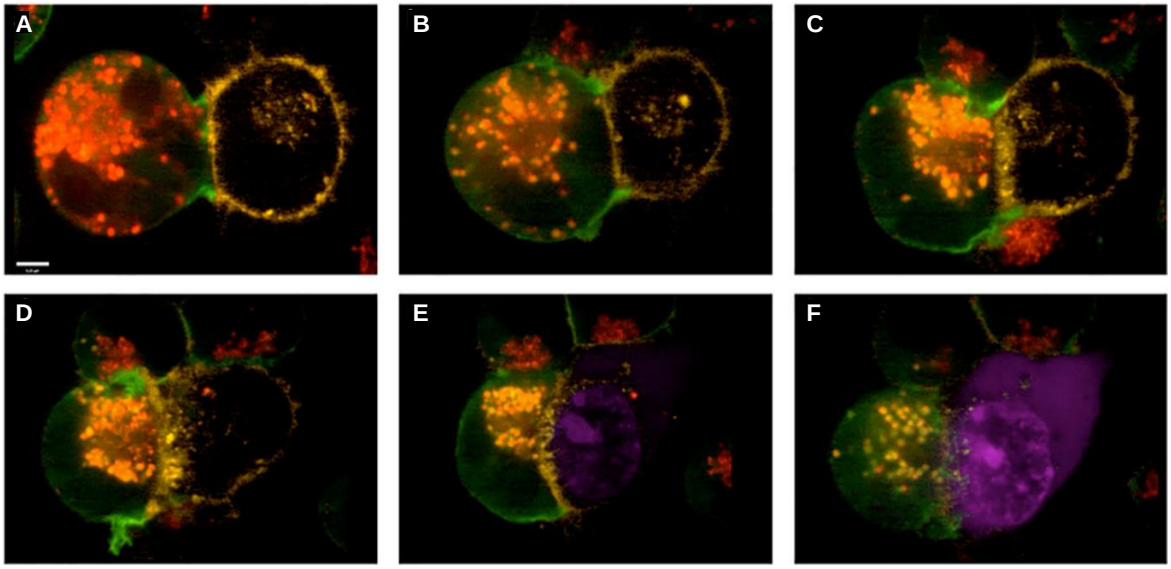


FIG 17. Etapes seqüencials durant la citotoxicitat mediada per cèl·lules NK. Les cèl·lules NK es van marcar amb actina YTS-GFP (verd) i els seus grànuls lítics amb *Lysotracker Red* (vermell). Es van coincubar amb les cèl·lules diana 721.221 marcades amb *CellMask* (groc) en presència de *SYTOX Blue* per a la detecció de les cèl·lules mortes. Les cèl·lules conjugades es van observar per microscopia confocal de disc giratori durant 90 minuts. Les microfotografies mostrades es van prendre cada 15 minuts aproximadament. **(A)** La cèl·lula NK es troba conjugada a la cèl·lula diana, però els grànuls lítics estan dispersats. **(B)** Els grànuls convergeixen al *microtubule-organizing center* (MTOC). **(C)** El MTOC amb els grànuls lítics convergits es polaritzen a la sinapsi immunològica. L'actina-F es reorganitza clarament de la A a la C. **(D)** S'observa més actina-F reorganitzada i els grànuls lítics es troben ancorats a la membrana plasmàtica. **(E)** La mort de la cèl·lula diana s'inicia quan el *SYTOX Blue* entra a la cèl·lula. **(F)** La cèl·lula diana sofreix l'apoptosi i la cèl·lula NK es prepara per a desancorar-se, fet que s'intueix per la inversió en el canvi de forma. Barra de mesura = 4 µm. Extreta de: [180]

Família de receptors	Receptor	Funció	Lligand(s)
Receptor del Fragment Cristal·litzable (FcR)	CD16	Activadora	IgG
Receptor de Citotoxicitat Natural (NCR)	NKp30	Activadora	Lligand propis de bacteris, virus i cèl·lules tumorals
	NKp44		
	NKp46		
Lectina de Tipus C	NKG2A	Inhibidora	HLA-E
	NKG2C	Activadora	HLA-E
	NKG2D	Activadora	MIC-A, MIC-B, ULBP1-6, Rae-1
	NKG2E	Activadora	HLA-E
Killer-Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR)	2DS1-5, 3DS1	Activadora	HLA de classe I i desconegut
	2DL1-3, 2DL5, 3DL1-3DL3	Inhibidora	
	2DL4	Activadora i inhibidora	

TAULA 2. Classificació dels receptors activadors i inhibidors de les cèl·lules NK. Adaptada de: [181]

Més enllà de l'equilibri entre senyals activadors i inhibidors transduïts pel reconeixement de lligands en les cèl·lules diana, el procés d'ancoratge i perpetuació de la degranulació es troba regulat en molts punts de control; s'han descrit fins a 48. Es comença pel reconeixement i ancoratge a la cèl·lula diana, seguit pel procés de formació de la sinapsi immunològica per a l'alliberament de grànuls lítics i es conclou amb la terminació i desancoratge de la cèl·lula NK. És pot trobar un recull altament detallat de tots els passos que hi tenen lloc a la revisió feta per Mace *et al*.[180].

La força dels senyals rebuts, així com la seva durada, té implicacions destacables en les molècules efectores que les cèl·lules NK podran produir, sent la degranulació un procés menys demandant d'estimulació que la secreció d'IFN-γ **(FIG 18)**. Apart d'alliberar grànuls citotòxics que contenen perforina i granzimes, les cèl·lules NK poden matar a través dels lligands de mort cel·lular, un mecanisme que sol predominar després que la cèl·lula NK hagi degranulat diverses vegades[182].

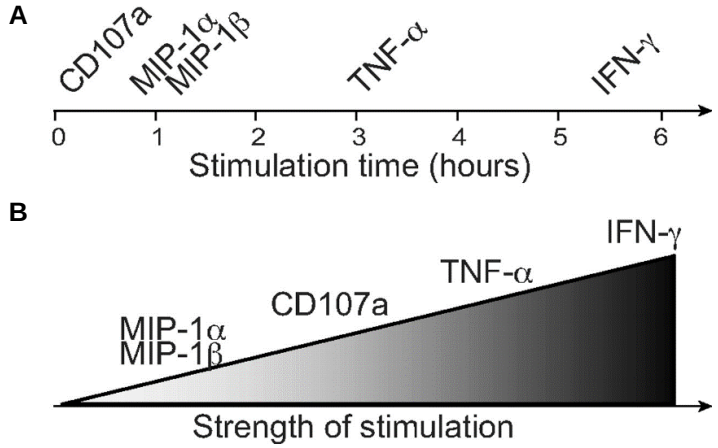


FIG 18. Representació esquemàtica dels llindars d'activació i la cinètica de les respostes mediades per les cèl·lules NK CD56^{dim}. (A) Els temps aproximats requerits per a la inducció de les diferents respostes mediades per cèl·lules NK, com són la degranulació (expressió en superfície de CD107a), secreció de quimiocines (MIP-1α i MIP-1β) i citocines (IFN-γ i TNF-α), s'indiquen a l'escala de temps. **(B)** Força relativa del senyal requerit per a la inducció de les diferents respostes mediades per cèl·lules NK. Extreta de: [164]

8.2.1. Detecció de cèl·lules infectades per l'alteració dels lligands de cèl·lules NK

Quan una cèl·lula s'infecta pel VIH, són diversos els mecanismes pels quals alerten a les cèl·lules NK que han sigut infectades. El més comú és l'increment en l'expressió en superfície de lligands d'activació de les cèl·lules NK. Principalment s'ha observat la sobreexpressió dels lligands de NKG2D ULBP-1, -2 i -3, a més del lligand per l'NKp44[183]. D'altra banda, algunes soques virals poden baixar l'expressió de l'HLA-C, i així s'evita la inhibició de cèl·lules NK que expressen receptors KIR inhibidors[184].

En canvi, les cèl·lules infectades que han perdut l'expressió de CD4 també poden evitar el seu reconeixement baixant l'expressió de lligands d'activació, com el MIC-B i el CD112[185], lligands dels receptors d'activació NKG2D y DNAM-1, respectivament.

Malauradament, també poden suposar mecanismes "trampa". El lligand pel receptor NKp44 pot ser sobreexpressat en els limfòcits T CD4$^+$ degut al contacte amb el pèptid viral S3 de la proteïna gp41[186], però sense la necessitat que siguin infectats. S'ha descrit que això provoca la depleció de les cèl·lules T CD4$^+$. De fet, s'ha descobert que en les persones anomenades controladores d'elit, perquè poden controlar naturalment la infecció, les NK no sobreexpressen el receptor NKp44 quan s'activen[187], i aquest fet podria prevenir l'eliminació desmesurada de limfòcits T CD4$^+$.

8.3. Cèl·lules NK de tipus memòria

8.3.1. Cèl·lules NK de memòria en sang

Malgrat que les cèl·lules NK són limfòcits de la immunitat innata i que la seva vida mitja ronda els 12 dies[188], hi ha varis estudis que suggeririen l'existència de cèl·lules NK de tipus memòria (de l'anglès, ml-NKs), identificades amb el fenotip $CD56^{dim}NKG2A^{-}NKG2C^{+}CD57^{+}$ en sang. Les ml-NKs s'expandeixen durant una infecció aguda i mostren característiques com una resposta recordatori de memòria i una vida mitja prolongada[189], amb una capacitat citotòxica i de secretar IFN-γ potenciada a través de l'ADCC, tot i ser menys responsives a la IL-12 i IL-18[190] **(FIG 19)**. En el cas de tumors, s'ha demostrat que l'exposició prèvia de cèl·lules NK a cèl·lules tumorals promou una millor eliminació de noves cèl·lules tumorals en comparació amb la inducció de cèl·lules NK de memòria induïda per IL-12 i IL-18[191]. El cas millor descrit en infeccions virals és en l'expansió produïda en resposta a la infecció amb el citomegalovirus humà (de l'anglès, HCMV)[192], que podem destacar perquè la coinfecció amb HCMV en persones amb VIH és pràcticament universal[193]. En la infecció aguda per VIH, s'ha demostrat que l'activació de les cèl·lules NK i l'expansió de les ml-NKs ocorre molt poc temps després de la transmissió del VIH, abans de l'activació dels limfòcits T, i aquesta expansió no es veu alterada amb la TAR[194]. Recentment en humans, Jost, *et al*. van acabar d'identificar el mecanisme específic de generació de memòria en les cèl·lules NK de sang per la infecció amb VIH. Es va demostrar que les cèl·lules NK poden ser específiques del VIH pel reconeixement de pèptids virals presentats per l'HLA-E en les cèl·lules infectades i reconegut per l'NKG2C[195].

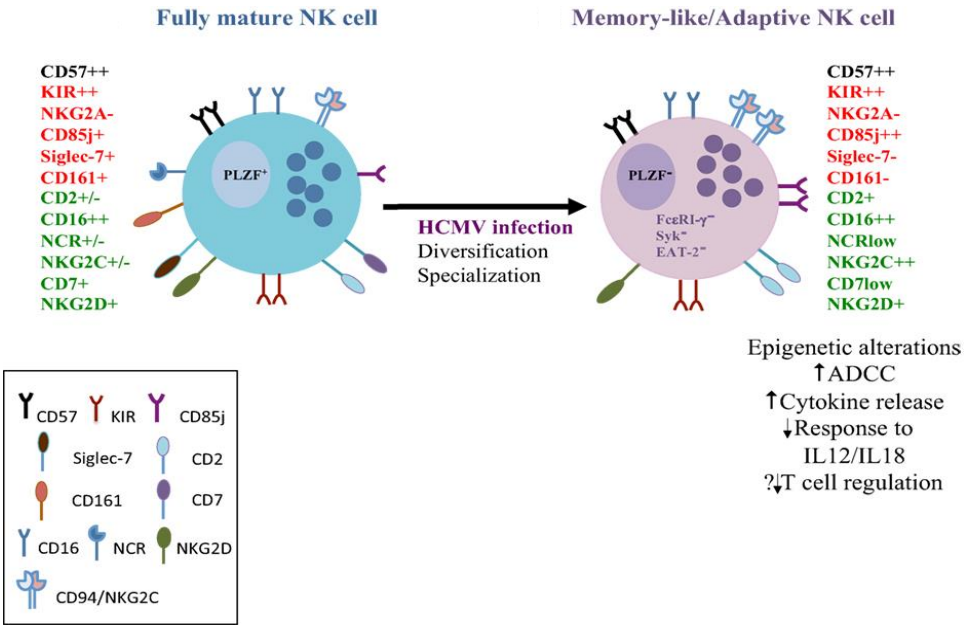


FIG 19. Característiques fenotípiques, funcionals i moleculars de les cèl·lules NK de memòria en front a l'HCMV. Característiques dels receptors d'NK madures i adaptatives. També es mostra un resum de les característiques funcionals principals de les cèl·lules NK adaptatives. Extreta de: [193]

8.3.2. Cèl·lules NK de memòria residents en teixit

Si bé les cèl·lules NK en sang són les millor caracteritzades, les cèl·lules NK poden tenir fenotips i funcions específiques de cada òrgan i teixit[196] **(FIG 20)**. Per exemple, en teixits mucosos com l'intestí i les amígdales, les cèl·lules NK pertanyen majoritàriament a la subpoblació CD56^{bright} i són productores de citocines, al contrari que en sang **(FIG 21)**. En la decídua, hi trobem una població de cèl·lules NK particular encarregada del remodelatge vascular placentari, el creixement fetal i la memòria de l'embaràs[197–199]. A més, mitjançant nanotúbuls injectors de granulisina, són capaces d'eliminar selectivament els bacteris intracel·lulars (*Listeria monocytogenes*) dins dels trofoblasts sense matar la cèl·lula en sí mateixa[200].

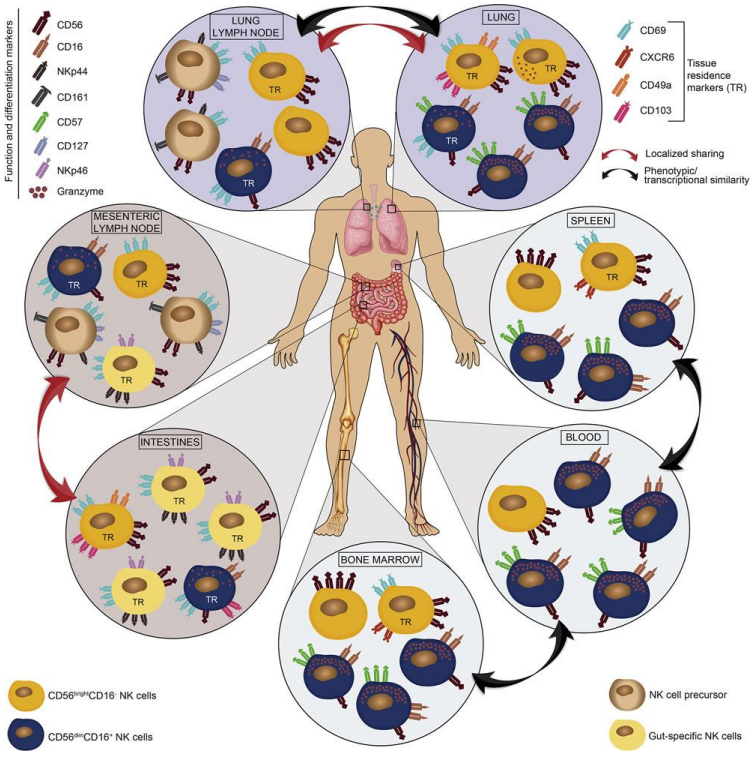
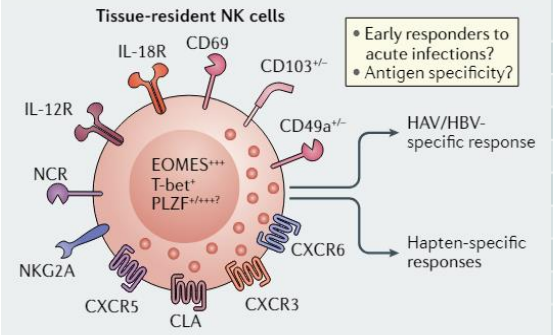


FIG 20. Patrons específics en la distribució, maduració i funció de les cèl·lules NK dels teixits. Extreta de: [196]



	CD56hi	CD56dim (less differentiated)	CD56dim (more differentiated)	CD56dim (adaptive-like)	Tissue resident*
Cytokine receptors	+++	+++	++	+	+/–
NKG2C	–	–	+	+++	+/–
FcεRγ	++	+++	+++	+/–	NA
NKG2D	+++	++	++	++	++
NCR	+++	++	++	+	++
CD16	+/–	++	++	+++	+/–
KIRs	–	+	++	+++	+/–
NKG2A	+++	++	+	+/–	+++
CD57	–	++	++	+++	+/–
Cytotoxic granules	+	++	+++	+++	+
Tissue-residency markers	+/–	–	–	–	+++

FIG 21. Comparativa de les cèl·lules NK residents en teixit amb les subpoblacions descrites a la circulació. Extreta de: [201]

Les cèl·lules NK residents poden romandre en els teixits gràcies als receptors de retenció CD69, CD49a i CD103 **(FIG 22)**. En el procés d'infiltració a un teixit de destí, les cèl·lules NK primer sobreexpressen CD69, que interfereix amb el S1PR1 (de l'anglès, *sphingosine-1-phosphate receptor-1*) i bloqueja efectivament la reentrada al torrent sanguini[202,203]. Seguidament, el microambient tissular influencia l'expressió de marcadors de residència addicionals, com el CD49a (unió al col·lagen IV)[204] i el CD103 (unió a l'E-cadherina intraepitelial)[205,206], en resposta a la inflamació local i les citocines produïdes per les cèl·lules de l'entorn[207–209].

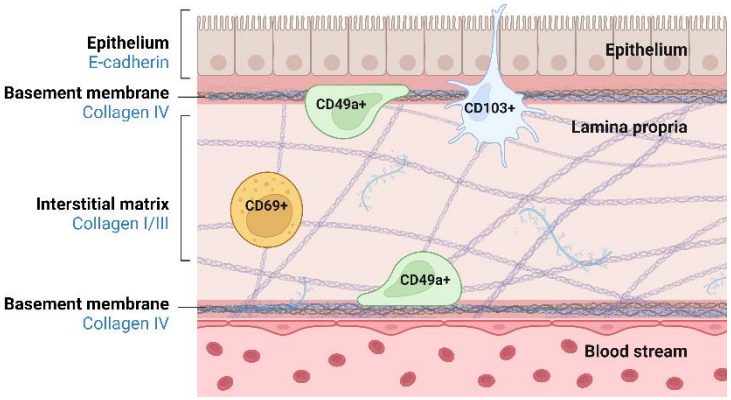


FIG 22. Representació de la distribució espacial dels limfòcits residents en teixit basada en l'expressió de marcadors de residència. Creada amb Biorender.com

En el cas de les amígdales, les cèl·lules fibroblàstiques reticulars produeixen un ambient ric en IL-15[209], que és clau per a l'expressió de CD49a[210] i afavorir el desenvolupament i proliferació de les cèl·lules NK. D'altra banda, les cèl·lules epitelials de l'intestí poden produir IL-15 en homeòstasi per promoure la supervivència i maduració de les cèl·lules NK residents[211]. Per contra, la inducció de CD103 es induïda per la citocina immunosupressora TFG-β[212], que es produeix per a regular la resposta inflamatòria quan una infecció o tumor està acabant de resoldre's[213]. Més enllà d'aquests tres marcadors clau per identificar limfòcits residents en teixit, també s'han descobert factors de transcripció altament enriquits, com el Runx2[214,215], Runx3[215] o Blimp-1[112] i, en especial, el Rgs-1[216].

Cal destacar que la coexpressió d'aquests marcadors de residència, a part d'indicar la localització en el teixit, també poden relacionar-se amb funcions diferenciades. Per exemple, les cèl·lules NK $CD16^{-}CD49a^{+}$ de diversos teixits sans sobresurten en la producció d'IFN-γ[217], però no degranulen notòriament si no s'estimulen amb IL-15[218]. En condicions patològiques, com en tumors pulmonars, s'ha observat que les cèl·lules NK $CD16^{-}CD49a^{+}$ intratumorals degranulen més que les $CD49a^{-}$[219]. A més, s'ha descobert que les cèl·lules NK $CD16^{-}CD49a^{+}KIR^{+}NKG2C^{+}$ de pulmó adquireixen funcions de memòria contra el virus de la grip i, a més, són independents de les cèl·lules NK de tipus memòria clàssiques que s'expandeixen en sang contra l'HCMV[220]. Les respostes de memòria de les cèl·lules NK $CD16^{-}CD49a^{+}$ també apareixen en resposta al virus Varicela Zòster (VZV)[221] i als de l'Hepatitis A i B[222]. En aquests casos, les cèl·lules NK residirien durant anys en el fetge i poden mobilitzar-se fins al teixit infectat per ràpidament fer front a aquests virus. Recentment s'ha demostrar en models murins que, en infeccions virals i bacterianes cutànies, existeix un reclutament de cèl·lules NK convencionals de la sang i es diferencien a $CD69^{high}Tcf^{high}$ gràcies al factor de transcripció Blimp-1[112]. A més l'associació entre el factor de transcripció Tcf i la memòria en les cèl·lules NK també s'ha observat en cèl·lules NK $CD94^{+}NKG2C^{+}$ $CD56^{high}$ en sang de PVV[223]. Després d'una infecció secundària amb una mateix patogen, les cèl·lules NK residents ràpidament guanyarien citotoxicitat i mostrarien una resposta accelerada[112]. Cal destacar que els autors també van demostrar que aquestes cèl·lules NK que estableixen residència en el teixit arran d'una infecció es diferencien de les cèl·lules NK residents que es desenvolupen normalment en el teixits[112].

9. Alteracions funcionals

9.1. Esgotament funcional

Un dels principals inconvenients en l'ús dels limfòcits citotòxics propis de persones vivint amb VIH és que freqüentment es troben alterats, esgotats funcionalment arran de la inflamació crònica provocada per la infecció amb VIH. L'esgotament funcional consisteix en la pèrdua progressiva de la capacitat proliferativa i de producció de citocines, a més de la citotoxicitat en els cèl·lules T $CD8^+$ i NK, i s'associa a una expressió incrementada de receptors coinhibidors en superfície[224]. L'expressió d'aquests receptors inhibidors sol augmentar després de l'activació cel·lular com a mecanisme limitant, pel que reben el nom de punts de control immunològic. Quan finalitza una resposta immunològica, la seva expressió decau, però si l'exposició a antígen es cronifica, poden persistir en la superfície cel·lular[225,226].

Per exemple, les cèl·lules T $CD8^+$ exhaustes es poden detectar en persones amb la infecció crònica per VIH malgrat el tractament efectiu amb antiretrovirals. En comparació amb els limfòcits T $CD8^+$ en persones sanes i controladors d'elit, les cèl·lules T $CD8^+$ específiques de VIH en persones virèmiques mostren un fenotip d'alta expressió de PD-1 i TIGIT que no decau amb l'administració de la teràpia antiretroviral[153].

En el cas de les cèl·lules NK, s'ha demostrat que el PD-1 es troba preformat en els grànuls citotòxics de les cèl·lules NK i, aleshores, es mobilitza ràpidament a la membrana de les cèl·lules NK durant la degranulació[227]. *In vitro*, l'estimulació continuada de cèl·lules NK adaptatives a través del NKG2C i combinat amb IL-15, tot i generar una proliferació i activació robusta, comporta una inducció simultània dels punts de control immunològic (ICs, de l'anglès, *immune checkpoints*) LAG-3 i PD-1 i pèrdua d'eficàcia contra cèl·lules tumorals[152]. Concretament en la infecció per VIH, s'ha observat que la infecció per VIH-1 pot provocar un augment en l'expressió dels lligands d'inhibició HLA-E[228] i CD155[229], alhora que també augmenta ICs com el TIGIT[229] i el PD-1[230].

Així doncs, encara que s'aconseguís revertir l'estat de latència de les cèl·lules que contenen provirus amb capacitat de replicar virus competents, calen estratègies per recapacitar als limfòcits citotòxics contra el VIH. Aquest enfocament es desenvolupa en la secció *9.5.2. Bloqueig dels punts de control immunològic (ICB)*.

9.2. Ineficàcia de les cèl·lules NK per eliminar la infecció per VIH

En el curs natural de la infecció per VIH, les cèl·lules NK inicialment controlen l'expansió viral, però arriba un punt en què les cèl·lules NK s'esgoten funcionalment i la infecció es cronifica. El VIH conté proteïnes accessòries capaces de modificar la cèl·lula infectada de tal manera que passi desapercebuda per les cèl·lules NK. A la **FIG 23** es representen les proteïnes virals que eviten o provoquen l'expressió de lligands d'activació i inhibició de les NK, respectivament.

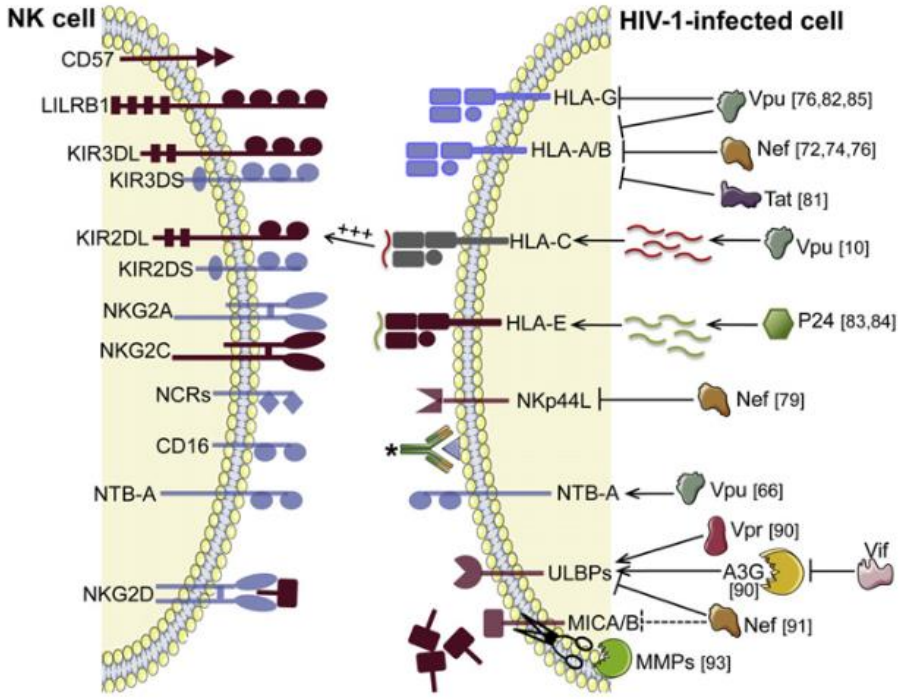


FIG 23. Canvis principals en l'expressió de receptors de cèl·lules NK i els seus lligands per la infecció per VIH-1. El panell de l'esquerra representa els principals canvis produïts en l'expressió dels receptors de cèl·lules NK per la infecció crònica per VIH-1, mentre que el panell de la dreta mostra com les proteïnes virals, així com proteïnes cel·lulars induïdes per la infecció, poden afectar l'expressió de lligands d'activació i inhibició de les cèl·lules NK. Vermell fosc: expressió incrementada; vermell fosc translúcid: expressió induïda contrarestada per les proteïnes del VIH-1 o factors cel·lulars induïts pel VIH-1; blau translúcid: expressió disminuïda; gris: expressió estable; *: anticòs VIH-1 específic. Extreta de: [231]

S'ha observat que les NK KIRs^{+} poden exercir pressió immunològica sobre el VIH-1, i el virus pot evadir-la a través de la selecció de polimorfismes específics dels KIRs inhibidors en persones amb infecció crònica amb VIH[232]. Aquest fet milloraria la unió de cèl·lules NK amb KIRs inhibidors i reduiria el seu efecte antiviral.

Existeixen varis haplotips de receptors KIR i lligands HLA que s'han associat amb diversos desenllaços de la infecció per VIH, relacionant-se amb: la resistència a contraure la infecció (homozigosi de *KIR3DS1*[233] i homozigosi de *KIR3DL1* combinada amb *HLA-B*57*[234]), alentir la progressió a SIDA (*KIR3DS1:HLA-B Bw4-80I*[235,236]) o accelerar-la (*HLA-B*46*[237]). A més, el *mismatch* al·logènic en la combinació KIR/HLA entre la persona infectada donant i la parella sexual recipient també protegeix de contraure el VIH[238].

En els teixits limfoides secundaris s'ha observat que, durant el primer any de la infecció, les cèl·lules NK no estan alterades, de fet, tenen menor expressió de receptors inhibidors, estan més activades, i expressen alts nivells del lligand de mort TRAIL[239]. Tot i així, s'ha trobat que hi ha poca infiltració de cèl·lules NK KIRs$^+$, fet associat a una expressió reduïda de CX3CR1[239], i això podria permetre que el VIH repliqui profusament en els teixits limfoides.

En macacos rhesus (*Macaca mulatta*), la infecció incrementa significativament l'expressió del marcador de *homing* a intestí α4β7 i redueix l'expressió de CCR7, que dirigeix a les cèl·lules NK cap als ganglis limfàtics[240]. En aquests, no hi apareix una major infiltració de cèl·lules NK però sí que s'ha descrit en macacos que augmenta la freqüència de cèl·lules NK CD16$^+$ citotòxiques[241]. En canvi, en humans, les cèl·lules NK ràpidament expressen marcadors de reclutament (CCR7) cap als ganglis limfàtics per combatre l'expansió de la infecció, però no per dirigir-se cap a l'intestí (α4β7)[242], un altre dels principals llocs d'establiment del VIH.

En el colon humà s'hi ha descrit que tant les cèl·lules NK intraepitelials com de la lamina propria es redueixen en la infecció crònica per VIH, mentre que els controladors espontanis mantenen les freqüències de cèl·lules NK en intestí i s'expandeixen en els individus tractats amb antiretrovirals però que no responen immunològicament[102]. En macacos rhesus, mediadors inflamatoris intestinals com la indoleamina 2,3-dioxigenasa 1 promouen la citotoxicitat i producció d'IFN-γ d'ILCs NKp44$^+$ inicialment productores d'IL-17 i IL-22[243]. Anys després, s'ha comprovat que la IL-12 pot augmentar l'expressió de CD94 en les ILC3 i induir l'adquisició de citotoxicitat[244].

9.2.1. Les cèl·lules NK CD56$^-$CD16^{bright} de sang en la infecció per VIH

En la infecció crònica per VIH s'ha identificat una elevada expansió de cèl·lules NK disfuncionals en sang[245], fins a un 15-20% que es convertirien al fenotip CD56$^-$CD16^{bright} i que també es poden detectar en persones tractades adequadament[246]. Es tracta de cèl·lules NK madures que expressen KIRs, NKG2A i NKG2C i d'altres NCRs de forma similar a les

cèl·lules NK més citotòxiques, les $CD56^{dim}CD16^{bright}$. Malgrat tot, mostren una capacitat minvada per a la producció d'IFN-γ, i només conserven la capacitat de degranulació. En persones amb infecció crònica per VIH, les cèl·lules NK $CD56^{-}CD16^{bright}$ presenten una expressió elevada de CD107a però baixa de granzima B i perforina en abscència d'estimulació *in vitro*, fet que suggeriria que han sigut recentment activades per d'altres cèl·lules diana en la sang dels donants[247].

Cal remarcar que el receptor CD56, expressat ubiquament en totes les cèl·lules NK en condicions normals, és de gran importància perquè estabilitza la sinapsi immunològica[248] i regula la migració de les cèl·lules NK humanes a través de la modulació de la dinàmica de l'actina i el recanvi d'integrines[249].

9.2.2. Citotoxicitat reduïda de les cèl·lules NK residents en teixit

Els teixits mucosos exposats a l'ambient, on abunden antígens forans i bacteris comensals, presenten mecanismes per a mantenir una tolerància homeostàtica que no desencadeni una resposta inflamatòria nociva versus al propi teixit. Per això, sense una estimulació adequada, les cèl·lules NK d'amígdala[250] i intestí[251] mostren una pobra activitat citotòxica. En canvi, hi abunden altres poblacions innates amb funcions reguladores, com les ILC3 que secreten IL-17 i IL-22 per a la regeneració epitelial[172].

A més, s'ha demostrat que els components de la matriu extracel·lular dels teixits (p. ex. col·lagen i elastina) exerceixen efectes immunosupressors sobre les cèl·lules NK[95]. Aquest efecte pot ser degut, en part, per receptors de col·lagen inhibidors, com el LAIR-1[252], i a part, per l'impediment mecànic que provoca la densa matriu extracel·lular de col·lagen. Tot i així, les cèl·lules també fan servir la matriu extracel·lular per posicionar-se en l'espai. El CD49a, en ser un receptor de col·lagen, facilita que els limfòcits $CD49a^{+}$ es puguin desplaçar pel teixit[253]. I, per últim, mitjançant l'alliberament de granzima B a l'espai extracel·lular, poden fer túnels per obrir-se pas i migrar cap a senyals quimiotàctiques[254]. En condicions homeostàtiques, les cèl·lules NK alliberen constitutivament la forma activa de la granzima B, que juga un paper important en el remodelatge de la matriu extracel·lular[255]. Per exemple, ha demostrat ser clau per a què els limfòcits destinats a convertir-se en intraepitelials puguin travessar la lamina densa de col·lagen que separa l'epiteli de la lamina propria[256]. Malauradament, l'alliberament de granzima B extracel·lular també pot esdevenir un mecanisme patològic, com a causant principal de les úlceres epitelials presents en la infecció genital per herpesvirus 2[257].

En el **TREBALL 2** s'ha estudiat l'efecte del col·lagen I i IV en dues i tres dimensions sobre la funció de les cèl·lules NK d'amígdala. A més, s'ha caracteritzat l'expressió de CXCR5 en les cèl·lules NK de memòria residents en amígdala, ja que es un marcador que indica la localització intrafol·licular en els teixit limfàtic[258], i justament els fol·licles B, un dels principals santuaris del VIH, estan envoltats de col·lagen [92] i cèl·lules CD49a^{+}[259] **(FIG 24)**.

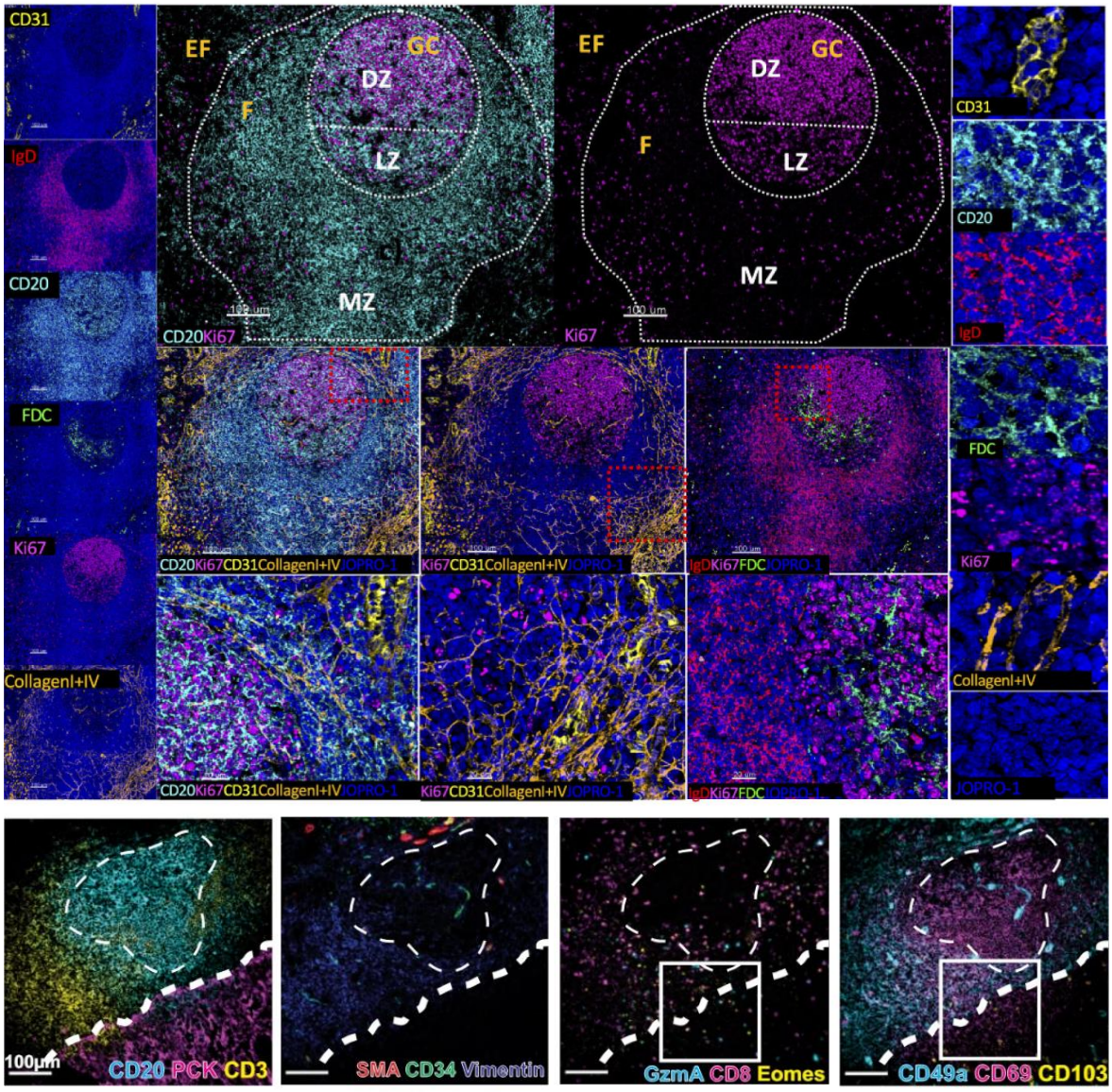


FIG 24. Marcadors de residència en els limfòcits d'amígdala. Capes superposades d'immunofluorescència de marcadors per histologia multiplex d'una secció de teixit d'una mostra representativa d'amígdala. La línia puntejada fina representa el fol·licle B i la línia puntejada gruixuda representa la capa epitelial. El CD20 (cian) indica el fol·licle B, el CD3 (groc) marca la zona T i la pancitoqueratina (PCK; magenta) marca l'epiteli. El marcador endotelial CD34 (verd) i el marcador de miofibroblasts actina de múscul llis (SMA, vermell) indica els vasos sanguinis, i la vimentina (blau) marca les àrees denses en fibroblasts. Granzima A (GzmA; magenta), Eomes (groc) i CD8 (magenta) representen les cèl·lules T citotòxiques. El CD49a (cian), CD69 (magenta) i CD103 (groc) marquen les cèl·lules residents en teixit. Extreta de: [92,259]

9.1. Alteració poblacional de les ILCs

Les ILCs en sang desapareixen ràpidament en la infecció aguda per VIH i no es recuperen els nivells normals després del pic de la virèmia, només si la teràpia antiretroviral s'inicia ràpidament[260] **(FIG 25)**.

En teixits mucosos de macacos rhesus, hi destaca la ràpida pèrdua, en una sola setmana, d'un gran número d'ILCs NKp44$^+$ (ILC3s), però no en els ganglis limfàtics de drenatge. Les ILCs mostren majors nivells d'apoptosi i supressió del RORγt, però no compensen amb un augment de la proliferació. En canvi, adopten funcions citotòxiques en detriment de disminuir la producció d'IL-17[261]. En humans, la inflamació crònica també s'ha associat amb una reducció persistent d'ILC3s residents en intestí gruixut en persones amb VIH fins i tot amb la càrrega viral suprimida, probablement degut a l'estimulació continuada amb citocines elevades en la infecció aguda (p. ex. IL-15)[223]. També s'ha suggerit que la depleció podria ser causada per la sobrexpressió del lligand de mort Fas (CD95) en les ILCs per l'IFNα[260], així com l'increment pel VIH del catabòlit del triptòfan indoleamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO)[262]. L'IDO pot suprimir la producció d'IL-17 per les ILC3s, i s'ha demostrat en biòpsies de colon de macacos rhesus SIV$^+$ una correlació inversa entre l'IDO i els números d'ILC3s NKp44$^+$[243].

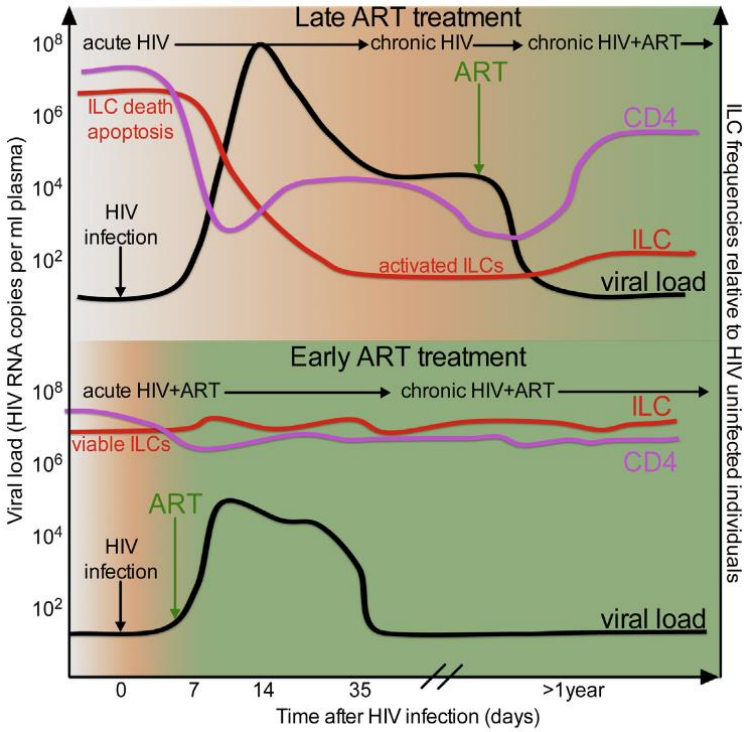


FIG 25. Les ILCs s'eliminen ràpidament de la sang de persones amb VIH en la infecció aguda. La TAR iniciada durant la infecció aguda, però no en la infecció crònica, prevé la pèrdua d'ILCs de sang, fet que suggereix que el tractament precoç podria preservar l'homeòstasi immunològica. Extreta de: [260]

9.2. Alteració poblacional de les cèl·lules NK residents en teixit

En teixits mucosos de macacos, la infecció aguda per SIV no elimina les cèl·lules NK presents en intestí ni en els ganglis limfàtics de drenatge, però mostren una apoptosi elevada que es compensada amb una major proliferació, i es tornen més citotòxiques[261].

En humans, depenent de la cohort de pacients amb VIH, s'observen canvis en les freqüències poblacionals de cèl·lules NK en la lamina propria i intraepitelials. Durant la infecció crònica, les cèl·lules NK de colon disminueixen, mentre que les cèl·lules NK intraepitelials es mantenen en controladors espontanis amb combinacions de genotips protectors KIR/HLA. Per últim, les cèl·lules NK intraepitelials i de lamina propria es troben expandides en pacients no respondedors immunològics que no recuperen totalment les cèl·lules T $CD4^+$ amb la teràpia antiretroviral[102].

9.3. Estratègies dirigides a potenciar l'eficàcia de les cèl·lules NK

9.3.1. Perfusió de citocines

La infusió d'algunes combinacions de citocines ha demostrat efectes molt positius en les cèl·lules NK, per exemple, la combinació d'IL-21 amb IFN-α aconsegueix augmentar la freqüència de cèl·lules NK $CD16^+$ citotòxiques i rescatar les cèl·lules NK diferenciades terminalment per limitar el reservori de VIH en macacos gràcies a una potent activitat antiviral específica d'HLA-E presentador de pèptids de l'envolta viral[263]. L'augment en la citotoxicitat es va atribuir a la menor expressió del receptor inhibidor NKG2A, i no pas a un increment del receptor oposat activador, l'NKG2C, recapitulant la dinàmica de les poblacions de cèl·lules NK observades en els micos verds africans capaços de controlar la infecció per SIV naturalment[264].

Tot i així, la citocina més estudiada i prometedora és la IL-15, en concret el superagonista N-803, que simula la IL-15 transpresentada per cèl·lules dendrítiques, un format amb molta més afinitat. La IL-15 és una citocina essencial per al manteniment de les cèl·lules NK intraepitelials en intestí[211] i amígdales[209]. La seva administració ha demostrat potenciar la capacitat citotòxica de les cèl·lules NK en diversos contextos[218,265], així com contrarestar la citocina immunosupressora TGF-β[207]. Les cèl·lules NK adaptatives $CD57^+NKG2C^+$ mostren una fosforilació oxidativa reduïda en la infecció per VIH, però el tractament amb IL-15 és capaç de revertir-ho a través de l'activitat potenciada d'mTORC1[266].

En macacos rhesus infectats amb SHIV i sota tractament antiretroviral, l'N-803 va promoure la migració de limfòcits T $CD8^+$ i NK cap als fol·licles B, un dels principals santuaris del VIH[258]. Aquest descobriment quedaria recolzat pel fet que la infecció natural amb SIV en micos verds africans no és patogènica, i es deu a que els fol·licles B romanen lliures de virus gràcies a l'elevada presència de cèl·lules NK intrafol·liculars ($CXCR5^+$) que proliferen per l'IL-15 presentada per les cèl·lules dendrítiques fol·liculars[267]. Aquesta diferència és primordial en comparació amb la infecció patogènica per SIV en macacos[268] i VIH en humans[239], on els ganglis limfàtics acostumen a reclutar poques cèl·lules NK, mentre que la gran majoria es desvien a la mucosa intestinal, i aleshores el VIH pot escapar en el santuari dels fol·licles B.

Ara bé, malauradament, també s'ha constatat que la IL-15 pot convertir les cèl·lules més permissives a la infecció *in vitro*, en concret els limfòcits T $CD4^+$ *stem cell-like memory*. Això podria generar un reservori persistent i autorenovable de cèl·lules infectades[269]. Tanmateix, cal dir que l'administració d'N-803 *in vivo* en macacos rhesus no va comportar cap increment en la càrrega viral ni ADN viral integrat[258].

9.3.2. Bloqueig dels punts de control immunològic (ICB)

Degut a que la infecció crònica origina un esgotament funcional progressiu en les cèl·lules NK, s'han investigat estratègies per revertir aquest estat disfuncional i recuperar l'activitat de les cèl·lules NK. L'estratègia principal es basa en l'ús d'anticossos monoclonals dirigits a bloquejar l'efecte inhibidor de diversos punts de control immunològic que s'expressen en les cèl·lules NK i minimitzen la seva funcionalitat.

Per exemple, s'ha investigat l'ús de multímers del complex IL-15/IL-15Rα amb un anticòs anti-NKG2A[157] per bloquejar la inhibició a través d'HLA-E. Tot i així, la proteïna viral accessòria Nef és capaç de baixar l'expressió d'HLA-E en cèl·lules T $CD4^+$ infectades[270]. Això pot evitar la inhibició de cèl·lules NK $NKG2A^+$, però alhora evitar l'activació de cèl·lules NK $NKG2C^+$.

El bloqueig de TIGIT, en combinació amb l'estimulació amb cèl·lules dendrítiques activades autòlogues, ha mostrat eficàcia per incrementar la freqüència de cèl·lules NK $CD57^-NKG2C^+$ precursores de memòria, una població que es va associar amb la limitada expansió de cèl·lules HIV^+ en ratolins NSG humanitzats que van ser trasplantats amb limfòcits T $CD4^+$ de PVV[271].

Una opció alternativa pot tractar de bloquejar els ICs en les cèl·lules T $CD4^+$ *helper* que promouen l'activitat de les cèl·lules NK. S'ha demostrat que tant en persones no tractades

com amb càrrega viral suprimida, la inhibició dual de PD-1 i IL-10 potencia la secreció de citocines i degranulació de les cèl·lules NK a través de la recuperació de la funció de les cèl·lules T $CD4^+$ VIH-específiques[272].

Per a combatre la infecció present en els reservoris anatòmics podria ser rellevant una teràpia dirigida contra el receptor inhibidor LAIR-1, que es troba expressat en elevada freqüència en limfòcits i cèl·lules mieloides[252,273,274]. La seva funció principal consistiria en regular la resposta immunològica per a protegir els teixits d'una resposta excessiva[252]. El seu lligand d'unió és el col·lagen de la matriu extracel·lular, i donat que la infecció crònica per VIH comporta la fibrosi i deposició de col·lagen en els ganglis limfàtics[275] i intestí[103], podria relacionar-se amb una funció deteriorada dels limfòcits citotòxics infiltrants. Seguint aquesta línia, el bloqueig de LAIR-1 ha demostrat activar la funció de limfòcits T i NK amb capacitat antitumoral[276]. D'altra banda, el bloqueig de LAIR-1 combinat amb el bloqueig de PD-L1 i TGF-β va aconseguir remodelar la matriu de col·lagen tumoral, potenciar la infiltració i activació de limfòcits T $CD8^+$, i repolaritzar poblacions mieloides supressives, aconseguint altes taxes de remissió en models murins de carcinomes mamaris i de colon[277]. Per a contrarestar els efectes inhibidors del TGF-β sobre les cèl·lules NK[212], la estimulació amb agonistes del CD137 també ha demostrat ser eficaç, generant cèl·lules NK residents infiltrants en teixit amb capacitat citotòxica[278], així com el bloqueig de TGF-β en cèl·lules NK infiltrants contra glioblastoma[279].

Per últim, en el **TREBALL 1** s'ha investigat el bloqueig d'un altre punt de control immunològic que podria ser d'importància en la infecció per VIH en teixit, el KLRG1.

En humans, el KLRG1 es troba expressat en el 50-80% de les cèl·lules NK de sang perifèrica[280], i la constant activació desencadenada per una infecció viral crònica augmenta l'expressió de KLRG1[281]. Independentment de l'edat, l'expressió de KLRG1 predomina en la subpoblació més diferenciada $CD56^{dim}$, però les persones d'edat avançada (>70 anys) presenten una major freqüència de cèl·lules NK $KLRG1^{bright}$[280], i per això també és considerat un marcador de senescència immunològica.

El lligand principal del KLRG1 és l'E-cadherina, que forma unions homodimèriques amb altres mol·lècules d'E-cadherina expressades en cèl·lules epitelials sanes[282]. En aquest estat, el KLRG1 és incapaç de reconèixer l'E-cadherina, però quan l'epiteli està danyat i es perden les unions adherents, degut a l'acció de patògens o una resposta inflamatòria [283], l'-E-cadherina monomèrica és accessible al KLRG1[284]. En canvi, el receptor CD103 també

s'uneix a l'-E-cadherina, però el seu lloc d'unió no es troba bloquejat per la unió homodimèrica entre E-cadherines[284] **(FIG 26)**.

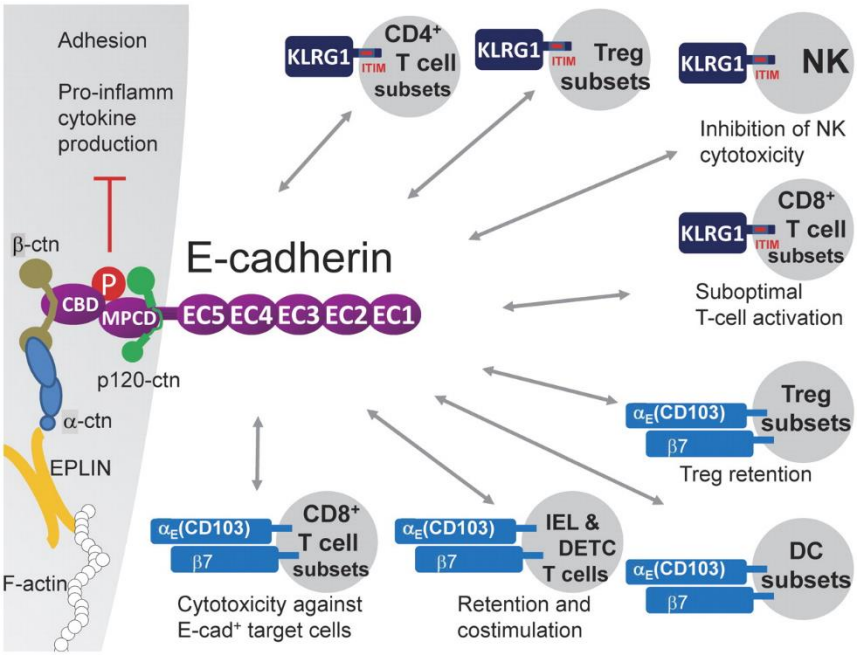


FIG 26. Interaccions heterofíliques de l'E-cadherina amb el KLRG1 i l'αE(CD103)β7. L'ectodomini de l'E-cadherina s'uneix al receptor inhibidor KLRG1 expressat en vàries subpoblacions de cèl·lules immunitàries, reduint la citotoxicitat i els senyals proinflamatoris. A més, l'E-cadherina també es pot unir a l'α_E(CD103)β_7, i facilita l'adhesió als limfòcits intraepitelials per retenir-los en els teixits. Extreta de: [283]

També s'ha descobert que el KLRG1 pot unir-se a una forma soluble de l'E-cadherina (sE-cad). Aquesta es forma pel tall mediat per *sheddases* bacterianes o cel·lulars[285], i la inflamació epitelial[286]. S'hi destaca l'elevada presència de sE-cad en sang en infeccions cròniques (p. ex. VIH[287], virus de l'Hepatitis C (HCV)[288] o la febre Q[289]). En la infecció per VIH en persones progressores a SIDA, l'alteració en la distribució normal de l'E-cadherina en colon coincideix amb l'increment de s-E-cad en plasma i correlaciona amb la càrrega viral. Com que les proteïnes virals gp120 i Tat activen l'expressió de l'MMP-9, podria ser el mecanisme que augmenta la sE-cad en PVV no tractades[285,290]. En presència de sE-cad, la funció antiviral dels limfòcits T CD8$^+$ KLRG1^{bright} específics per VIH-1 es troba disminuïda[26] i es podria esperar la mateixa inhibició sistèmica de les cèl·lules NK KLRG1$^+$. En pacients amb infecció crònica per HCV, hi existeixen alts nivells de cèl·lules NK KLRG1$^+$, i el seu bloqueig augmenta la producció d'IFN-γ[291].

9.3.3. Facilitadors del reconeixement de cèl·lules diana

A part d'intentar estimular la citotoxicitat de les cèl·lules NK, també s'han dissenyat estratègies que busquen redirigir les cèl·lules efectores NK contra les cèl·lules diana unint-les mitjançant anticossos i els seus fragments específics contra receptors propis de cada tipus cel·lular. A més, poden incorporar citocines com IL-2 o IL-15 per millorar la citotoxicitat **(FIG 27)**.

L'estratègia més senzilla parteix de l'ús d'un anticòs específic contra el VIH i que potenciï la citotoxicitat mediada per ADCC de les cèl·lules NK. En canvi, una versió millorada consisteix en un anticòs biespecífic que uneix les cèl·lules NK a través del CD16 i les cèl·lules infectades pel reconeixement de proteïnes virals en la superfície cel·lular. Per exemple, s'han generat nanopartícules d'or amb una conjugació dual polaritzada d'un anticòs IgG anti-HIVgp120 i un altre anticòs anti-CD16, i ha demostrat la capacitat d'augmentar la mort de cèl·lules infectades per les cèl·lules NK[292]. Per últim, també es va crear un *diabody* monocadena amb especificitat contra la proteïna de l'envolta del VIH i el CD16. En aquest cas, l'administració del *diabody* en ratolins humanitzats NSG infectats amb VIH i sota tractament antiretroviral va aconseguir potenciar l'activitat de les cèl·lules NK i reduir el reservori viral[158].

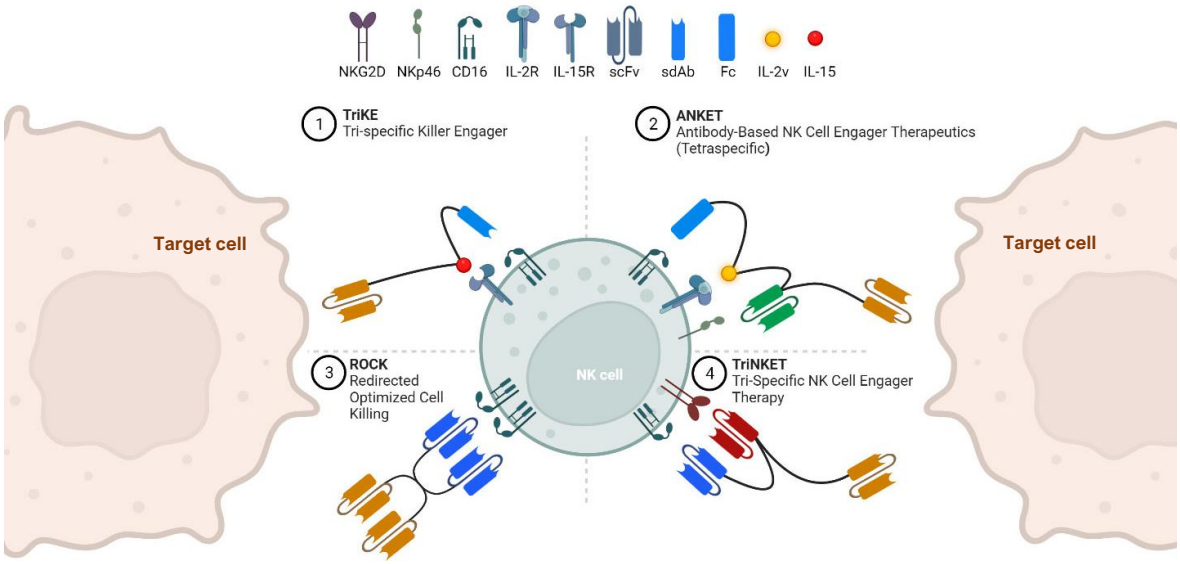


FIG 27. Plataformes facilitadores del contacte i reconeixement de les cèl·lules alterades per part de les cèl·lules NK. Extreta de: [181]

II. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

II. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Malgrat els avenços farmacològics notables en la lluita contra el VIH-1, actualment no és possible ni prevenir la infecció per VIH-1 mitjançant la vacunació ni curar-la completament. El tractament antiretroviral (TAR) està en constant refinament en termes de comoditat i eficàcia, però les desigualtats econòmiques globals limiten l'accés equitatiu a la TAR a nivell mundial. A més, la taxa global de noves infeccions anuals es manté estable, cosa que incrementa el nombre de persones que viuen amb VIH a tot el món. Per tant, lluny d'erradicar el VIH únicament amb mesures de prevenció pública, la recerca d'una cura per a les persones amb VIH esdevé una prioritat.

Com es va exposar a la introducció, una de les estratègies per a la cura busca reactivar les cèl·lules latentment infectades per eliminar-les posteriorment amb una resposta immunològica reforçada. La recerca presentada en aquesta tesi se centra en l'estudi d'una població cel·lular potencialment clau per a l'eliminació del reservori latent: les cèl·lules NK. Aquestes cèl·lules NK presenten alteracions durant la infecció crònica per VIH, i el seu paper en els reservoris anatòmics del VIH encara no està completament definit.

Les hipòtesis que guien aquesta tesi són les següents:

1) El punt de control immunològic KLRG1 podria identificar una subpoblació de cèl·lules NK amb una capacitat funcional reduïda contra el VIH-1, i el seu bloqueig amb anticossos monoclonals anti-KLRG1 podria potenciar la seva capacitat d'eliminar cèl·lules infectades.
2) L'expressió de KLRG1 en les cèl·lules NK de memòria podria estar relacionada amb el reservori viral.
3) Les cèl·lules NK que resideixen en el teixit limfàtic durant l'inici de la infecció per VIH-1 podrien determinar l'evolució de la infecció hiperaguda.
4) La infecció per VIH-1 podria generar cèl·lules NK residents de memòria amb una resposta millorada contra les cèl·lules infectades.

D'una banda, els objectius es van enfocar en identificar i analitzar l'expressió diferencial del KLRG1 en les subpoblacions de cèl·lules NK obtingudes de diferents cohorts de persones que viuen amb VIH, així com en determinar la seva funcionalitat general i específica contra el VIH. La resta d'objectius s'han centrat en l'estudi subpoblacional de les cèl·lules NK que

resideixen a les amígdales i com la infecció per VIH-1 *ex vivo* altera la seva distribució poblacional i funcional emprant un model d'explants de teixit.

Així, els objectius detallats són:

1) Analitzar l'expressió del KLRG1 en les cèl·lules NK de diferents cohorts de persones amb VIH-1, tant circulants com presents al teixit limfàtic.
2) Estudiar la relació entre les cèl·lules NK KLRG1$^+$ i el reservori viral integrat i amb transcripció activa.
3) Determinar si la senyalització a través del KLRG1 en les cèl·lules NK influeix en l'eliminació de limfòcits T CD4$^+$ amb VIH-1 reactivat i infectats *ex vivo*.
4) Caracteritzar fenotípica i funcionalment les cèl·lules NK de memòria residents en el teixit limfàtic (amígdales) de persones no infectades.
5) Estudiar les alteracions poblacionals i funcionals de les cèl·lules NK residents a causa de la infecció *ex vivo* amb VIH-1 en explants d'amígdales.
6) Determinar si la infecció inicial per VIH-1 genera cèl·lules NK residents de memòria contra el VIH-1 en les amígdales o, per contra, provoca el seu esgotament funcional.

III.RESULTATS

TREBALL 1: L'expressió de KLRG1 en les cèl·lules NK s'associa amb la persistència del VIH, i el seu bloqueig promou la reducció del reservori viral

TREBALL 2: Resposta inicial de les cèl·lules NK residents a la infecció local per VIH en el teixit limfàtic

III. RESULTATS

1. TREBALL 1

Títol

L'EXPRESSIÓ DE KLRG1 EN LES CÈL·LULES *NATURAL KILLER* S'ASSOCIA AMB LA PERSISTÈNCIA DEL VIH, I EL SEU BLOQUEIG PROMOU LA REDUCCIÓ DEL RESERVORI VIRAL

Title

KLRG1 EXPRESSION ON NATURAL KILLER CELLS IS ASSOCIATED WITH HIV PERSISTENCE, AND ITS TARGETING PROMOTES THE REDUCTION OF THE VIRAL RESERVOIR

Resum

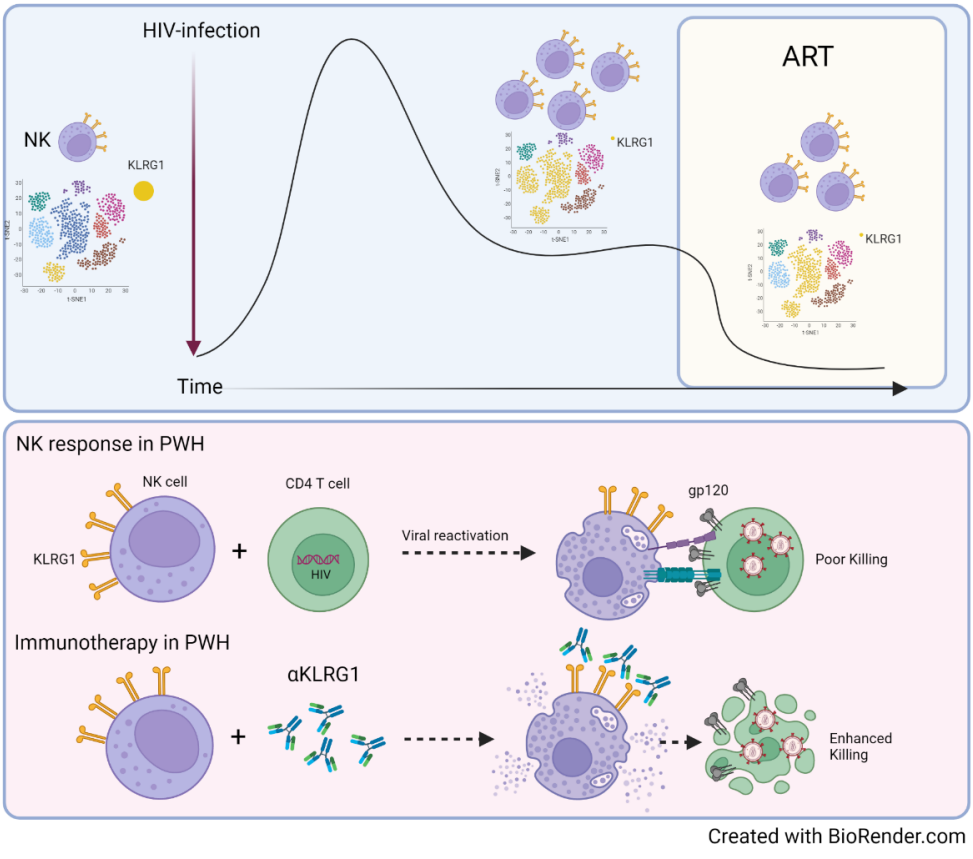
La infecció per VIH causa disfunció immunològica, la qual limita l'eliminació de les cèl·lules infectades amb VIH durant la infecció tractada. La identificació i potenciament de les cèl·lules immunitàries disfuncionals podria ajudar a accelerar l'eliminació del reservori viral persistent. Aquí mostrem que la infecció crònica per VIH incrementa les poblacions de cèl·lules *natural killer* (NK) que expressen el regulador immune negatiu KLRG1, tant en sang perifèrica com en ganglis limfàtics. El tractament antiretroviral (TAR) no restableix aquestes poblacions de cèl·lules NK funcionalment deteriorades i l'expressió de KLRG1 es correlaciona amb la transcripció activa del VIH. El bloqueig de KLRG1 amb anticossos específics restaura significativament la capacitat de les cèl·lules NK per matar les cèl·lules infectades amb VIH, reactiva el VIH latent present en cèl·lules T $CD4^+$ que coexpressen KLRG1, i redueix els genomes intactes del VIH en mostres d'individus tractats amb TAR. Les nostres dades donen suport a l'ús potencial de la immunoteràpia contra el receptor KLRG1 per impactar el reservori viral durant la persistència del VIH.

Abstract

HIV infection induces immunological dysfunction, which limits the elimination of HIV-infected cells during treated infection. Identifying and targeting dysfunctional immune cells might help

accelerate the purging of the persistent viral reservoir. Here, we show that chronic HIV infection increases natural killer (NK) cell populations expressing the negative immune regulator KLRG1, both in peripheral blood and lymph nodes. Antiretroviral treatment (ART) does not reestablish these functionally impaired NK populations and the expression of KLRG1 correlates with active HIV transcription. Targeting KLRG1 with specific antibodies significantly restores the capacity of NK cells to kill HIV-infected cells, reactivates latent HIV present in $CD4^+$ T cells co-expressing KLRG1, and reduces the intact HIV genomes in samples from ART-treated individuals. Our data support the potential use of immunotherapy against the KLRG1 receptor to impact the viral reservoir during HIV persistence.

Graphical abstract



Els resultats d'aquest **TREBALL 1** s'han publicat a la revista *Cell Reports Medicine* amb el DOI: https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101202

Introduction

Antiretroviral therapy (ART) currently available for treating the human immunodeficiency virus (HIV) infection generally controls viral replication in people with HIV (PWH), but it is not curative[59]. ART cannot prevent the formation nor achieve the complete elimination of a population of cells, mainly $CD4^+$ T cells, which form the viral reservoir. The HIV reservoir is located in cells from the blood and several other tissues and harbors integrated provirus, the majority containing viral sequences with deleterious defects. However, a small fraction contains replication-competent proviruses that can initiate new rounds of infection if ART is interrupted[114]. Several factors may facilitate HIV persistence, such as the predominant state of viral latency, cell proliferation, and mechanisms of immune evasion that might allow infected cells to survive even when cells are actively transcribing HIV[293]. Moreover, chronic viral infection is associated with elevated immune activation and deteriorated immune responses in PWH, including those mediated by natural killer (NK) cells[43,294]. Importantly, ART does not fully revert immune exhaustion[154,295], and therapies directed to boost the immune responses will likely be needed to accelerate the elimination of the persistent HIV reservoir.

NK cells are potential candidates for immunotherapy given their strong cytotoxic responses against many infectious pathogens and malignant cells. NK cells have several mechanisms of action, exerting innate responses that do not require prior exposure to antigens, but also cellular responses linked to adaptive immunity such as the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) response, and, as it has recently been evidenced, the capacity to develop memory-like features against several viruses[221,296,297]. Understanding the functional properties of NK cells during HIV infection could help to exploit their full potential to reduce HIV reservoirs. NK cells have also become increasingly appreciated in the context of “shock and kill” approaches. This strategy is currently being pursued to target latent HIV using latency reversal agents (LRAs) to induce viral expression and potentiate the killing of infected cells through the boosting of immune cells[140]. In this regard, in a humanized mouse study, the combination of LRAs together with the exogenous administration of NK cells significantly diminished the *in vivo* HIV reservoir[156]. Moreover, in a clinical study designed to disrupt viral latency, proportions of total and $CD16^+$ NK cells correlated with decreasing levels of the total HIV reservoir size[298]. Of note, the exact mechanisms by which NK cells might target viral reservoirs are not fully understood.

It is widely accepted that a broad set of receptors expressed on the surface of NK cells dictate the variety of their effector responses. These receptors have activating or inhibitory

potential, and the combination of their expression and signaling on NK cells delineates cell subsets with different capabilities[299,300]. However, how the expression and combination of these receptors are affected by different pathological settings and how this might influence health outcomes is largely unknown. Thus, elucidating the most potent NK cell subsets in PWH on ART and boosting them might significantly impact HIV persistence. Importantly, finding exhausted phenotypes, as in the case of $CD8^+$ T cells, might help to identify new targets for restoration of NK functionality.

Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1 (KLRG1) is a conserved C-type lectin inhibitory receptor expressed in different subsets of γδ T cells, $CD4^+$ T, $CD8^+$ T, NK, and Treg cells, which role remains not fully understood[301–305]. KLRG1 expression seems to increase with age and as a consequence of unresolved chronic infections or tumor processes; and higher frequencies are found on antigen-experienced and differentiated cells[281,306–308]. Most of the studies on KLRG1 have focused on T cells, defining this molecule as a marker of cell senescence and differentiation[303,306–309]. However, KLRG1 has also been identified as an immune inhibitory checkpoint receptor. Indeed, KLRG1 possesses a tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) in its cytoplasmic domain, conferring inhibitory potential[282,310,311]. Moreover, high KLRG1 expression stimulates signaling through protein sensors such as the AMP-responsive protein kinase (AMPK), which inhibit NK cell cytotoxicity and proliferation[280]. Other studies have shown that KLRG1 inhibits effector activity after the engagement with its cognate ligands, the E-, N-, and R- cadherins, present in target cells[284,312]. Thus, KLRG1 could represent an understudied negative regulatory receptor and therefore, a new immunostimulatory target to explore in the context of HIV infection.

Here, we show that a significant fraction of NK cells in PWH expresses KLRG1, both in blood and lymph nodes, and its expression correlates with viral transcription during HIV persistence in treated infection. Phenotypic and functional analyses indicate that KLRG1-expressing NK cells represent a dysfunctional subset, with inferior capabilities to kill HIV-infected cells. Importantly, immunotherapy against KLRG1 enhances the cytotoxic potential of NK cells against the HIV latent reservoir. Moreover, we demonstrate that KLRG1 is also expressed on $CD4^+$ T cells harboring inducible HIV and that anti-KLRG1 antibodies could be used for both, “shock” the HIV reservoir and potentiate the “killing” by NK cells. Thus, we identify KLRG1 as a target to exploit in HIV immunotherapies.

Materials and Methods

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Brilliant Violet 650 anti-human CD183 (CXCR3) Clone G025H7	Biolegend	Cat#353730; RRID:AB_2563870
PerCP-Cy5.5 anti-human CD57 Clone HNK-1	Biolegend	Cat#359622; RRID:AB_2565930
FITC anti-human CD56 Clone B159	Becton Dickinson	Cat#562794; RRID:AB_2737799
PE-Cy7 anti-Human CD3 Clone SK7	Becton Dickinson	Cat#557851; RRID:AB_396896
PerCP anti-human CD3 Clone SK7	Becton Dickinson	Cat#347344; RRID:AB_400286
APC anti-human CD3 Clone SK7	Biolegend	Cat#344811; RRID:AB_10644010
PE-Dazzle 594 anti-human CD337 (NKp30) Clone P30-15	Biolegend	Cat#325231; RRID:AB_2814184
PE anti-human NKG2C Clone 134591	R&D Systems	Cat#FAB138P-100
APC-Cy7 anti-human NKG2D Clone 1D11	Biolegend	Cat#320823; RRID:AB_2566659
AF700 anti-Human CD4 Clone RPA-T4	Becton Dickinson	Cat#557922; RRID:AB_396943
BV605 anti-human CD4 Clone RPA-T4	Becton Dickinson	Cat#562658; RRID:AB_2744420
V500 anti-human CD8 Clone RPA-T8	Becton Dickinson	Cat#560774; RRID:AB_1937325
APC anti-human CD8 Clone RPA-T8	Becton Dickinson	Cat#555369; RRID:AB_398595
APC anti-human CD159a (NKG2A) Clone Z199	Beckman Coulter	Cat#A60797; RRID:AB_10643105
BV786 anti-human CD16 Clone 3G8	Becton Dickinson	Cat#563690
BV605 anti-human CD158b (KIR2DL2/L3/S2) Clone CH-L	Becton Dickinson	Cat#743453; RRID:AB_2741518
BV421 anti-human KLRG1 Clone 14C2A07	Biolegend	Cat#368604; RRID:AB_2566593
PE-Cy5 anti-human CD107a Clone H4A3	Becton Dickinson	Cat#555802; RRID:AB_396136
AF700 anti-human IFN-γ Clone B27	Invitrogen	Cat#MHCIFG29; RRID:AB_2539767
APC-Fire750 anti-human CD19 Clone HIB19	Biolegend	Cat#302258; RRID:AB_2629691
BV605 anti-human CD158b (KIR2DL2/L3/S2) Clone CH-L	Becton Dickinson	Cat#743453; RRID:AB_2741518
PE-CF594 anti-human CD69 Clone FN50	Becton Dickinson	Cat#562617; RRID:AB_2737680
SB600 anti-human HLA-DR Clone LN3	Invitrogen	Cat#63-9956-42; RRID:AB_2637402
PE-CF594 anti-human E-cadherin Clone 67A4	Becton Dickinson	Cat#563572; RRID:AB_2738284
Purified anti-mouse/human E-cadherin Clone DECMA-1	Biolegend	Cat#147301; RRID:AB_2563037
PE mouse anti-p24 Clone KC57	Beckman Coulter	Cat#6604667; RRID:AB_1575989
Mouse anti-human p24 Clone Kal-1	Dako-Agilent	Cat#M0857 Discontinued
Rabbit-polyclonal anti-human KLRG1	Abcam	Cat#ab235951
Goat-polyclonal anti-human CD56	R&D Systems	Cat#AF2408; RRID:AB_442152
AF568 donkey-polyclonal anti-goat IgG	Invitrogen	Cat#A-11057; RRID:AB_142581
AF647 donkey-polyclonal anti-mouse IgG	Invitrogen	Cat#A-31571; RRID:AB_162542

AF488 donkey-polyclonal anti-rabbit IgG	Invitrogen	Cat#A-21206; RRID:AB_2535792
Purified Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl Clone MOPC-173	Biolegend	Cat#400201
Purified Rat IgG1, κ Isotype Ctrl Clone RTK2071	Biolegend	Cat#400401; RRID:AB_326507
Human Fc Block Clone Fc1	Becton Dickinson	Cat#564219; RRID:AB_2728082
Virus strains		
Plasmid encoding HIV-$1_{NL4.3}$	NIH AIDS Reagent Program	Cat#2006
Plasmid encoding HIV-1_{BaL}	HIV Reagent Program	Cat#ARP-510
Chemicals, Peptides, Enzymes, and Recombinant Proteins		
Ionomycin	Abcam	Cat#ab120370
Phorbol 12-myristate 13-acetate	Abcam	Cat#ab120297
Romidepsin	Selleckchem	Cat#S3020
Raltegravir	NIH AIDS Reagent Program	Cat#0980
Darunavir	NIH AIDS Reagent Program	Cat#0989
Nevirapine	Sigma Aldrich	Cat#SML0097-10MG
Q-VD-OPh (quinolyl-valyl-*O*-methylaspartyl-[-2,6-difluorophenoxy]-methyl ketone	Selleckchem	Cat#S7311
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen	Cat#18080044
Proteinase K from *Tritirachium album*	Sigma Aldrich	Cat#P4850
Human IL-2	Sigma Aldrich	Cat#11011456001
Human IL-15	Miltenyi Biotec	Cat#130-093-955
Recombinant human E-cadherin	R&D Systems	Cat#8505-EC-050
BD GolgiPlug Protein Transport Inhibitor (Containing Brefeldin A)	Becton Dickinson	Cat#555029
BD GolgiStop Protein Transport Inhibitor (Containing Monensin)	Becton Dickinson	Cat#554724
DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole-dilactate)	Invitrogen	Cat#D3571
Fluoromount G	Invitrogen	Cat#00-4958-02
Critical Commercial Kits		
MagniSort Human NK cell Enrichment Kit	Invitrogen	Cat#8804-6819-74
MagniSort Human $CD4^+$ T cell Enrichment Kit	Invitrogen	Cat#8804-6811-74
Dynabeads CD4 Positive Isolation Kit	Invitrogen	Cat#11331D
EasySep Dead Cell Removal (Annexin V) Kit	StemCell	Cat#17899
RNeasy Plus Micro Kit	Qiagen	Cat#74034
NZY Total RNA Kit	NZYtech	Cat#MB13402
BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit	Becton Dickinson	Cat#554714
BD Horizon Brilliant Stain Buffer	Becton Dickinson	Cat#566349
LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Invitrogen	Cat#L34966
LIVE/DEAD Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit	Invitrogen	Cat#L34974

Experimental Models: Cell Lines		
K562 human myelogenous leukemia cell line	Sigma Aldrich	Cat#89121407
Oligonucleotides		
HIV-1 *Ψ* forward primer: 5′-CAGGACTCGGCTTGCTGAAG-3′	IDT	N/A
HIV-1 *Ψ* reverse primer: 5′-GCACCCATCTCTCTCCTTCTAGC-3′	IDT	N/A
HIV-1 *Ψ* probe: 5′-6-FAM-TTTTGGCGTACTCACCAGT-MGBNFQ-3′	ThermoFisher Scientific	N/A
HIV-1 *env* forward primer: 5′-AGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGC-3′	IDT	N/A
HIV-1 *env* reverse primer: 5′-GTCTGGCCTGTACCGTCAGC-3′	IDT	N/A
HIV-1 *env* probe: 5′-VIC-CCTTGGGTTCTTGGGA-MGBNFQ-3′	ThermoFisher Scientific	N/A
HIV-1 anti-Hypermutant *env* probe: 5′-CCTTAGGTTCTTAGGAGC-MGBNFQ-3′	ThermoFisher Scientific	N/A
hRPP30 forward primer: 5′-GATTTGGACCTGCGAGCG-3′	IDT	N/A
hRPP30 reverse primer: 5′-GCGGCTGTCTCCACAAGT-3′	IDT	N/A
hRPP30 probe: 5′-6-FAM-CTGACCTGA/ZEN/AGGCTCT/3IABkFQ-3′	IDT	N/A
1-LTR HIV-1 forward primer: 5′-TTAAGCCTCAATAAAGCTTGCC-3′	IDT	N/A
1-LTR HIV-1 reverse primer: 5′-GTTCGGGCGCCACTGCTAG-3′	IDT	N/A
1-LTR HIV-1 probe: 5'-/56-FAM/CCAGAGTCA/ZEN/CACAACAGA CGGGCA/31ABkFQ/-3′	IDT	N/A
CCR5 forward primer: 5′-GCTGTGTTTGCGTCTCTCCCAGGA-3′	IDT	N/A
CCR5 reverse primer: 5′-CTCACAGCCCTGTGCCTCTTCTTC-3′	IDT	N/A
CCR5 probe: 5'-/56- FAM/AGCAGCGGC/ZEN/AGGACCAG CCCCAAG/3IABkFQ/-3′	IDT	N/A
Software		
ImageJ 1.53c	National Institutes of Health, USA	https://ImageJ.nih.gov/ij/index.html
OMIQ	Dotmatics	https://www.omiq.ai/

FlowJo V10	Becton Dickinson	https://www.flowjo.com/
GraphPad V8	Dotmatics	https://www.graphpad.com/
BioRender	BioRender	https://www.biorender.com/

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

We have tried to provide as much information as possible regarding the reagents used in this study. Nonetheless, further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Dr. Maria J Buzón (mariajose.buzon@vhir.org).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents. All reagents used are indicated in this section and are available. All plasmids needed for the generation of viral stocks were obtained through the NIH AIDS Reagent Program.

Data and code availability

All data reported in this paper will be shared by the lead contact upon request. Due to the sensitivity of the data, individual participant data will not be shared. This paper does not report original code. Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS

Human Subjects

In this study, we used primary cells obtained from blood samples from people with HIV (PWH) and non-HIV donors. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) PWH were obtained from the HIV unit of the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona, Spain. Study protocols were approved by the corresponding Ethical Committees (Institutional Review Board numbers PR(AG)270/2015, PR(AG)192/2018, and PR(AG)476-2018). PBMCs from healthy donors were obtained from the Blood and Tissue Bank, in Barcelona, Spain. All subjects recruited for this study were adults who provided written informed consent. Samples were prospectively collected and cryopreserved in the Biobank (register number C.0003590). Information on plasma viral loads, $CD4^+$ T cell counts, and time on ART from suppressed PWH is summarized in Table S1. Gender and age are also indicated for PWH in Table S1; however, this information is not available for uninfected donors. Since we utilized samples

from donors of different genders in our experiments, we can conclude that the strategy presented here for stimulating the elimination of HIV reservoirs by targeting the receptor KLRG1 applies to both men and women. PBMCs were obtained by Ficoll-Paque density gradient centrifugation and cryopreserved in liquid nitrogen. PBMCs were cultured in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco), 100 µg/ml streptomycin (Fisher Scientific), and 100 U/ml penicillin (Fisher Scientific) (R10 medium), and maintained at 37ºC in a 5% CO_2 incubator, when needed. $CD4^+$ T cells and NK cells were isolated from PBMCs using commercial kits (MagniSort Human $CD4^+$ T Cell Enrichment; Affymetrix, and MagniSort™ Human NK cell Enrichment; eBioscience). Two rounds of cell separation were performed to maximize the purity of the cells (overall purity >85%). In some experiments, $CD4^+$ T cells and NK cells were obtained by fluorescence-activated cell sorting from PBMC samples (Cytek Aurora CS). Paraffin-embedded LN samples from PWH were obtained from the Anatomical Pathology Department of the Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain). Written informed consent was provided by all participants.

Cell lines

We also used the K-562 cell line, a widespread and highly sensitive in vitro target model to study the natural cytotoxicity function of natural killer cells. K562 human myelogenous leukemia cell line was obtained from the NIH AIDS Reagent Program Division of AIDS, NIAID, NIH. These cells were cultured in R10 medium and maintained at 37ºC in a 5% CO_2 incubator. We checked the absence of contaminants in our cell cultures.

Plasmids

All plasmids needed for the generation of viral stocks were obtained through the NIH AIDS Reagent Program. Viral stocks were generated by transfection of 293T cells with the plasmids encoding the different molecular clones, and the resulting viral particles were titrated in TZMbl cells using an enzyme luminescence assay (Britelite plus kit; PerkinElmer) as described previously. Palivizumab was obtained from the Vall d´Hebron Hospital pharmacy.

METHOD DETAILS

In this section, detailed information about the different assays performed can be found. Information on the sample size and the number of replicates for each assay is indicated in each figure legend. Our criteria for the inclusion of different samples from PWH in the

different assays was mainly related to their control status of the disease, particularly their viral load and $CD4^+$ T cell counts. The assays on viral reservoir cells presented here are complex, among other factors due to the scarcity of HIV-reservoir cells in samples. We started these assays with a large number of cells to avoid errors in the interpretations of the results. Other measures to control and assure the proper analysis of the data are detailed for each assay, such as the use of Fluorescence Minus One (FMO) controls in flow cytometry experiments or isotype antibodies in functional assays to exclude non-specific effects.

NK cell phenotyping

PBMCs were stained with LIVE/DEAD AQUA viability (Invitrogen) for 20 minutes at room temperature (RT). After washing once with staining buffer (1X PBS 3% FBS), cells were stained with anti-CXCR3-BV650 (G025H7, Biolegend) for 30 mins at 37ºC. Next, we performed a washing step with a staining buffer and a new staining with anti-CD57-PerCP-Cy5.5 (HNK-1, Biolegend), anti-CD56-FITC (B159, Becton Dickinson), anti-CD3-PE-Cy7 (SK7, Becton Dickinson), anti-NKp30-PE-CF594 (P30-15, Biolegend), anti-NKG2C-PE (134591, R&D Systems), anti-NKG2D-APC-Cy7 (1D11, Biolegend), anti-CD4-AF700 (RPA-T4, Becton Dickinson), anti-NKG2A-APC (Z199, Beckman Coulter), anti-CD16-BV786 (3G8, Becton Dickinson), anti-CD158b-BV605 (CH-L, Becton Dickinson) and anti-KLRG1–BV421 (14C2A07, Biolegend) antibodies for 20 minutes at RT. Cells were then washed and fixed with 2% PFA. Samples were acquired on a BD LSR Fortessa flow cytometer and data was analyzed using FlowJo V10 software. Gating was performed according to the different FMO controls.

Dimensionality Reduction Analysis

Dimensionality reduction analysis (optSNE) of flow cytometry data was performed using the OMIQ software from Dotmatics (www.omiq.ai, www.dotmatics.com). All events within pre-gated $CD56^+$ NK cells were concatenated for each group per culture condition and analyzed. OptSNE clustering was performed on equal samples of randomly selected 6 x 10^5 cells from each group based on expression of CD57, Nkp30, NKG2C, NKG2D, NKG2A, CD16, CXCR3, CD158b and KLRG1, followed by Flow-Self Organizing Maps (FlowSOM) artificial intelligence algorithm for cluster identification. Marker expression was represented as Archsinh-transformed medians within heatmaps generated via optSNE analysis.

Immunohistochemistry of human lymph nodes

For immunodetection of KLRG1, CD56, and p24, formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue sections from human lymph nodes of HIV-infected PWH were subjected to

deparaffinization (using xylene and decreasing ethanol concentrations), hydration and heat-induced epitope retrieval with a PT-LINK (Dako). Then, the slides were permeabilized in 1X Tris-buffered saline (TBS) (Fisher Scientific) with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and 1% BSA (Sigma-Aldrich) for 10 minutes. Subsequently, blocking was performed for 2 h with 1X TBS supplemented with 10% normal donkey serum (Jackson Immunoresearch) and 1% BSA before staining. The slides were then incubated with the primary antibodies overnight at 4 °C: anti-CD56 (goat-polyclonal anti-CD56 antibody, 10 µg/ml, R&D Systems clone NCAM-1), anti-KLRG1 (rabbit-polyclonal anti-KLRG1 antibody, 1/100, Abcam ab235951), or anti-p24 (mouse-monoclonal anti-p24 antibody, 1/10, Dako-Agilent M0857), diluted in 1xTBS and 1% BSA. Next, samples were washed and incubated for 1 h at 37ºC with the appropriate secondary antibodies: Alexa Fluor 568 donkey anti-goat (Invitrogen), Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse (Invitrogen), and Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit (Invitrogen), counterstained with DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole-dilactate, ThermoFisher), and mounted with Fluoromount G (eBioscience).

Confocal microscopy and quantification

Samples were imaged on a Leica TCS SP5 and Zeiss LSM780 confocal microscopes, using an x20 and x40 phase objective and sequential mode to separately capture the fluorescence from the different fluorochromes. Tiles were merged with the LAS AF software. ImageJ 1.53c software (National Institutes of Health, USA) was used to perform image processing and analysis. For CD56/KLRG1 and p24/KLRG1 co-localization analysis, a binary mask was generated for each channel, and the “analyze particles” tool and manual recount were used to count single and double-stained cells. In all experiments, at least 6 B-cell follicles were analyzed per sample.

NK natural cytotoxicity assay

NK cytotoxicity was measured by the detection of CD107a and IFN-γ by flow cytometry after co-culture with the K562 cells alone or in combination with IL-15. NK cells were isolated using a commercial kit (MagniSort Human NK Cell Enrichment; Affymetrix) and co-cultured with K562 in a 1:1 ratio. CD107a-PE-Cy5 (H4A3; Becton Dickinson), BD Golgiplug Protein Transport Inhibitor (Becton Dickinson), and BD GolgiStop Protein Transport Inhibitor containing monensin (Becton Dickinson) were also added to each well at the recommended concentrations. Human IL-15 (Miltenyi Biotec) was added to the corresponding wells at 25 ng/ml. Plates were centrifuged and incubated for 4.5 h at 37ºC and 5% CO_2. Cells were then washed and stained with a viability dye (LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain; Thermo Fisher). After that, cells were stained with anti-CD57-PerCP-Cy5.5 (HNK-1; Biolegend), anti-

CD56-FITC (B159; Becton Dickinson), anti-CD3-PE-Cy7 (SK7; Becton Dickinson), anti-CD69-PE-CF594 (FN50; Becton Dickinson), anti-NKG2C-PE (134591; R&D systems), anti-CD16-BV786 (3G8; Becton Dickinson) and anti-HLA-DR-SB600 (LN3; eBioscience) antibodies for 20 minutes at RT. Cells were then fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Becton Dickinson) for 20 minutes at 4ºC, washed with BD Perm/Wash buffer and stained with anti-IFN-γ-AF700 (B27; Life Technologies) for 30 minutes at RT. After washing, cells were fixed with PFA (2%) and acquired on an LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson). Data were analyzed using FlowJo V10 software.

Ex vivo infection of unstimulated PBMCs

PBMCs from ART-suppressed PWH were thawed and incubated overnight in R10 medium containing 40 U/ml of IL-2. The next day, $CD4^+$ T cells were isolated using a commercial kit (MagniSort Human $CD4^+$ T Cell Enrichment; Affymetrix) and infected by spinoculation at 1200x*g* for 2 h at 37 ºC with $HIV_{NL4.3}$ or HIV_{BaL} viral strains (50% tissue culture infectious dose ($TCID_{50}$) of 78,125 and 625 for $HIV_{NL4.3}$ and HIV_{BaL}, respectively). Cells were then washed twice with PBS and cultured at 1 million/ml in a 96-well plate round-bottom with R10 containing 100 U/ml of IL-2 for the next 5 days. The resulting HIV-infected $CD4^+$ T cells were used for different experiments listed below.

NK natural cytotoxicity and ADCC against HIV$^+$ cells

Five days after HIV infection, cells were placed in 96-well plates round-bottom at 100,000 cells/well. Autologous NK cells, previously isolated by negative selection using magnetic beads (MagniSort™ Human NK cell Enrichment Kit, eBioscience) from PBMCs, were then added at a 1:1 ratio. Two rounds of cell separation were performed to maximize the purity of the cells (overall purity >85%). In some experiments, we assessed the effect of targeting KLRG1 with antibodies. In such cases, NK cells were previously incubated with the anti-KLRG1 monoclonal antibody (6 µg/ml clone 14C2A07, Biolegend) for 20 minutes and then washed with staining buffer to remove the unbound antibodies before the co-culture. As a control, we also included NK cells cultured with the isotype mouse IgG2a k (6 µg/ml) (MOPC-173, Biolegend). Additionally, a pool of NK cells previously treated with an Fc receptor blocker (human Fc block, Becton Dickinson) and then incubated with the anti-KLRG1 antibody was used as a control. Plates were then centrifuged at 400g for 3 minutes and incubated for 4 h at 37ºC and 5% CO_2. For the ADCC assays, HIV-infected $CD4^+$ T cells were incubated for 15 minutes with plasma (1:1,000 dilution) from a VIR HIV^+ PWH containing a mix of antibodies targeting different HIV epitopes, before the 4 h co-culture with the NK cells. After incubation, cells were transferred to a V-bottom 96 well plate, washed with PBS, and

stained with a viability dye (LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain; Thermo Fisher) for 20 minutes at RT in the dark. After, cells were centrifuged at 2,600 rpm for 5 minutes, washed with staining buffer and stained in a volume of 50 µl/well with anti-CD56-FITC (B159; Becton Dickinson), anti-CD3-PE-Cy7 (SK7, Becton Dickinson), anti-CD4-AF700 (RPA-T4, Becton Dickinson), anti-E-cadherin-PE-CF594 (67A4, Becton Dickinson), and anti-KLRG1-BV421 (14C2A07, Biolegend), for 20 minutes at RT. After the cell surface staining, cells were washed with staining buffer, fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Becton Dickinson) for 20 minutes at 4ºC, washed with BD Perm/Wash buffer, and stained with anti-p24-PE (KC57-RD1, Beckman Coulter) for 20 minutes on ice and 20 minutes at RT. Finally, cells were washed and fixed with 2% PFA. Samples were acquired in an LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo V10 software. We calculated target cell killing as the reduction in infected ($p24^+$) cells. In some experiments, we studied the impact on the NK cytotoxic function of blocking the E-cadherin in the cell targets. In such cases, HIV-infected $CD4^+$ T cells were previously treated with an E-cadherin neutralizing antibody (clone DECMA-1, Biolegend) or the isotype control rat IgG1 κ (RTK2071, Biolegend) for 20 minutes and then washed with staining buffer to remove the unbound antibodies before the co-culture with NK cells. The natural cytotoxicity assay was performed as described above.

FACS isolation of $KLRG1^+$ NK cells and $CD4^+$ T cells

For Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS), 100 million PBMCs from ART-suppressed PWH were stained with LIVE/DEAD Far Red viability (Invitrogen) for 20 minutes at RT. After washing with 1X PBS, cells were surface stained with anti-CD56-FITC (B159, Becton Dickinson), anti-CD3-PE-Cy7 (SK7, Becton Dickinson), anti-CD19-APC-Fire750 (HIB19, Biolegend), anti-CD16-BV786 (3G8, Becton Dickinson), anti-CD4-BV605 (RPA-T4, Becton Dickinson), anti-CD8-V500 (RPA-T8, Becton Dickinson), and anti-KLRG1-BV421 (14C2A07, Biolegend) antibodies for 20 minutes at RT. Cells were then washed with staining buffer and immediately sorted using the Cytek Aurora Cell Sorter. We sorted the live populations $CD4^-CD3^-CD56^+KLRG1^+$ ($KLRG1^+$ NK cells), $CD4^-CD3^-CD56^+KLRG1^-$ ($KLRG1^-$ NK cells), $CD3^+CD4^+CD56^-KLRG1^+$ ($KLRG1^+$ $CD4^+$ T cells) and $CD3^+CD4^+CD56^-KLRG1^-$ ($KLRG1^-$ $CD4^+$ T cells). The purity of the cells was >95% in all cases.

Viral reactivation in ART-suppressed PWH samples

$CD4^+$ T cells from ART-suppressed PWH were isolated using a commercial kit (MagniSort Human $CD4^+$ T Cell Enrichment; Affymetrix) and cultured in R10 medium with Q-VD-OPh (Selleckchem) for 2h in the presence of Raltegravir (1 µM), Darunavir (1 µM), and Nevirapine

(1 μM) to prevent new rounds of viral infection. After 2 h, PMA (Abcam) plus ionomycin (Abcam) (PMA 81 nM; ionomycin 1 μM) were added to the cell culture as a latency reversal agent and left for 18 h to reactivate latent HIV. After viral reactivation, cells were subjected to natural cytotoxicity assays as described above. After, cells were stained with LIVE/DEAD Far Red viability for 20 minutes at RT and then with anti-CD56- FITC (B159; Becton Dickinson), and anti-CD3-PerCP (SK7, Becton Dickinson) antibodies for 20 minutes at RT. After the cell surface staining, cells were fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Becton Dickinson) for 20 minutes at 4ºC, washed with BD Perm/Wash buffer, and stained with anti-p24-PE (Beckman Coulter) for 20 minutes on ice and 20 minutes at RT. Finally, cells were washed and fixed with 2% PFA. Samples were acquired in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with FlowJo V10 software. The limit of detection of our assay is established at 50 $p24^+$ cells/million $CD4^+$ T cells as previously reported[40].

NK killing of cells harboring intact provirus

$CD4^+$ T cells from ART-suppressed PWH were isolated using the Dynabeads CD4 Positive Isolation Kit (Affymetrix) and cultured in R10 medium at a concentration of 1.5 M/ml in the presence of an ART cocktail (Raltegravir, Darunavir, and Nevirapine at 1 μM each) to prevent new rounds of viral infection. To reactivate latent HIV, PMA (81 nM) and Ionomycin (1 μM) were added to the cell culture as a latency reversal agent, and the cells were left for 18 h. The negative fraction of cells remaining from the $CD4^+$ T cell isolation kit were cultured overnight in R10 medium supplemented with 100 U/mL of IL-2 (Merck) at a concentration of 2 M/ml. The following day, NK cells were enriched from the $CD4^-$ fraction using the MagniSort Human NK cell Enrichment Kit (Invitrogen). After viral reactivation, a natural cytotoxicity assay was conducted, wherein NK cells were seeded in a 96-well round-bottom plate and cocultured with reactivated $CD4^+$ T cells at a 1:1 ratio in R10 medium containing the ART cocktail plus DNase (100 μg/mL, Merck). Enriched NK cells were pre-incubated with either IgG2a isotype control at 10 μg/mL (MOPC-173, Biolegend) or human purified anti-KLRG1 at 10 μg/mL (14C2A07, Biolegend) for 20 minutes, followed by a single wash with 1X PBS. After 4 h of incubation at 37°C in 5% CO_2, the remaining viable $CD4^+$ T cells were isolated from the coculture using a combination of the EasySep Dead Cell Removal (Annexin V) Kit (StemCell Technologies) and the MagniSort Human $CD4^+$ T cell Enrichment Kit (Invitrogen). The cell pellet was then lysed with proteinase K-containing lysis buffer and incubated at 55°C overnight, followed by a 95°C incubation for 5 minutes, to obtain DNA for the Intact Proviral DNA Assay (IPDA) described below.

Intact Proviral DNA Assay (IPDA)

IPDA was performed as described before[313] and using primers and probes specific for the Ψ HIV gene (HIV-1 Ψ forward 5'-CAGGACTCGGCTTGCTGAAG-3', HIV-1 Ψ reverse GCACCCATCTCTCTCCTTCTAGC and probe 5' 6-FAM-TTTTGGCGTACTCACCAGT-MGBNFQ-3') and *env* HIV gene (HIV-1 *env* forward 5'-AGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGC-3', HIV-1 *env* reverse 5'-GTCTGGCCTGTACCGTCAGC-3', HIV-1 *env* intact probe 5'-VIC-CCTTGGGTTCTTGGGA-MGBNFQ-3', and HIV-1 anti-Hypermutant *env* probe 5'-CCTTAGGTTCTTAGGAGC-MGBNFQ-3'). The *hRPP30* gene was used for cell input normalization. Samples were analyzed in a QIAcuity One 2-plex System (Qiagen).

Quantification of HIV DNA and RNA by qPCR

$CD4^+$ T lymphocytes were enriched from total PBMCs using a negative selection kit (MagniSort Human $CD4^+$ T Cell Enrichment, eBioscience) or isolated by FACS. Then, $CD4^+$ T cells were used for both HIV DNA and RNA quantification. $CD4^+$ T cells for HIV-DNA analysis were immediately lysed with proteinase K-containing lysis buffer (at 55ºC overnight and 95ºC for 5 minutes). The HIV DNA in the cell lysates was quantified by quantitative PCR (qPCR) using primers and probes specific for the 1-LTR HIV region (LTR forward 5'-TTAAGCCTCAATAAAGCTTGCC-3', LTR reverse 5'-GTTCGGGCGCCACTGCTAG-3' and probe 5' /56-FAM/CCAGAGTCA/ZEN/CACAACAGACGGGCA/31ABkFQ/ 3'). The CCR5 gene was used for cell input normalization. Samples were analyzed in an Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System. For Viral RNA quantification, $CD4^+$ T cells were subjected to RNA extraction using the RNeasy plus micro (Qiagen) kit (for less than 0.5M cells) or NZY Total RNA kit (NZYtech) (for a number of cells ranging between 0.5 and 5M) following the manufacturer's instructions. Reverse transcription of RNA to cDNA was performed with the SuperScriptIII (Invitrogen), and cDNA was quantified by qPCR with primers against the HIV long terminal repeat (LTR). Quantification of RNA and DNA copies was performed using a standard curve, and values were normalized to 1 million $CD4^+$ T cells. For testing the effect of the anti-KLRG1 antibody in $CD4^+$ T cells from ART-suppressed PWH, $CD4^+$ T cells were isolated by magnetic beads as described here and cultured in R10 medium with Q-VD-OPh (Selleckchem) for 2 h in the presence of Raltegravir (1 μM), Darunavir (1 μM), and Nevirapine (1 μM). After, cells (at least 1 M per condition) were incubated with the anti-KLRG1 antibody (6 μg/ml) or an IgG2a isotype (6 μg/ml). Cells incubated with romidepsin (40 nM) were included as a positive control. Cells were cultured for 20 h and after, viral reactivation was quantified by the intracellular detection of HIV-RNA, as described above.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Prism software, version 6.0 (GraphPad). A P value <0.05 was considered significant. Volcano plots were automatically produced by the OMIQ software, and differences were regarded as statistically significant when the value of p or the False Discovery Rate (FDR) value were below 0.05. The statistical details for the different experiments can be found in each figure legend.

Results

Active HIV transcription associates with higher frequencies of NK cells expressing KLRG1

We first studied the cell-surface expression of KLRG1 in a cohort of ART-suppressed (ART, n=23) and viremic (VIR, n=17) PWH (clinical data of participants #1-40 in **Table S1**) and compared it to healthy donors (HD, n=14). An example of the gating strategy used for these analyses is shown in **Supplementary Figure 1**. In total NK cells ($CD3^{-}CD56^{+}$), we found significantly higher frequencies of KLRG1 expression in HIV^{+} individuals (VIR and ART) than in HD **(Figure 1A)**. KLRG1 was expressed with median values of 16.1% and 27.3% for HD and HIV^{+}, respectively **(Figure 1B)**. Also, we studied if KLRG1 expression was observed in the two main populations of NK cells according to their expression levels of CD56. Indeed, we found KLRG1 over-expression during untreated HIV infection (VIR) in $CD56^{dim}$ **(Figure 1C)**, but also in less differentiated $CD56^{bright}$ NK cells **(Figure 1D)**. Aging and some unresolved chronic infections have been linked to KLRG1 expression[280,281,308]. Importantly, VIR PWH showed higher KLRG1 levels, but no differences in age were observed between these cohorts **(Table S1)**. Moreover, ART significantly reduced $KLRG1^{+}$ NK cells in both NK subsets from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as compared with VIR individuals, but there was a trend for no normalization of the KLRG1 values, especially for the $CD56^{dim}$ cells (median values of 17.0% and 27.3% for HD and ART, respectively) **(Figure 1C)**. We next examined the relationship between clinical parameters during untreated HIV infection and the percentage of $KLRG1^{+}$ NK cells. We did not find a significant correlation with the absolute $CD4^{+}$ T cell counts **(Figure 1E)**; however, we did observe a negative correlation between plasma viral load in VIR individuals and KLRG1 expression on NK cells **(Figure 1F)**. We believe this correlation reflects the link between KLRG1 expression and unresolved chronic HIV infection, because samples with the highest viral loads were frequently obtained during early HIV infection, and thus, with a limited time of viral replication. When we focused on ART-suppressed PWH, we found a significant direct correlation between intracellular viral RNA and the expression of KLRG1 on NK cells **(Figure 1G)**. By contrast, no association was found between KLRG1 and the total HIV reservoir size, measured as the total viral DNA within the $CD4^{+}$ T population **(Figure 1H)**.

Next, we examined the presence and localization of $KLRG1^{+}$ NK cells in the lymph nodes, for which the follicles are a privileged anatomical site for HIV persistence[314]. We performed immunostaining of the HIV protein p24, the NK-cell receptor CD56, and KLRG1 in anatomically intact lymph node tissue preparations from one uninfected control and two PWH

(ART-suppressed #41 and VIR #42, **Table S1**). As shown in **Figure 1I** and **Supplementary Figure 2A-B,** p24 showed the typical two-staining pattern observed in the B-cell follicles[315]; network-like staining probably corresponding to virions captured by follicular dendritic cells, and cells with a more dense spherical signal indicating productive HIV infection **(Supplementary Figure 2B)**. In general, changes in the total number of NK cells ($CD56^+$) were not detected in lymph nodes from PWH compared to the uninfected control **(Supplementary Figure 2C)**. However, we observed an increased in the total number of cells expressing KLRG1 in lymph nodes from the two PWH studied, both in the T and B zones **(Figure 1I-J, and Supplementary Figure 2A)**. Notably, high frequencies of $KLRG1^+$ NK cells were observed in the lymph nodes of PWH; the increase of NK cells expressing KLRG1 was particularly significant in the B zone of the VIR individual **(Figure 1J and K)**. Of note, the ART sample showed higher expression of KLRG1 on NK cells located in the T zone, but not in the B zone, of the lymph nodes compared with the negative control. We speculate that the disorganization of the B cell follicle after HIV infection might allow NK cells to penetrate better the B cell follicle. Alternatively, it is possible that HIV infection accumulates NK cells expressing CXCR5 in lymph nodes, the receptor that directs the entry of immune cells into the B cell follicle. This has been shown before in samples from PWH[316], and in samples from a non-human primate model of viral control[267].

Overall, our results show the existence of a significant fraction of NK cells with expression of KLRG1 both in the blood and within the lymph nodes of PWH, which is compatible with persistent HIV infection. Importantly, during ART the expression of KLRG1 correlates with active HIV transcription in blood, and a significant expression of KLRG1 on NK cells remains in lymph nodes.

Figure 1

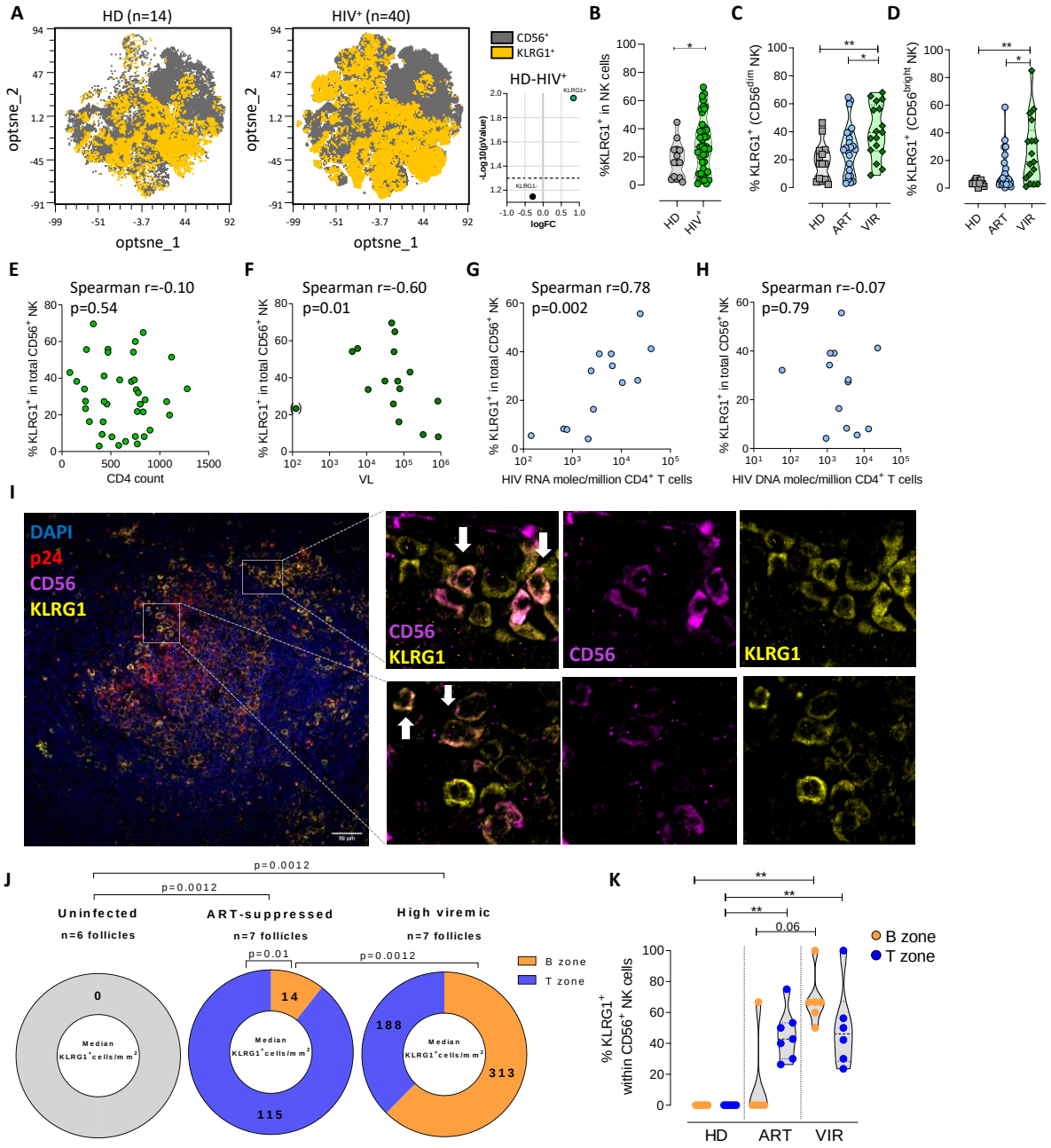


Figure 1. Expression of KLRG1 in NK cells during HIV infection.

The expression of the KLRG1 receptor was measured by flow cytometry in different subjects.

(A) Opt-SNE plots showing the distribution of KLRG1⁺ NK cells within the total pool of CD56⁺ NK cells in HIV-negative donors (HD) and people with HIV (HIV⁺). The Volcano plot shows the difference in KLRG1 expression between both cohorts.

(B) Frequency of KLRG1⁺ NK cells in a cohort of HD (n=14) and PWH (n=40).

(C) Percentage of KLRG1⁺ NK in CD56^{dim} NK cells in HD and in HIV⁺ with detectable viral loads (VIR) or on antiretroviral treatment with suppressed viremia (ART).

(D) Percentage of KLRG1⁺ NK in CD56^{bright} NK cells in HD and HIV⁺ in VIR or ART subjects.

For **(B)**, **(C)** and **(D)** median with range is represented. Statistical comparisons were performed using the Mann-Whitney test. *p<0.05; **p<0.01.

(E-H) Spearman correlations between the percentage of KLRG1$^+$ NK cells and: **(E)** absolute CD4$^+$ T cell count, **(F)** viral load during untreated infection (n=16), (dot in parenthesis was not included for the statistical analysis) **(G)** HIV RNA molecules per million CD4$^+$ T cells during ART (n=13), or **(H)** HIV DNA molecules per million CD4$^+$ T cells during ART (n=13), are represented.
(I) Representative micrograph of a lymph node section from one HIV$^+$ VIR individual stained with anti-CD56 (purple), anti-KLRG1 (yellow), and anti-p24 (red) antibodies. White boxes indicate regions where NK cells show expression of both, CD56 and KLRG1. The right panels correspond to zoomed views of CD56$^+$ KLRG1$^+$ cells.
(J) Graph showing the number of KLRG1$^+$ cells per mm^2 in the B and T zones from uninfected, ART-suppressed, and VIR lymph node samples. B and T cell zones were identified based on the intensity of the DAPI staining and the morphology of the cell nuclei.
(K) Frequency of KLRG1$^+$ cells within CD56$^+$ NK cells in the lymph nodes from an HD, a VIR (#42), and an ART-suppressed (#41) PWH. Each dot corresponds to one B cell follicle. The percentage of NK cells expressing KLRG1 in the B cell zone or the intrafollicular region and in the T zone or the extrafollicular region was represented in orange and blue dots, respectively. Median and min-max rank is represented. Intra-sample comparisons between values inside or outside the B-cell follicles from HD, VIR and ART were performed using the Wilcoxon test, and the inter-sample comparisons between PWH and HD were performed using the Mann–Whitney test.
See also Figures S1, S2 and Table S1.

HIV infection expands different populations of NK cells expressing KLRG1, and more differentiated cells are maintained after ART

We studied if NK cells expressing KLRG1 had a different expression pattern of important receptors for NK activity. For these analyses, we included NK receptors with activating or inhibitory potential upon interaction with ligands found on HIV-infected cells (CD16, NKG2C, NKG2A, NKG2D, NKp30 and KIR2DL2/L3), the maturation marker CD57, and the chemokine receptor CXCR3 **(illustration in Supplementary Figure 2D)**. In general, we observed that HIV$^+$ PWH had higher expression of KLRG1, but also they expressed more NKG2C, CD16 and CD158b **(Figure 2A)**. We then performed a reduction of dimensionality analysis with the data of the individual cohorts. Unsupervised clustering analysis using FlowSOM algorithm allowed us to identify seven different NK cell clusters with a particular expression of the selected receptors in cells expressing KLRG1 **(Figure 2B)**. Specifically, clusters #1 and 2 identified subpopulations of NK cells with medium expression levels of KLRG1, whereas clusters #3, 6 and 7 were populations with high expression of KLRG1 **(Figure 2C)**. Interestingly, these clusters with high expression of KLRG1 were mainly apparent after HIV infection **(Figure 2B and D)**. These populations were also characterized by an increased expression of CD16, an important activating receptor to mediate ADCC, elevated levels of NKG2D, CD57 and the inhibitory receptors KIR2DL2/L3 (KIR CD158b), together with mid-low expression of NKG2A **(Figure 2C and Supplementary Figure 3)**. We also evaluated the impact of ART on these NK populations. It has been extensively documented that HIV infection alters the expression of NK receptors and function, and ART does not fully revert these alterations[154,295]. Statistical comparison within NK clusters between all cohorts are depicted in **Figure 2D**. In general, clusters #6 and 7 were not normalized after treatment

compared to healthy donors and high expression of these clusters are still present after ART **(Figure 2D)**. Importantly, cluster #6 showed a significant increase in the expression of NKG2C only upon HIV infection that was not normalized upon ART **(Figure 2C and Supplementary Figure 3)**. Finally, we also performed a more traditional analysis of the percentages of expression of the different markers in both populations, with and without expression of KLRG1. An example of the gating strategy used is shown in **Supplementary Figure 1**. The results largely confirmed the above main conclusions obtained with the reduction of dimensionality analysis, and showed that cells expressing KLRG1 have higher levels of CD16, NKG2C, KIR, CD57 and NKG2D, and lower levels of NKG2A and CXCR3, especially in VIR individuals **(Figure 2E-L)**. Moreover, ART was able to normalize some of the populations, but high expression of CD16, NKG2C and KIR **(Figure 2E, F and H)**, and low expression of NKG2A **(Figure 2J)** were still present in the KLRG1$^+$ subpopulation after ART.

Overall, we observe that HIV infection expands populations of NK cells expressing KLRG1 with memory-like features (NKG2C$^+$), high expression of the inhibitory KIR CD158b, the differentiation marker CD57, and the activating receptor NKG2D, and low levels of the inhibitory NKG2A receptor. The lower expression of CXCR3 would indicate that these KLRG1$^+$ cells are less able to migrate towards a CXCL9/10/11 gradient[317]. Importantly, ART does not normalize all these KLRG1$^+$ populations and they keep representing a substantial proportion of cells with more frequent activated receptors and differentiated phenotypes.

Figure 2

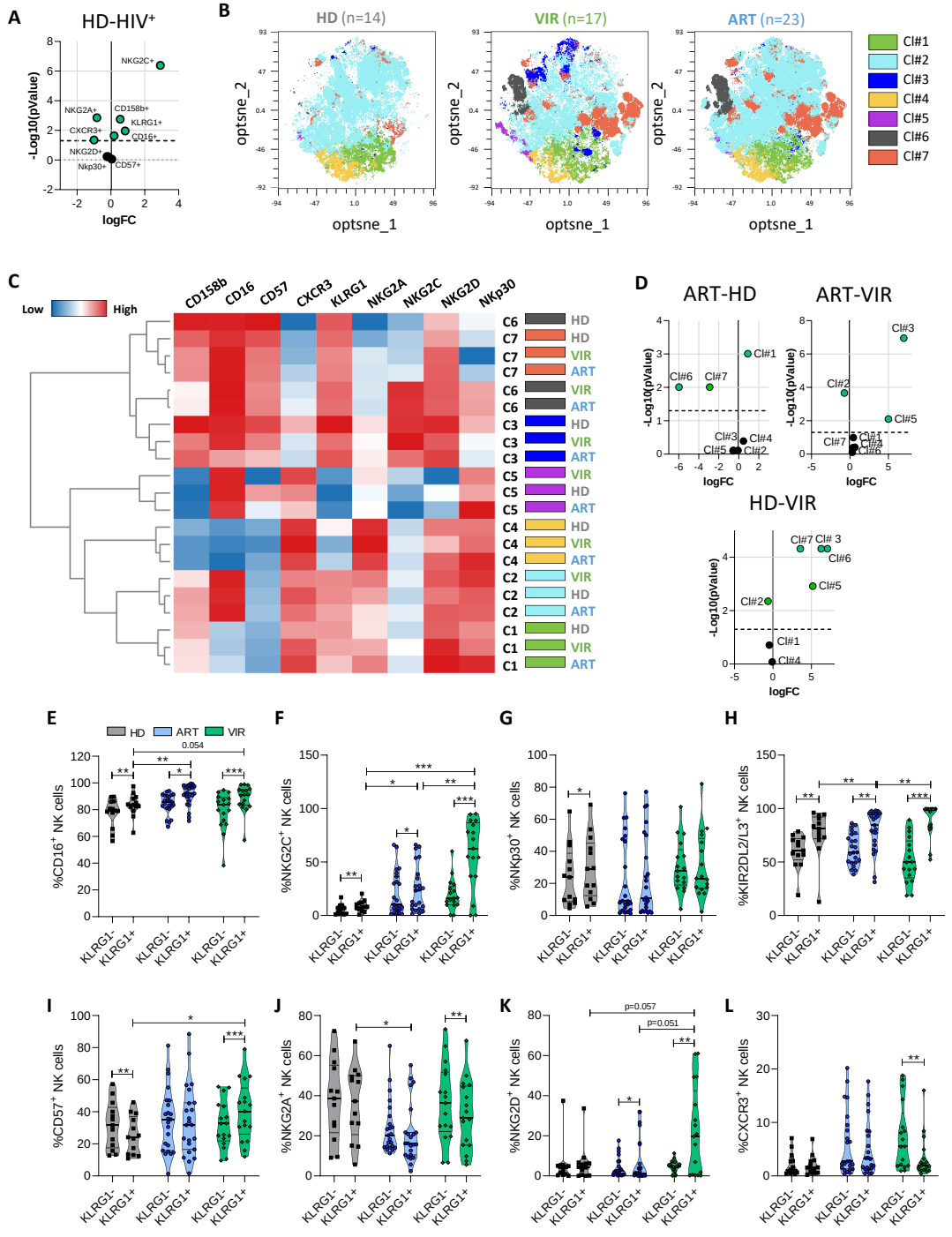


Figure 2. Characterization of NK cells expressing KLRG1 in HIV infection.

The expression of different NK markers was quantified by flow cytometry in different subjects: healthy donors (HD) n=14, HIV⁺ viremic (VIR) n=17, and HIV⁺ ART-treated individuals (ART) n=23.

(A) Volcano plot showing the statistically significant differences in the cluster composition between cohorts HIV⁺ and HD.

(B) Reduction of dimensionality analysis of the expression of different receptors in total (CD56⁺) NK cells.

(C) Heatmap showing the differences in the mean fluorescence expression of the different NK cell receptors, in HD, VIR and ART cohorts, regarding the different cell clusters identified in Figure 2B and represented in different colors.
(D) Volcano plots showing the statistically significant differences in the cluster composition between cohorts.
(E-L) Percentage of expression of different receptors in KLRG1$^+$ and KLRG1$^-$ NK cells. All graphs represent the median and ranges. Statistical comparisons intra-cohort were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test, and comparisons inter-cohort using the Mann-Whitney test. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.
See also Figures S1, S2, S3 and Table S1.

KLRG1$^+$ NK cells are functionally impaired in samples from ART individuals

As a next step, we aimed to directly elucidate the functional signatures of KLRG1$^+$ NK cells. We focused on the cohort of ART subjects as important candidates for a potential functional cure of HIV. First, we performed NK recognition assays against the MHC-deficient cell line K562, using unstimulated NK cells or primed with IL-15 (gating strategy shown in **Supplementary Figure 4A**) (NK cells from participants #10, 13-16, 18, 19, 43-45 in **Table S1**). In general, NK cells from ART individuals were able to kill the cell line K562 **(Supplementary Figure 4B)** Dimensionality reduction analysis identified six clusters in the NK cell population, from which clusters #1, 4, and 5 were significantly expanded upon the cell target challenge and IL-15 cytokine stimulation **(Figure 3A-B and Supplementary Figure 5A)**. These clusters comprised cells with a strong cytotoxic profile, expressing the lysosomal-associated membrane protein-1 CD107a, IFN-γ **(Figure 3C)**, and the activation marker CD69 **(Figure 3D)**. Of note, cluster #1 and 4 widely expressed KLRG1 **(Figure 3E)**, and showed enriched expression of CD57, NKG2C, and CD16 **(Figure 3F)**. Subsequently, we performed a comparative functional analysis and studied the cytotoxic response of NK cells, expressing or not the KLRG1 receptor, stimulated with IL-15 and after co-culturing with the MHC-devoid cell line K562. We observed that KLRG1$^+$ NK cells expressed more HLA-DR and CD69 than their negative counterparts **(Figure 3G and H)**. NK cells expressing KLRG1 exhibited a lower degranulation response **(Figure 3I-J)**, lower frequencies of IFN-γ producing cells **(Figure 3K)**, and less polyfunctional CD107a$^+$IFN-γ$^+$ cells **(Figure 3M)** compared to the negative KLRG1 fraction. Results from NK cells in the absence of the target cells or without previous IL-15 stimulation are shown in **Supplementary Figure 5B-H**. Overall, we showed that KLRG1$^+$ NK cells produce functional molecules, such as IFN-γ and CD107a, upon interaction with K562 targets, however, these cells are functionally more impeded than cells not expressing the KLRG1 receptor.

Figure 3

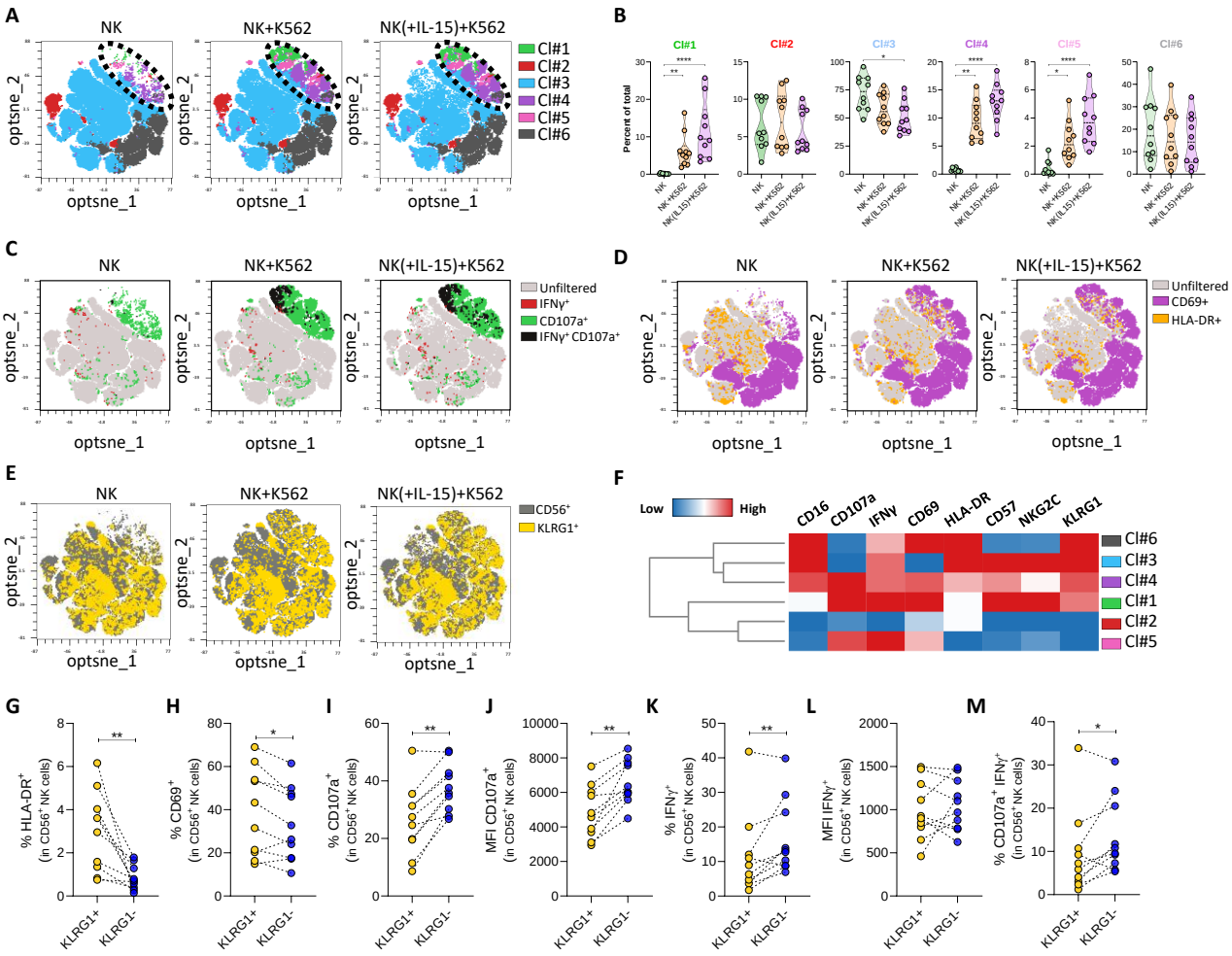


Figure 3. Functional profile of KLRG1⁺ NK cells in ART-suppressed PWH.

MHC-devoid K562 cells were subjected to NK-killing assays (n=10). Functional markers were measured by flow cytometry under different conditions.

(A) Reduction of dimensionality analysis for the expression of KLRG1, CD57, CD16, NKG2C, HLA-DR, CD69, IFN-γ and CD107a in total (CD56⁺) NK cells. Three conditions are represented: NK alone, NK+K562 and NK (IL-15)+K562.

(B) Violin graphs showing the frequency of the different clusters of NK cells identified in A. Statistical comparisons were performed using the Kruskal-Wallis test when required. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

(C) Expression of CD107a and IFN-γ on the different clusters of NK cells identified in Figure 3A.

(D) Expression of CD69 and HLA-DR on the different clusters of NK cells identified in Figure 3A**.**

(E) Expression of KLRG1 on the different clusters of NK cells identified in Figure 3A.

(F) Heatmap showing the intensity of expression of the different markers on the NK clusters represented in different colors.

(G) Percentage of HLA-DR⁺ cells in total CD56⁺ KLRG1⁺ (yellow) or KLRG1⁻ (blue) NK cells, after co-culturing with the K562 target cells and with the additional IL-15 stimulus. Similarly, the values of other parameters are represented in **(H)** frequency of CD69⁺ cells, **(I)** percentage of cells expressing the CD107a degranulation marker, **(J)** Mean Fluorescence Intensity (MFI intensity) signal for CD107a expression, **(K)** frequency of cells producing IFN-γ, **(L)** MFI for IFN-γ, and **(M)** percentage of polyfunctional, double positive CD107a⁺IFN-γ⁺ cells. Statistical comparisons were performed using Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

See also Figures S4, S5 and Table S1.

Antibody intervention enhances the cytotoxic potential of KLRG1$^+$ NK cells at killing HIV-infected cells

Antibody therapies intended to block different immune checkpoints to reinvigorate the effector functions of immune cells are promising new therapies, especially against tumor cells[318]. Thus, we tested if anti-KLRG1 antibodies might enhance functionality of NK cells from ART individuals. To test if targeting KLRG1 inhibits the exhausted phenotype, we cultured isolated NK cells from different ART-suppressed PWH (participants #46-51, **Table S1**) for 4h in the presence of a specific anti-KLRG1 antibody. We measured cell activation, degranulation, and IFN-γ secretion. The co-culture of NK cells with HIV-infected cell targets in the presence of the anti-KLRG1 antibody significantly increased the frequency of IFN-γ-producing cells in the CD56^{dim} subset expressing the KLRG1 receptor **(Figure 4A)**, but not in non-expressing KLRG1 cells **(Figure 4B)**. More notably, targeting KLRG1 did not change the frequency of cells with the potential to degranulate, but strongly triggered a degranulation response (MFI CD107a$^+$) in less differentiated CD56^{bright} NK cells (median of 3820 vs 7686 in the presence of the isotype control IgG2 and anti-KLRG1 Ab, respectively) **(Figure 4C)**. No changes in the degranulation capacity were observed in KLRG1$^-$ NK cells **(Figure 4D**). We included in these experiments controls of NK cells cultured with PMA+Ionomycin **(Supplementary Figure 6A-D)**. Thus, we show that targeting KLRG1 significantly increases the functionality of this subset.

Next, we performed NK-killing assays after antibody engagement. *Ex vivo* infected CD4$^+$ T cells were subjected to autologous NK natural cytotoxicity assays after engagement with anti-KLRG1 or control antibodies (participants #52-57, **Table S1**). Purity of the isolated NK cells was >94% **(Supplementary Figure 6E)**. We calculated cell killing as the reduction in the percentage of virally infected cells. A representative gating strategy is shown in **Supplementary Figure 6F**. Targeting KLRG1 in NK cells significantly enhanced the killing of the total pool of HIV-infected cells **(Figure 4E)**. Likely, the enhanced effector response achieved by the anti-KLRG1 antibody was specific to the KLRG1$^+$ NK cell subpopulation, since the blockade of Fc receptors on the NK cells, which potentially masks unspecific interactions through its constant fraction (Fc), showed no effect on the overall cell killing induced by the KLRG1 antibody. No effect was observed after incubation with the isotype control **(Supplementary Figure 6G)**. Another potential benefit of targeting KLRG1 might be the masking of the interaction between this receptor with its ligands. Thus, we tested if HIV infection upregulated the KLRG1 ligand E-cadherin, a molecule known to restrain the NK function through KLRG1 engagement[282]. To this end, we performed the *ex vivo* infection of

isolated CD4⁺ T cells (participants #52-57 in **Table S1**) and assessed the expression of the E-cadherin by flow cytometry, on infected (p24⁺) CD4⁺ T cells. Although a consistent increment was observed in all experiments, the expression of E-cadherin on infected cells was very low with the exception of two samples **(Figure 4F)**. Of note, we have not assessed if these E-cadherin positive cells were preferentially infected, or HIV induced its upregulation, but blocking the low levels of E-cadherin expression after HIV infection induced a small improvement in the NK capacity to kill HIV-infected cells **(Supplementary Figure 6H)**. Other immune cell populations present in PBMCs such as monocytes have been shown to express high levels of E-cadherin[291], which could potentially restrain KLRG1⁺ NK cells. Also, high levels of soluble E-cadherin have been found in PWH[287], further supporting the potential *in vivo* benefits of an antibody targeting the KLRG1 immune checkpoint. Finally, we directly measured the response of KLRG1-expressing NK cells to HIV⁺ cell targets (participants #58-61 in **Table S1**). For that, we performed autologous co-cultures between previously isolated KLRG1⁺ NK cells or KLRG1⁻ NK cells by fluorescence activated cell sorting (FACS), and *ex vivo* HIV-infected CD4⁺ T cells. KLRG1⁺ NK that were incubated with the anti-KLRG1 antibody showed a more robust cytotoxic response against HIV-infected targets by both mechanisms, the natural cytotoxicity and the ADCC, than NK cells lacking the expression of KLRG1 **(Figure 4G and H)**. In general, KLRG1⁺ NK cells stimulated with the anti-KLRG1 antibody had the ability to kill approximately 20% more infected cells than their negative counterparts.

Last, we tested if targeting KLRG1 induces an NK-mediated cytotoxic response against viral-reactivated cells from the natural reservoir. We performed functional NK assays using samples from seven ART-suppressed PWH after reactivation (participants #23, 65-70, **Table S1**). Detection of p24 was first evaluated in samples from healthy donors and ART-treated PWL after viral reactivation. The limit of detection was set up at 53 copies/million cells calculated by the formula 3*SD of the mean percentage of p24⁺ cells detected in healthy donor samples. As previously reported[77], we observed viral reactivation of dormant HIV **(Figure 4I and Supplementary Figure 6I)**. Notably, the incubation with KLRG1-directed antibodies strongly enhanced the NK-mediated killing of the total pool of viral-reactivated cells (median reduction in p24⁺ cells of 75.15%). This effect was not observed with the control antibody **(Figure 4J-K)**. Moreover, we performed the IPDA (intact proviral DNA assay) in the remaining CD4⁺ T cells in additional samples from 6 ART individuals (participants #71-76, **Table S1**). Reduction in the intact proviruses was observed in 5 out of 6 samples tested **(Figure 4L)**. Altogether, we show that targeting KLRG1 restores the functional abilities of NK

cells and enhances the capacity to kill HIV-infected cells by both natural cytotoxicity and ADCC, and to reduce the natural HIV reservoir after viral reactivation.

Figure 4

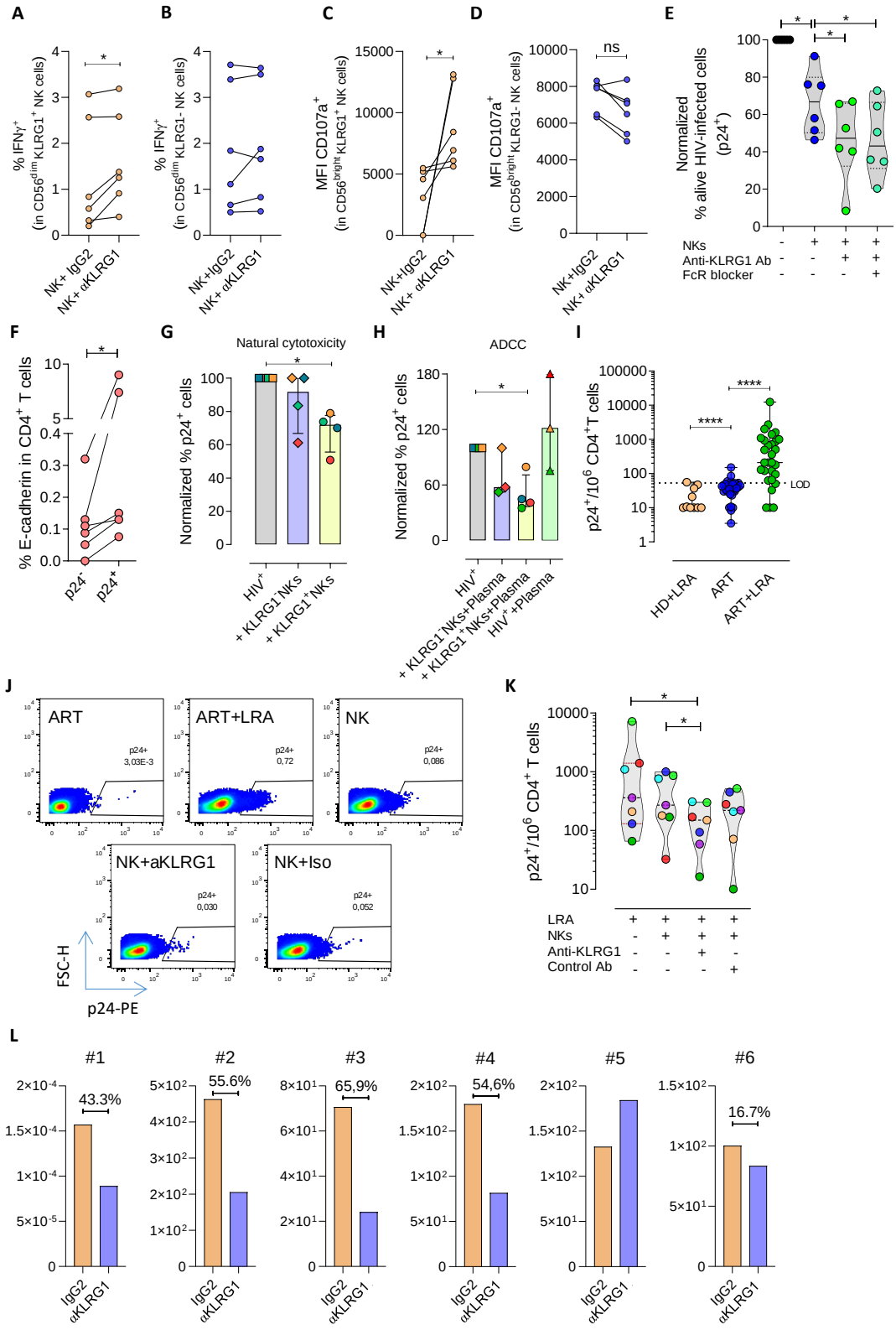


Figure 4. Targeting KLRG1 increases the functional capabilities of NK cells.
NK cells were cultured with *ex vivo* infected CD4⁺ T cells after stimulation with the anti-KLRG1 antibody. Functional parameters on NK cells and direct cell killing of the HIV⁺ targets were quantified by flow cytometry.
(A) Frequency of IFN-γ⁺ cells in NK KLRG1⁺ cells.
(B) Frequency of IFN-γ⁺ cells in NK KLRG1⁻ cells.
(C) Mean Fluorescence Intensity (MFI) of CD107a in KLRG1⁺ cells.
(D) Mean Fluorescence Intensity (MFI) of CD107a in KLRG1⁻ cells.
(E) Reduction in p24⁺ after co-culturing *ex vivo* HIV-infected CD4⁺ T cells with NK cells previously stimulated with the anti-KLRG1 antibody. Fc blocker is shown as a control.
(F) Expression of the molecule E-cadherin on CD4⁺ T cells in infected (p24⁺) and uninfected (p24⁻) cells after *ex vivo* HIV infection.
(G) Natural cytotoxicity assay of *ex vivo* HIV infected CD4⁺ T cells after co-culturing with isolated NK expressing or not the KLRG1 and stimulated with the anti-KLRG1 antibody.
(H) ADCC assay of *ex vivo* HIV infected CD4⁺ T cells after co-culturing with isolated NK expressing or not the KLRG1 and stimulated with the anti-KLRG1 antibody. The condition with plasma from an HIV-positive person is shown as a control. In **(G)** and **(H)** the CD4⁺ T cells and NK cells were isolated by FACS.
(I) P24⁺ cells in samples from ART-suppressed PWH at baseline and after viral reactivation with PMA/ionomycin (LRA). The limit of detection is set up at 53 copies/million cells calculated by the formula 3*SD of the mean percentage of p24⁺ cells detected in healthy donor (HD) samples.
(J) Functional NK assays after reactivation of the natural latent HIV reservoir of isolated CD4⁺ T cells from ART-treated PWH. P24⁺ cells are quantified by flow cytometry as a measure of viral reactivation. This panel shows an example of the p24 staining.
(K) Functional NK assays after reactivation of the natural latent HIV reservoir of isolated CD4⁺ T cells from ART-treated PWH. Summary graph for p24 levels in CD4⁺ T cells after the NK-killing assays. Palivizumab was used as a control antibody.
(L) Intact Proviral DNA Assay (IPDA) in samples from 6 ART-suppressed subjects after performing the NK-killing assay with primary *ex vivo* reactivated CD4⁺ T cells with PMA and Ionomycin, and isolated NK cells. NK were treated with the anti-KLRG1 antibody, or the isotype control IgG2. Percentages of intact proviral reductions are shown for each subject. Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test, Friedman test, or Kruskal-Wallis test, when required. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.
See also Figure S6 and Table S1.

KLRG1 is expressed on CD4⁺ T cells harboring inducible HIV genomes and the anti-KLRG1 antibody induces viral reactivation

Major efforts in the HIV field are directed at finding efficient compounds for both, reactivating latently HIV-infected cells, and stimulating the immune system of PWH to eliminate HIV reservoirs. Therapeutic strategies integrating these two steps are designated as a "shock and kill" approach[140]. For assessing the suitability of using KLRG1 in this approximation, we studied the feasibility of using anti-KLRG1 monoclonal antibodies as latency reversal agents. First, we checked the expression of KLRG1 in CD4⁺ T cells from a cohort of VIR and ART-suppressed PWH (participants #1-40 **Table S1**), and we found a median of 23.6 and 19.4% of these cells expressed the KLRG1 receptor, respectively **(Figure 5A)**. Moreover, in ART individuals the expression of KLRG1 on CD4⁺ T cells directly correlated with the intracellular levels of HIV-RNA **(Figure 5B)**. Interestingly, the targeting of KLRG1 in CD4⁺ T cells with directed antibodies significantly increased the number of viral RNA molecules (median fold increase of 3.2), indicating viral reactivation **(Figure 5C)** (participants #1, 2, 4-6, 9, 12, 62-

64 **Table S1**). Romidepsin was used as a control for viral reactivation **(Supplementary Figure 6J)**. This suggests that KLRG1 may identify a fraction of $CD4^+$ T cells with latent HIV, and/or induce higher levels of HIV-RNA from transcriptionally active HIV-infected cells. We then assessed the content of total HIV DNA in $KLRG1^+$ and $KLRG1^-$ $CD4^+$ T cells isolated by FACS from samples of four ART-suppressed PWH (participants #58-61 **Table S1**). We were able to detect HIV in KLRG1-expressing cells, with similar levels to those observed in the negative KLRG1 population **(Figure 5D)**. Moreover, in lymph node samples from PWH (both VIR and ART-suppressed), we observed cells in the follicles productively infected (dense intracellular p24 staining) and concomitantly expressing KLRG1 on the surface **(Figure 5E, and Supplementary Figure 6K)**. These results indicate that KLRG1 might be found in productively HIV-infected cells. Next, we studied if *ex vivo* HIV infection upregulates the expression of KLRG1 on $CD4^+$ T cells (gating strategy shown in **Supplementary Figure 7**). We found a slight increase in the expression of this receptor, but not in the intensity of expression, upon infection with the HIV_{BaL} strain **(Figures 5F)**, which was not observed with $HIV_{NL4.3}$ **(Figures 5G)**. This suggests that KLRG1 is not selectively induced upon acute HIV infection in $CD4^+$ T cells. Differences between both viral strains might be due to the preferential infection of the Bal isolate for memory CD4 T^+ cells expressing $KLRG1^+$ cells, as previously observed for the PD1 molecule[319]. Overall, our data support the potential of targeting KLRG1 to reactivate the latent HIV reservoir, more likely in combination with other LRAs.

Figure 5

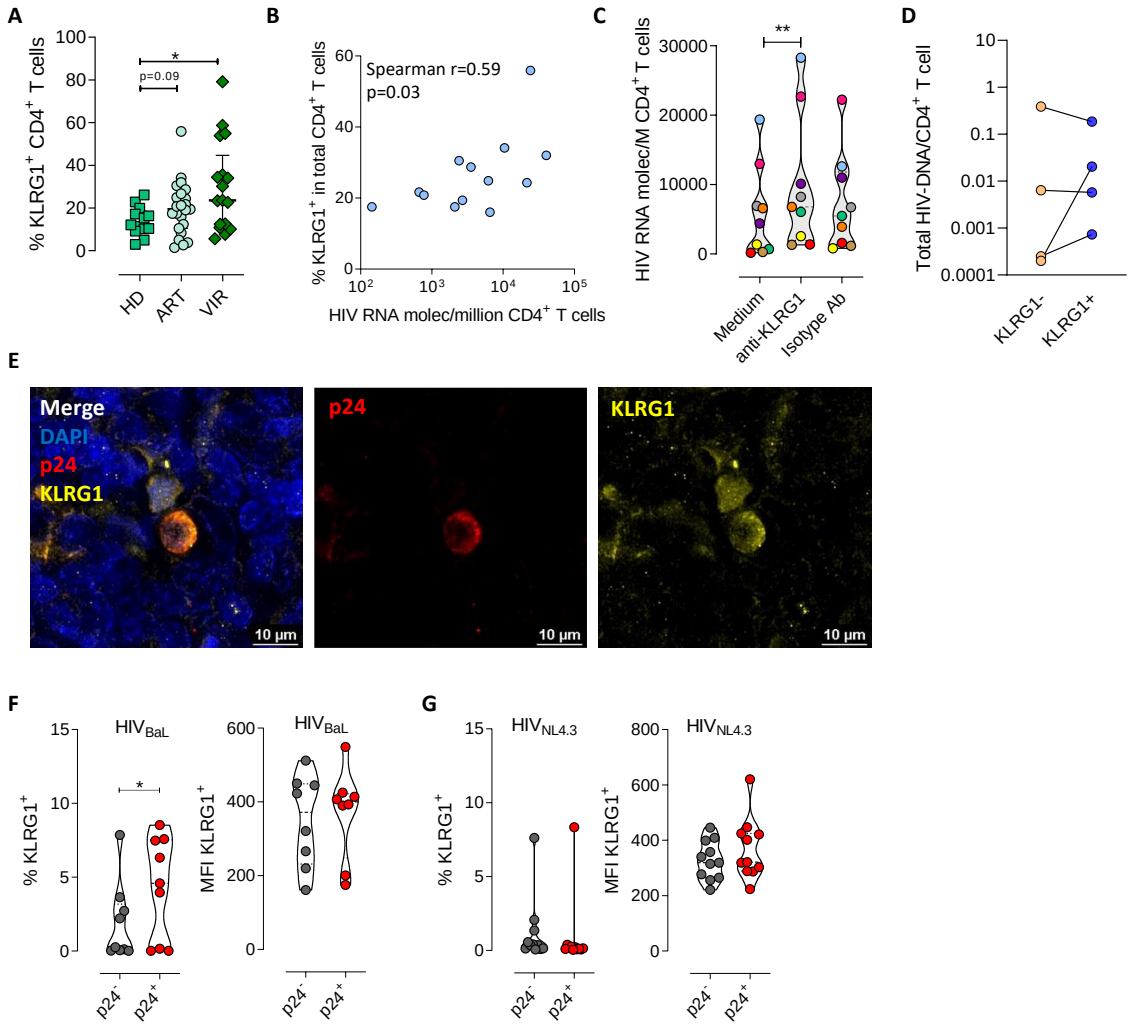


Figure 5. Impact of targeting KLRG1 in CD4+ T cells and in the viral reservoir.

(A) Frequency of KLRG1$^+$ CD4$^+$ T cells in a cohort of healthy donors (HD, n=13), viremic (VIR, n=17), and ART-suppressed (n=23) PWH measured by flow cytometry.

(B) Spearman correlation between the percentage of KLRG1$^+$ CD4$^+$ T cells and the intracellular levels of HIV-RNA.

(C) Intracellular HIV-RNA levels measured by qPCR in CD4$^+$ T cells from ART PWH after stimulation with the anti-KLRG1 antibody or the isotype control antibody (n=10).

(D) Quantification by qPCR of total HIV-DNA in KLRG1$^+$ and KLRG1$^-$ CD4$^+$ T cells isolated by FACS (n = 4).

(E) Representative image of a lymph node section from a VIR HIV-infected PWH (#42). p24 HIV protein is shown in red and KLRG1 in yellow.

(F) Percentage and mean fluorescence intensity expression of KLRG1 in cells infected *ex vivo* with the HIV_{BaL} strain (n=9), or **(G)** the $HIV_{NL4.3}$ strain (n=11). Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test or Friedman test, when required. *p<0.05, **p<0.01.

See also Figures S6, S7 and Table S1.

Discussion

One of the major obstacles to curing HIV is the presence of HIV reservoir cells with limited immune recognition, in part due to the development of immune resistance mechanisms, and the impaired effector function of immune cells[43,77,320–322]. Natural Killer (NK) cells are lymphocytes of the innate immunity with superior capabilities to kill viral-infected cells. HIV infection, however, alters different immune compartments, including NK cells. Hallmarks of this viral infection are the expansion of certain subsets of NK cells, persistent immune activation, and a reduced capacity to perform antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC), which are not fully reverted even after ART-mediated viral control is achieved[154]. Thus, the development of new NK-targeted therapies to reinvigorate their functionality might influence HIV persistence[156,294,295,323]. One potential approach currently being explored is the targeting of NK receptors that restrain cell activity. In the present study, we report that HIV infection expands NK cell subpopulations imprinted with upregulated levels of the inhibitory receptor KLRG1, which have signs of advanced differentiation and impaired activity. Furthermore, ART does not reduce these impaired NK cells. Importantly, we show that targeting the KLRG1 receptor both induces viral reactivation in $CD4^+$ T cells and reverses NK immune exhaustion favoring the elimination of HIV reservoir cells.

Here, we add evidence for the impact of chronic HIV infection on NK cells. We observe the upregulation of KLRG1 on NK cells during untreated and treated infection, in both the PBMCs and the lymph nodes. This is concordant with previous findings showing KLRG1 expression on T and NK cells in chronic conditions, such as other viral infections and cancer[281,308,324,325]. The LNs are a preferential anatomical sanctuary site for HIV persistence and contain a high burden of reservoir cells with transcriptionally-active HIV[314]. Active viral transcription, which has been associated with elevated levels of immune activation, might explain the high expression levels of KLRG1 on NK cells observed within the B cell follicles of PWH. In line with this, we observed a direct correlation between HIV transcription within $CD4^+$ T cells and KLRG1 expression on NK cells from blood. Similarly, augmented levels of KLRG1 have been reported in circulating and hepatic NK cells associated with hepatitis B infection[324], and interestingly, the expression of KLRG1 on NK cells has been reported to respond to cell-intrinsic factors such as cell division and development[309], to exposure to certain cytokines such as IFN-α or IL-12[309], or to even specific treatments such as hydroxychloroquine[326] . Beyond the NK compartment, this receptor is also upregulated on virus-specific $CD8^+$ T lymphocytes during persistent HIV, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus infections[281,308].

Thus, our data and previous evidence suggest that the expression of KLRG1 could be induced on several immune cells following persistent infections.

We also found that KLRG1 expression is largely restricted to the $CD56^{dim}$ NK subset in uninfected subjects. However, HIV infection strongly increases KLRG1 levels in the $CD56^{bright}$ subpopulation. In general, $CD56^{dim}$ cells exhibit a more cytolytic profile whereas $CD56^{bright}$ are known to produce large amounts of cytokines and have enhanced proliferative capacity, being both arms required for viral immune control[327]. Upregulation of the inhibitory KLRG1 on $CD56^{bright}$ NK cells has been previously observed in chronically infected HCV^{+} individuals[291]. Moreover, it has been negatively associated with the potency of the immune responses against HPV16 and the progression of cervical intraepithelial neoplasia[328]. Our data points to HIV as a potent trigger for KLRG1 expression in $CD56^{bright}$ cells. Based on that, we believe that strategies reverting the KLRG1 expression on this specific NK subset may be particularly beneficial.

NK cells exhibit a diversity of phenotypes and functions, which are susceptible to high plasticity[300]. Our analyses show that KLRG1 distinguishes NK populations with elevated expression of important receptors involved in the differentiation and regulation of their function, such as CD57, CD16, NKG2C, and KIRs. Concordantly, it has been shown that mature NK cells express high levels of KLRG1[300]. Specifically, CD16 has a strong activating potential and allows NK cells to mediate ADCC activity. Published data support the relevant role of ADCC in the control of HIV and SIV infection, and in shaping the viral reservoir during treated infection[77,329,330].

We also find that HIV infection impacts the phenotype of $KLRG1^{+}$ NK cells significantly increasing the expression of the NKG2C receptor. This is noteworthy since this receptor is, in part, governing the tolerance or the reactivity of the NK cells towards the target cell; NKG2C provides activating signaling upon engaging its ligand, the HLA-E, expressed on the target cell. Moreover, NKG2C expression has been linked to memory-like features, particularly in CMV infection[331]. Importantly, ART does not normalize most $KLRG1^{+}$ NK populations, and cells expressing high levels of NKG2C are particularly persisting. We speculate that these cells may represent a new subpopulation of NK cells generated in response to HIV infection with features of memory cells, as previously reported for CMV infection[331]. Concordantly, a recent study has identified KLRG1 as a marker of NK cells with immune memory attributes in HCV-infected individuals[332].

Hallmarks for NK dysfunctionality are considered decreased NK effector functions such as natural cytotoxicity, as well as reduced IFN-γ secretion and degranulation[333]. Here we observe that KLRG1$^+$ NK cells are functionally impaired when stimulated with K562 cell line targets. While we cannot rule out the possibility that the difference in function between the KLRG1 positive and negative cells is due to differences in triggering of other NK cell receptors that affect cell function, the K562 data along with the HIV-infected cell killing assays is suggestive that NK cells expressing KLRG1 are in a state of functional exhaustion. This concurs with a prior report showing that prolonged NK stimulation leads to functional cell exhaustion with increased expression of KLRG1, among other factors[334]. Thus, we wanted to test if immune checkpoint blockade directed to KLRG1 could reprogram NK cell activation and boost a strong immune response against HIV-infected cells. Checkpoint blockade therapy, with PD-1 and its cognate ligand as the most studied targets, has demonstrated great benefit at reinvigorating exhausted cytotoxic T cells in several cancers[318]. However, less attention has been paid to NK cells. Previous studies have proved that KLRG1 blockade might be a useful intervention to stimulate both NK and T cell anti-tumor immunity, which could even synergize with PD-1 checkpoint therapy[335]. The blockade of KLRG1 signaling in NK cells from HCV-infected individuals enhanced the production of IFN-γ in both CD3$^-$ CD56^{dim} and CD3$^-$CD56^{bright} NK cells[291]. Besides, in vivo anti-KLRG1 antibody therapy reduced lung metastases, and also in combination with anti-PD-1 therapy reduced tumor volume and improved survival[336]. Moreover, in the context of HIV infection, the blockade of KLRG1 restored the function of a population of exhausted HIV-specific CD8$^+$ T cells, enhancing their cytokine response[337]. Here, we show that immunotherapy against the KLRG1 enhances NK cell function. Importantly, we detect high natural cytotoxicity and ADCC NK responses against HIV-infected targets after KLRG1 targeting, which is concordant with previous data in HCV[324]. In line with this result, elevated levels of E-cadherin, a ligand for the KLRG1 molecule with potential to inhibit NK cytotoxicity[282] and HIV-1-specific CD8$^+$ T cells, have been reported[287]. Thus, besides the potential benefit of targeting KLRG1 in blood, PWH could benefit from masking the interaction between KLRG1 and E-cadherin to boost their antiviral immunity in tissues[337]. Of relevance, we also provide direct evidence of the beneficial role of targeting KLRG1 to facilitate the elimination of the natural reservoir after *ex vivo* viral reactivation in samples from PWH.

Furthermore, we analyzed the expression of KLRG1 on CD4$^+$ T cells. We observed higher frequencies of KLRG1$^+$CD4$^+$ T cells during untreated HIV infection, which seems to be almost normalized after ART. We believe that the elevated expression of KLRG1 on CD4$^+$

lymphocytes is the consequence of the viral-induced immune activation observed during the period of the uncontrolled infection or during HIV persistence in treated patients, rather than a direct effect of HIV on target cells. Concordantly, we observed HIV-infected cells expressing KLRG1 in the lymph nodes in VIR PWH, but we failed to observe upregulation of KLRG1 after *ex vivo* infection of unstimulated $CD4^+$ T cells. Still, we detected proviral HIV DNA in $KLRG1^+CD4^+$ T cells from ART-suppressed PWH and targeting the KLRG1 receptor increased viral transcription. This data is in line with the idea that the expression of immune checkpoints, such as the KLRG1, on HIV reservoir cells may limit proviral expression[85]. Although here we do not provide information about the integrity of the reactivated viral genomes, a recent study has identified clonally expanded $CD4^+$ T cells expressing KLRG1 and harboring genome-intact HIV proviruses[85].

Overall, we provide relevant information regarding the immune regulator KLRG1 during untreated and treated HIV infection, in blood and tissue. Based on our results, we speculate that KLRG1 could represent a target to impact HIV persistence. Preclinical studies in animal models are warranted.

Limitations of the study

The main limitations of this study are i) the immunohistochemistry studies with lymph node samples were only performed in two PWH. We are currently making an effort to increase the repository of these precious samples, ii) we have studied the functionality of KLRG1^{+} in blood, however, NK cells expressing this receptor might have different functional activities in different tissues[196], and iii) due to sample availability we did not study longitudinal samples obtained from PWH. For instance, there is the possibility that very long-term ART may revert the expanded NK clusters expressing KLRG1 in PWH.

Supplementary data

Supplementary Figure 1

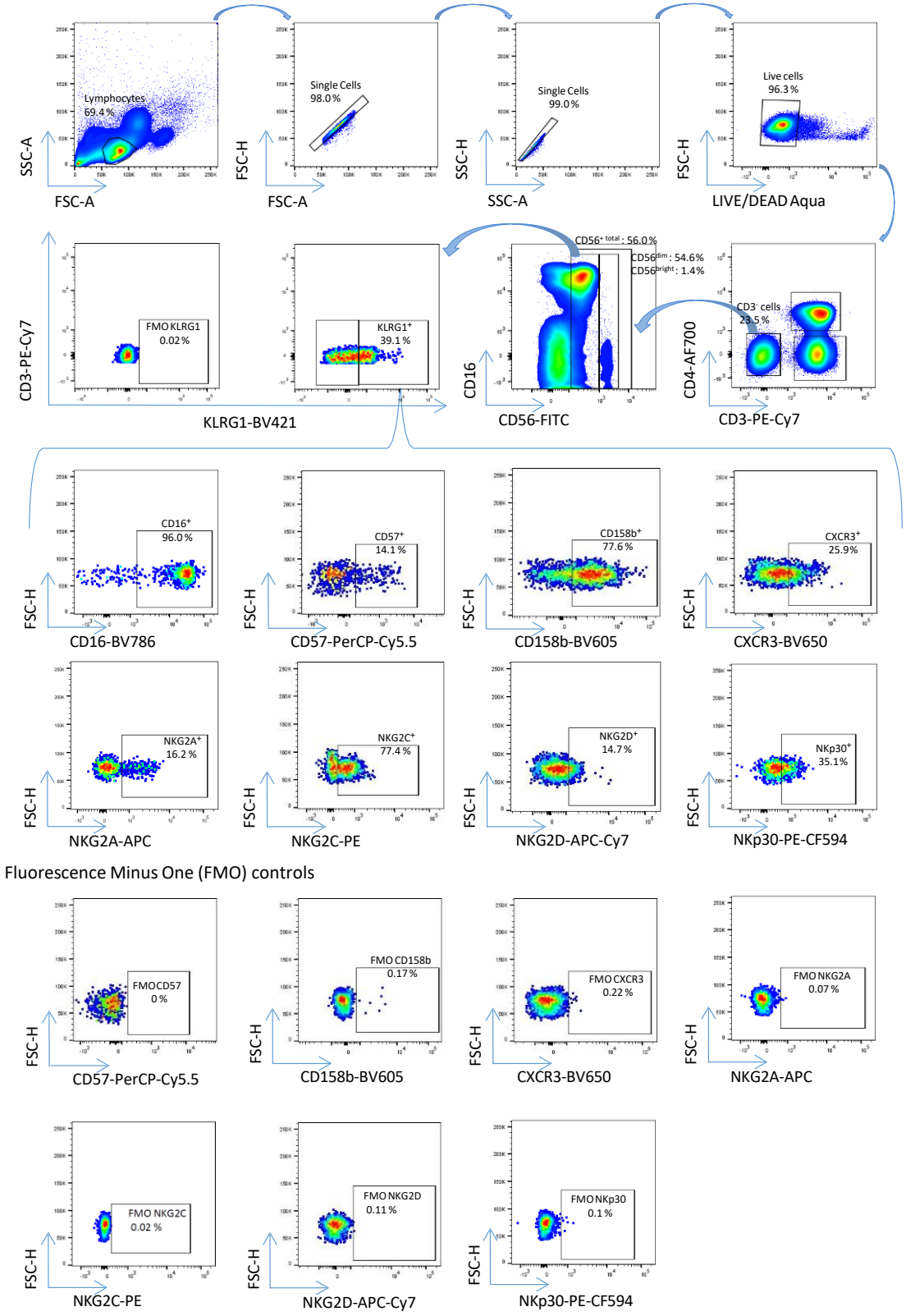


Figure S1. Gating strategy used for the quantification of the different NK receptors.
FMOs are shown for markers with continuous expression.

Supplementary Figure 2

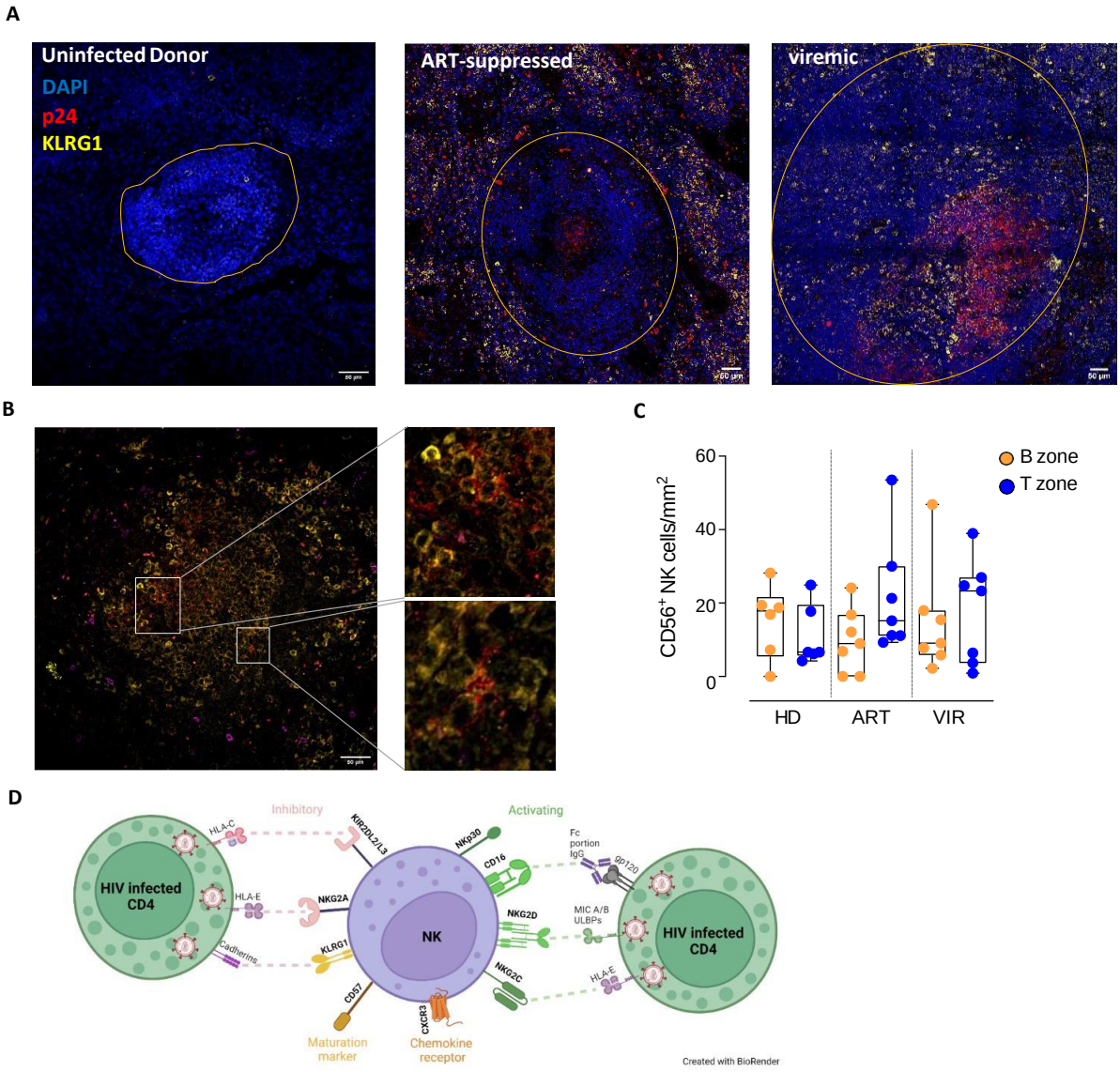


Figure S2. Visualization of KLRG1 expression and quantification of CD56⁺ cells in lymph nodes.
(A) Representative images of a lymph node corresponding to an uninfected donor (HD), one ART-suppressed (#41), and one VIR (#42) PWH. P24⁺ cells are visualized in red and KLRG1⁺ in yellow. Cell nuclei are stained with DAPI and is shown in blue. Orange dashed lines indicate the limit between the intrafollicular (B zone) and extrafollicular (T zone) zones. B and T cell zones were identified based on the intensity of the DAPI staining and the morphology of the cell nuclei.
(B) Representative micrograph of a lymph node section from one HIV⁺ VIR individual stained with anti-CD56 (purple), anti-KLRG1 (yellow), and anti-p24 (red) antibodies. White boxes indicate regions with different p24 pattern staining. The right panels correspond to zoomed views of network-like staining, probably corresponding to virions captured by follicular dendritic cells (upper panel), and cells with a more dense spherical signal indicating productive HIV infection (lower panel).
(C) Number of CD56⁺ NK cells per mm^2 in lymph node samples from an HD, one ART, and one VIR PWH (each dot corresponds to one follicle). Comparisons intra-sample between values in the B or T-zones were performed using the Wilcoxon test, and comparisons inter-sample between PWH and HD were performed using the Mann–Whitney test.
(D) NK receptors included in the study. NK cells express an array of receptors with activating or inhibitory potential upon interaction with ligands found on HIV-infected cells. For this study, we have included the following

receptors; the natural cytotoxicity receptor NKp30, the maturation marker CD57, the chemokine receptor CXCR3, the activating receptor CD16 which mediates ADCC, the activating receptors NKG2D and NKG2C, which are able to interact with the major histocompatibility complex (MHC) class I-related molecules MIC A/B and different UL16-binding proteins (ULBPs), or HLA-E, respectively. Moreover, we included the NK inhibitory receptor NKG2A, a C-type lectin-like inhibitory receptor that influences the NK effector responses through the interaction with HLA-E ligand, and killer-cell immunoglobulin-like receptor KIR2DL2/L3, which is able to interact with HLA-C ligands. All potential interactions are depicted in this figure.

Supplementary Figure 3

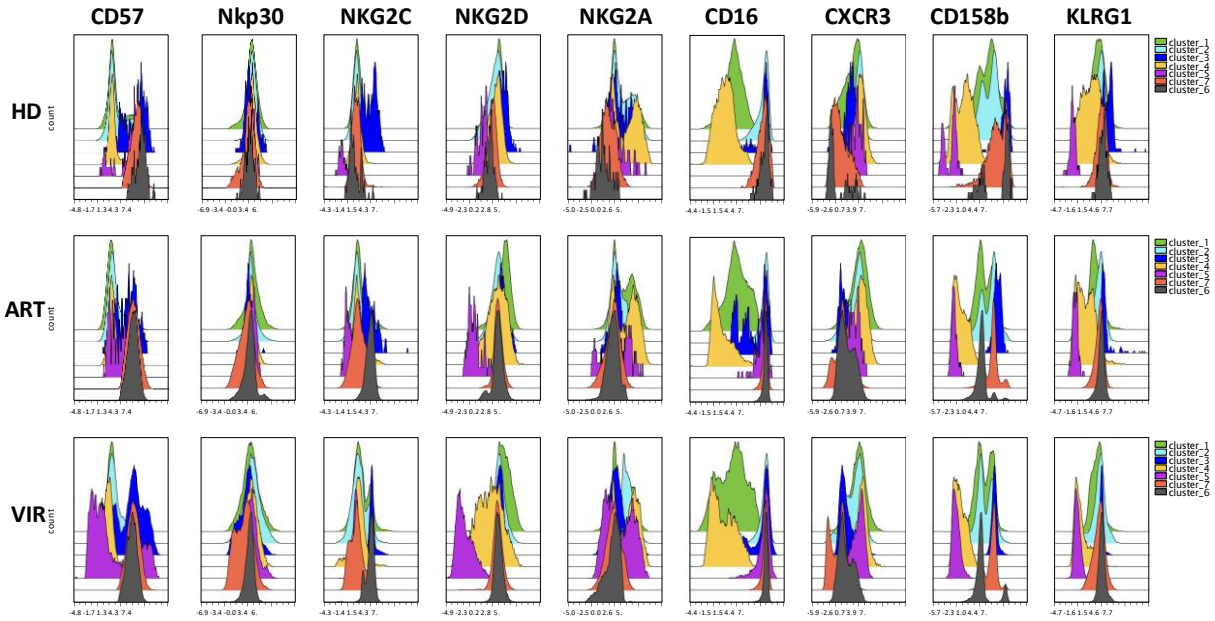


Figure S3. Expression of NK receptors in the different NK clusters.
Histograms showing the intensity of expression of the different markers on the NK clusters represented in different colors. Cohorts (HD, ART, and VIR) are shown in different lines.

Supplementary Figure 4

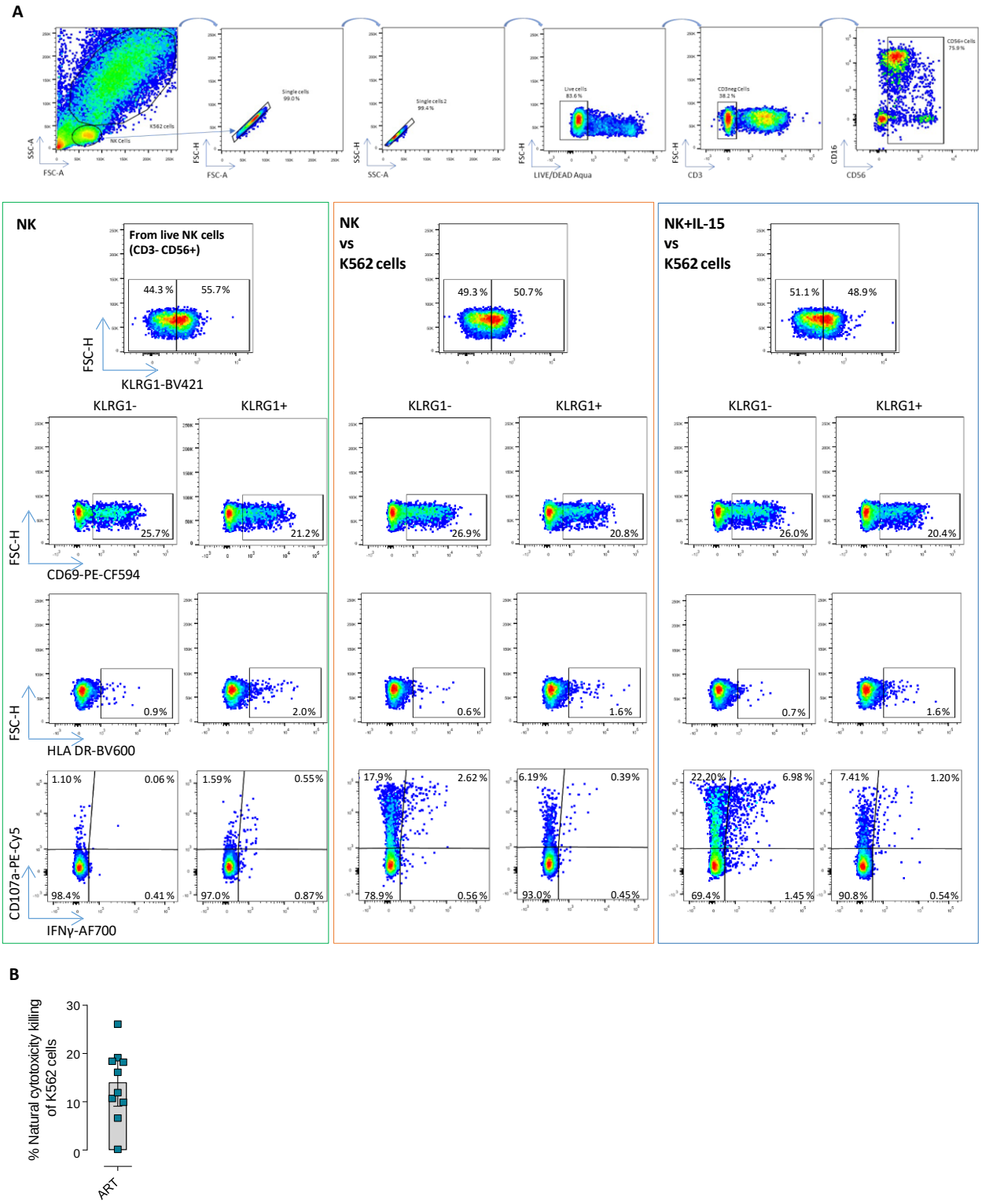


Figure S4. Gating Strategy.

(A) Gating strategy used for the analyses of the functional NK assays using the K562 MHC-devoid cell line, with and without the stimulation with IL-15.
(B) Natural cytotoxicity killing assay of the K562 cell line after coculturing with NK cells isolated from different ART PWH.

Supplementary Figure 5

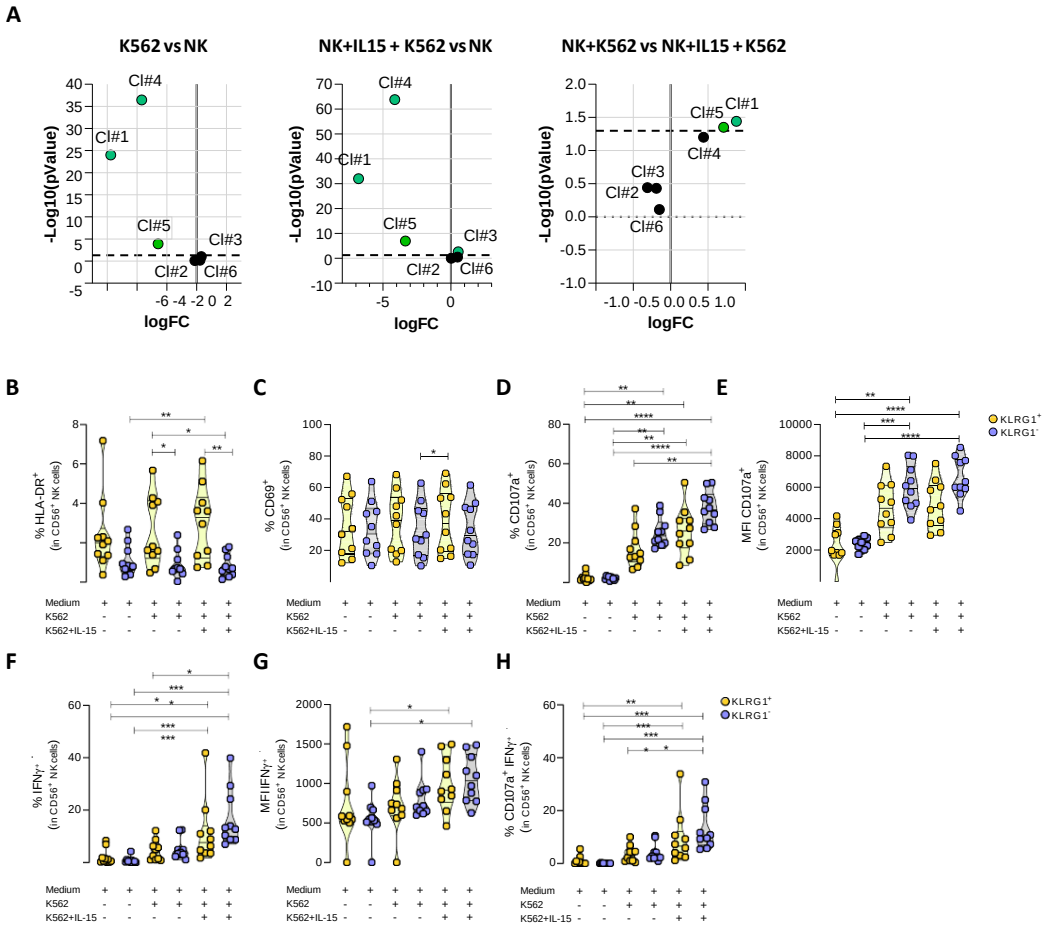


Figure S5. Functional assays.

(A) Volcano plots showing the statistically significant differences in the cluster composition between conditions; NK alone, NK+K562, and NK (IL-15)+K562.

(B) Percentage of HLA-DR$^+$ cells in total CD56$^+$ KLRG1$^+$ (yellow) or KLRG1$^-$ (blue) NK cells in basal conditions, after co-culturing with the K562 target cells and with the additional IL-15 stimulus. Similarly, the values of other parameters are represented in **(C)** frequency of CD69$^+$ cells, **(D)** percentage of cells expressing the CD107a degranulation marker, **(E)** Mean Fluorescence Intensity (MFI intensity) signal for CD107a expression, **(F)** frequency of cells producing IFN-γ, **(G)** MFI for IFN-γ, and **(H)** percentage of polyfunctional, double positive CD107a$^+$IFN-γ$^+$ cells. All graphs represent the median and ranges. Statistical comparisons were performed using the Friedman test or Kruskall-Wallis, when required. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

Supplementary Figure 6

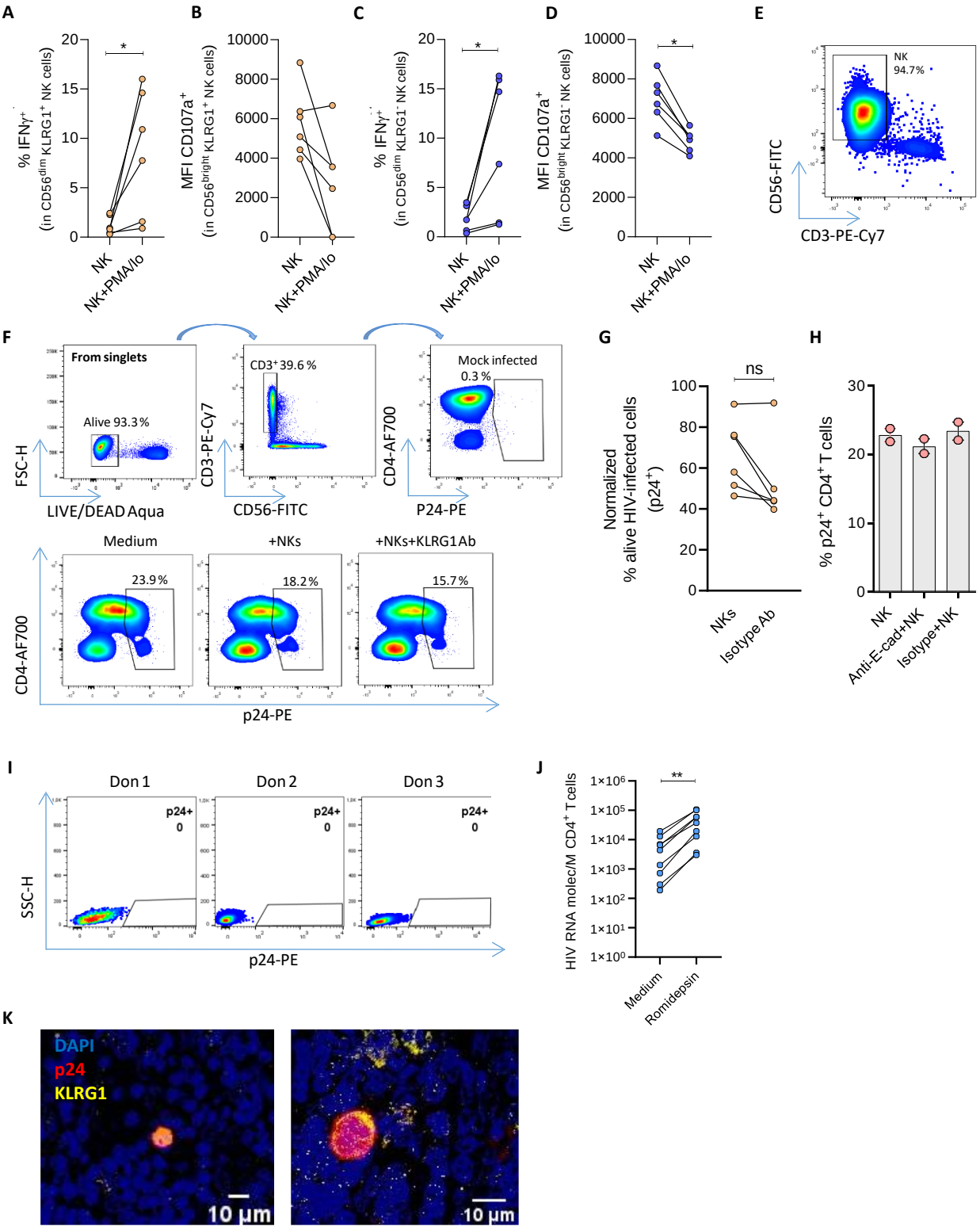


Figure S6. Expression of functional molecules after NK stimulation and NK killing assays.
NK cells were cultured with *ex vivo* infected CD4⁺ T cells alone or after stimulation with the positive control PMA/Ionomycin. Functional parameters were quantified by flow cytometry.
(A) Frequency of IFN-γ⁺ cells in NK KLRG1⁺ cells, **(B)** Mean Fluorescence Intensity (MFI) of CD107a in KLRG1⁺ cells, **(C)** frequency of IFN-γ⁺ cells in NK KLRG1⁻ cells, **(D)** MFI of CD107a in KLRG1⁻ cells. Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. *p<0.05.
(E) Purity of the NK cells used in the NK-killing assays after ex vivo infection, and after viral reactivation of the natural viral reservoir from ART PWH samples.
(F) Gating strategy used for the identification of ex vivo HIV-infected cells in the NK-killing assays, with and without the addition of the anti-KLRG1 antibody.
(G) Reduction in p24⁺ after co-culturing *ex vivo* HIV-infected CD4⁺ T cells with NK cells alone or previously stimulated with an isotype control.
(H) NK-killing assays after blocking the E-cadherin protein with blocking antibodies.
(I) p24 staining in samples from 3 healthy donors after cell activation with PMA+Ionomycin.
(J) Intracellular HIV-RNA levels measured by qPCR in CD4⁺ T cells from ART PWH after stimulation with romidepsin as a positive control (n=10).
(K) Two images of productively HIV-infected cells expressing the receptor KLRG1 in lymph nodes. p24 HIV protein is shown in red and KLRG1 in yellow.

Supplementary Figure 7

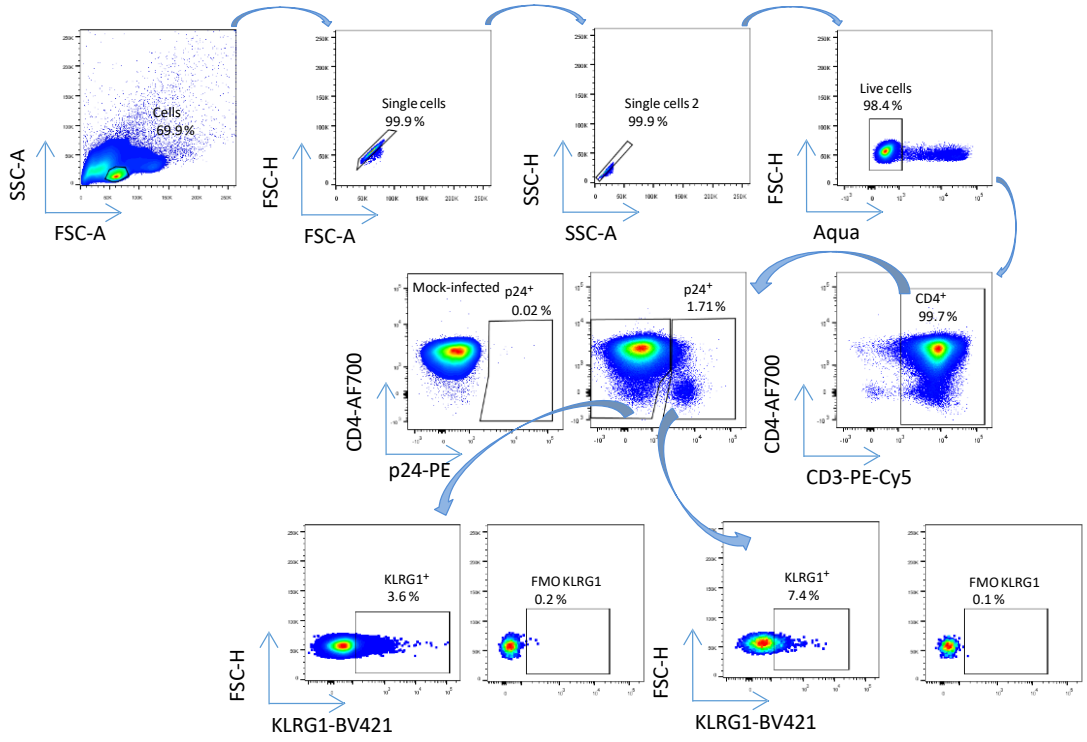


Figure S7. Gating strategy used for the detection of CD4⁺ T cells expressing the KLRG1 receptor after ex vivo viral infection.

Supplementary Table S1

#PWH ID	Age (years)	Sex	Time since HIV diagnosis (months)	$CD4^+$ T Cell Count (cells/µl)	% CD4	Viral Load (copies/ml)	Time on ART with VL suppressed (months)
1	26	F	50	740	29.1	<50	47
2	44	M	76	1280	40.6	<50	60
3	70	F	74	280	11.2	<50	68
4	39	M	78	430	20.4	<50	72
5	52	M	150	780	39.5	<50	82
6	43	F	38	430	17.9	<50	31
7	44	M	46	770	24.0	<50	34
8	47	F	294	250	20.0	<50	45
9	38	M	178	850	39.5	<50	81
10	49	M	106	750	29	<50	53
11	28	M	41	580	33.7	<50	34
12	62	M	74	590	22.0	<50	52
13	68	M	403	650	27.8	<50	98
14	46	M	226	510	34.6	<50	123
15	41	M	143	380	23.5	<50	123
16	38	M	70	1100	43.5	<50	47
17	59	F	43	1120	52.0	<50	35
18	32	M	55	770	34.1	<50	53
19	52	M	44	750	35.1	<50	37
20	35	M	125	900	37.6	<50	59
21	58	F	453	1070	44.5	<50	48
22	36	F	57	800	36.7	<50	54
23	23	F	30	830	43.1	<50	24
24	32	M	81	730	30.0	4100	N/A
25	47	M	73	320	22.1	47300	N/A
26	25	F	303	150	13.0	31200	N/A
27	42	M	65	830	30.0	57900	N/A
28	41	M	22	470	27.3	5680	N/A
29	44	M	2	N/A	N/A	N/A	N/A
30	28	M	1	80	14.9	148000	N/A
31	53	F	210	240	10.2	124	N/A
32	28	F	335	230	28.3	78600	N/A
33	55	M	85	240	11.0	834000	N/A
34	46	M	45	760	21.1	11000	N/A
35	27	M	2	710	32.7	69000	N/A
36	24	F	*12 days	470	35.1	54800	N/A
37	37	M	*7 days	410	21.4	333000	N/A
38	52	M	2	840	47.0	855000	N/A
39	23	M	8	420	30.5	74500	N/A
40	19	M	*4 days	460	32.0	52900	N/A
41	55	M	94	600	10.3	<50	40
42	N/A	N/A	*3 days	150	7.5	5000000	N/A
43	61	M	74	590	25.1	<50	52
44	43	M	46	770	23.9	<50	35
45	26	F	43	1120	52.0	<50	35
46	32	M	118	750	32.6	<50	114
47	64	F	63	230	12.9	<50	61
48	46	M	65	580	30.0	<50	52
49	62	M	276	530	31.0	<50	208

50	31	M	73	480	29.0	<50	65
51	54	M	374	840	27.6	<50	56
52	43	M	156	1110	48.5	<50	119
53	53	M	22	920	36.0	<50	4
54	54	F	381	620	37.3	<50	30
55	31	M	22	530	40.7	<50	6
56	50	F	265	1610	53.4	<50	109
57	79	F	263	420	23.5	<50	81
58	84	M	159	730	26.4	<50	87
59	50	M	156	580	28.0	<50	93
60	61	M	390	380	12.2	<50	69
61	48	M	239	530	31.4	<50	221
62	48	F	300	310	23.0	<50	51
63	29	F	100	1300	40.7	<50	50
64	61	M	275	490	33.9	<50	86
65	38	M	42	730	40.3	<50	20
66	30	F	33	950	32.1	<50	12
67	37	M	66	1430	38.0	<50	43
68	57	M	381	870	31.9	<50	51
69	34	F	18	1520	46.4	<50	12
70	64	M	121	370	23.5	<50	100
71	55	M	189	880	36.2	<50	112
72	32	M	142	770	46.3	<50	116
73	30	F	101	590	28.8	<50	98
74	56	M	52	1470	50.6	<50	34
75	52	M	170	1280	40.8	<50	157
76	63	M	205	1190	41.7	<50	137

Table S1. Clinical data of PWH included in the study.
PWH: people with HIV; FTC: emtricitabine; TDF: tenofovir; NVP: nevirapine; ATV: atazanavir; 3TC: lamivudine; EFV: efavirenz; ABC: abacavir; RAL: raltegravir; EVG: elvitegravir; DTG: dolutegravir; DRV: darunavir; RPV: Rilpivirine; TAF: tenofovir alafenamida; BIC: Bictegravir; LPV: Lopinavir; COBI: boosted with cobicistat; ATRIPLA: TDF+FTC+EFV; UNT: untreated; N/A: Not Available; VL: viral load; ART: antiretroviral therapy; M: male; F: female.

2. TREBALL 2

Títol

RESPOSTA INICIAL DE LES CÈL·LULES NK RESIDENTS A LA INFECCIÓ LOCAL PER VIH EN EL TEIXIT LIMFÀTIC

Títle

EARLY RESIDENT NK CELL RESPONSE TO LOCAL HIV INFECTION IN LYMPHOID TISSUE

Resum

Les estratègies efectives per combatre el VIH han de considerar els microambients tissulars únics on el virus estableix reservoris a llarg termini, els quals romanen com la principal barrera per a la cura. Mentre que les cèl·lules NK juguen un paper crucial en la immunitat basada en teixits, les funcions de les cèl·lules NK residents en teixits amb trets adaptatius encara són àmpliament desconegudes. En aquest estudi, utilitzant un model d'explant d'amígdales humanes per a la infecció per VIH, vam identificar les cèl·lules NK $CD16^{-}CD69^{+}$, la subpoblació més abundant, com a hipereactives després de l'exposició al VIH i les més efectives en la mort directa de cèl·lules infectades amb VIH. Les cèl·lules NK $CD16^{-}CD49a^{+}$ van mostrar la major capacitat de producció d'IFN-γ, i la co-expressió de CD103 (cèl·lules tipus ILC1 intraepitelials), juntament amb el marcador de memòria NKG2C, es va associar amb nivells reduïts d'infecció per VIH en els explants de teixit. En canvi, les cèl·lules NK $CD16^{+}CD49a^{+}$ van perdre la seva capacitat de degranulació i van mostrar una expressió augmentada de PD-1 en exposar-se al VIH. Destacablement, la presència d'NKG2C i de *Killer Immunoglobulin-like Receptors* en aquestes cèl·lules també es va relacionar amb nivells d'infecció més baixos. Aquest estudi destaca el paper de les cèl·lules NK residents en teixits com a efectors immunitaris clau per limitar la infecció per VIH dins dels teixits limfàtics i identifica possibles objectius cel·lulars per a futures immunoteràpies orientades a reduir els reservoris de VIH en els teixits.

Abstract

Effective strategies to combat HIV must consider the unique tissue microenvironments where the virus establishes long-term reservoirs, which remain the primary barrier to a cure. While NK cells play a crucial role in tissue-based immunity, the functions of tissue-resident NK cells with adaptive traits are still largely unknown. In this study, using a human tonsillar explant

model of HIV infection, we identified $CD16^{-}CD69^{+}$ NK cells, the most abundant subset, as becoming hyperreactive following HIV exposure and the most effective at directly killing HIV-infected cells. $CD16^{-}CD49a^{+}$ NK cells exhibited the highest capacity for IFN-γ production, and the co-expression of CD103 (intraepithelial ILC1-like cells), together with the memory marker NKG2C, was associated with reduced levels of HIV infection in the tissue explants. In contrast, $CD16^{+}CD49a^{+}$ NK cells lost their degranulation ability and showed increased PD-1 expression upon HIV infection. Notably, the presence of NKG2C and Killer Immunoglobulin-like Receptors in these cells was also related with lower infection levels. This study highlights the role of tissue-resident NK cells as key immune effectors in limiting HIV infection within lymphoid tissues and identifies potential cellular targets for future immunotherapies aimed at reducing HIV reservoirs in tissues.

Introduction

HIV primarily replicates in $CD4^+$ T lymphocytes and causes AIDS if untreated. Presently, while antiretroviral therapy (ART) can reduce the viral load to undetectable levels, HIV remains an incurable condition[338]. During acute infection, HIV rapidly disseminates to secondary lymphoid tissues, where reservoirs are quickly established[339]. Even with ART, lymphoid tissue and the gastrointestinal tract act as key sanctuaries for HIV persistence, posing a major obstacle to a cure[99,239]. Natural killer (NK) cells are innate lymphocytes that efficiently kill tumor and infected cells without prior antigen sensitization[340,341]; thus, the recruitment of functionally mature NK cells may efficiently control HIV[239]. In African green monkeys (AGMs), an animal model of SIV control, viral infection induces the expansion of terminally differentiated NK cells in secondary lymphoid tissues, which mediate a strong control of the infection[264]. The recruitment of cytotoxic NK cells has been linked to increased IL-15 production, specifically localized in B cell follicles of AGMs[267]. In humans, elevated NK cell levels in lymph nodes have been observed during the first weeks of HIV infection[242,342], contrasting with their scarce presence one year later due to impaired NK cell migration[239]. The slow recruitment of cytotoxic NK cells may provide a window time for the establishment of latently infected cells in lymphoid tissues, as HIV can reach lymph nodes as early as five days after infection[339]. Moreover, infected lymphoid tissue undergoes rapid structural remodeling[343,344] and loss of functional integrity[94,345], which are essential for mounting an effective immune response. Therefore, understanding the dynamics of NK cells already residing within these tissues is crucial, as they may act as early innate immune responders to HIV infection, potentially limiting viral persistence.

Extensive research has been conducted on NK cells present in peripheral blood, where cytokines activate less differentiated $CD56^+CD16^-$ NK cells prompting them to quickly respond and eliminate abnormal cells[164]. Generally, their functional response is activated by surface receptors that transduce activating and inhibitory signals. Among these receptors, there are Killer Cell Ig-like Receptors (KIRs), Natural Cytotoxicity Receptors (NCRs; NKp30, NKp44, NKp46), C-type-Lectin Receptors (CLRs; NKG2A, NKG2C, NKG2D) as well as immune checkpoints (ICs; PD-1, TIGIT, KLRG1)[227,346–348]. Of special interest is the CD16 molecule, which links innate and adaptive immunities to selectively kill target cells by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)[164]. Circulating $CD56^+$ NK cells can also home to tissues, giving rise to tissue-resident NK cells (trNK cells)[112,196,349]. Most tissues contain trNK cells, which express the markers involved in the retention of the cells, such as

CD69, CD49a, and CD103[196]. In general, trNK cells are typically less cytotoxic than blood NK cells[350], and seem to produce higher levels of cytokines such as IFN-γ[241,351,352]. Animal models have shown that trNK cells proliferate locally in response to acute and chronic viral infections[221], and can directly regulate the magnitude of T-cell specific immune response[353]. Notably, the expression of various resident markers is associated with distinct functional outcomes, as illustrated in the healthy lung[218] and liver[217]. For example, $CD56^{+}CD16^{-}CD49a^{+}$ NK cells produce elevated levels of proinflammatory cytokines but demonstrate poor degranulation[218,220]. Furthermore, recent studies indicate that the tissue site can also dictate the potential functions of trNK subsets. In a seminal study, Dogra *et al*. detailed the organ distribution of classic $CD56^{bright}CD16^{-}$ (proinflammatory) and $CD56^{dim}CD16^{+}$ (cytotoxic) NK subsets[196], revealing tissue-specific divergences, with $CD56^{bright}CD16^{-}$ NK cells predominating in lymph nodes, tonsil, and the gut[196,259]. Others have further described tonsil-resident NK cells similar to circulating $CD56^{bright}$ NK cells, mainly lacking perforin, KIRs, NKp30, and CD16, but partially expressing NKp44 and NKp46[179,209,250,259,350,354]. Moreover, trNK cells may possess organ-specific functions exclusively associated with different organs. For example, in the uterus, they play a role in placental vascular remodeling, fetal growth, and memory of pregnancy[197–199]. Despite all recent advancements, the functional diversity, subset heterogeneity, and developmental origin of trNK cells are yet to be fully elucidated.

NK cells are essentially innate immune effectors, but adaptive or memory-like NK cells have been observed to be selectively expanded in some viral infections. Human cytomegalovirus (HCMV) infection expands a $KIRs^{+}NKG2C^{+}$ NK population[192,355] that display adaptive NK capabilities and exhibit characteristics such as recall response and long-lived immunity features[356]. The most widely recognized marker of memory NK cells is NKG2C, which facilitates the recognition of specific viral antigens[195]. Additionally, the KIR repertoire is closely associated with adaptive NK cells, playing a crucial role in the education of NK cells prior to the acquisition of NKG2C[357]. These findings uncover that, despite NK cells have been traditionally considered innate lymphocytes, there is a growing body of evidence highlighting the specificity of NK cells to certain human viruses[192,221,222,358–360], including HIV[195]. However, except for the case of $CD49a^{+}$ trNK cells[220–222], this memory-like activity has been predominantly found in circulating NK cells. Importantly, the role of tissue-resident memory NK cells (trmNK cells) during HIV infection and the modulation of these NK cells by HIV in tissues are pivotal questions that are still unclear.

Here, using an *ex vivo* explant model of HIV-infected human tonsillar tissue, we demonstrate how the expression of tissue-resident memory markers and immune checkpoints influences

the function of tonsillar NK cells during HIV infection. We identify distinct NK populations with antiviral properties targeting HIV-infected cells and reveal how HIV-induced changes in NK cells are associated with viral burden in the tissue. Additionally, our findings underscore the importance of assessing NK cell activity in more physiologically relevant models. This work provides crucial insights into the immune landscape of HIV infection in lymphoid tissues and highlights potential avenues for enhancing NK cell-mediated antiviral responses in therapeutic strategies.

Materials and Methods

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
FITC anti-human CD56 Clone B159	Becton Dickinson	Cat#562794; RRID:AB_2737799
PE-Cy7 anti-human CD49a Clone TS2/7	BioLegend	Cat#328312; RRID:AB_2566272
PE-Cy5.5 anti-human CD158a, h Clone EB6B	Beckman Coulter	Cat#A66898; RRID:AB_2857330
PE-Cy5.5 anti-human CD158b1/b2, j Clone GL183	Beckman Coulter	Cat#A66900; RRID:AB_2857331
PE-CF594 anti-human CD69 Clone FN50	Becton Dickinson	Cat#562645; RRID:AB_2737699
PE anti-human NKG2C Clone 134591	R&D Systems	Cat#FAB138P; RRID:AB_2132983
APC anti-human CD3 Clone SK7	BioLegend	Cat#344812; RRID:AB_10645473
BV786 anti-human CD16 Clone 3G8	Becton Dickinson	Cat#563690; RRID:AB_2744299
BV650 anti-human CD103 Clone Ber-ACT8	Becton Dickinson	Cat#743653; RRID:AB_2741655
BV605 anti-human CD45 Clone HI30	Becton Dickinson	Cat#564047; RRID:AB_2744403
V500 anti-human CD14 Clone MφP9	Becton Dickinson	Cat#562693; RRID:AB_2737727
V500 anti-human CD19 Clone HIB19	Becton Dickinson	Cat#561121; RRID:AB_10562391
APC-Fire750 anti-human CD19 Clone HIB19	BioLegend	Cat#302258; RRID:AB_2629691
BV421 anti-human CD107a Clone H4A3	Becton Dickinson	Cat#562623; RRID:AB_2737685
AF700 anti-human IFN-γ Clone B27	ThermoFisher	Cat#MHCIFG29; RRID:AB_2539767
BB700 anti-human c-kit Clone YB5.B8	Becton Dickinson	Cat#566548; RRID:AB_2744268
APC-Vio770 anti-human CRTH2 Clone REA598	Miltenyi Biotec	Cat#130-119-623; RRID:AB_2751763
AF700 anti-human CD45 Clone HI30	BioLegend	Cat#304024; RRID:AB_493760
BV605 anti-human CD127 Clone A019D5	BioLegend	Cat#351334; RRID:AB_2562022
BV421 anti-human NKp44 Clone p44-8	Becton Dickinson	Cat#744299; RRID:AB_2742129
AF700 anti-human CD3 Clone SK7	BioLegend	Cat#344822; RRID:AB_2563420
BV605 anti-human CD4 Clone RPA-T4	Becton Dickinson	Cat#562658; RRID:AB_2744403
BV650 anti-human CD8 Clone RPA-T8	Becton Dickinson	Cat#563821; RRID:AB_2744462
APC anti-human CD8 Clone RPA-T8	Becton Dickinson	Cat#555369; RRID:AB_398595
PE anti-HIV p24 Clone KC57-RD1	Beckman Coulter	Cat#6604667; RRID:AB_1575989
BB700 anti-human CXCR5 Clone RF8B2	Becton Dickinson	Cat#566469; RRID:AB_2869769
PerCP-Cy5.5 anti-human CD137 Clone 4B4-1	BioLegend	Cat#309818; RRID:AB_2207741
APC-Fire750 anti-human PD-1 Clone EH12.2H7	BioLegend	Cat#329954; RRID:AB_2616721
APC-Cy7 anti-human CD25 Clone M-A251	Becton Dickinson	Cat#557753; RRID:AB_396859
AF647 anti-human TIGIT Clone MBSA43	ThermoFisher	Cat#51-9500-42; RRID:AB_2744746
APC anti-human NKG2A Clone Z199	Beckman Coulter	Cat#A60797; RRID:AB_10643105
BV421 anti-human LAIR-1 Clone DX26	Becton Dickinson	Cat#744557; RRID:AB_2742321

BV421 anti-human KLRG1 Clone 14C2A07	BioLegend	Cat#368604; RRID:AB_2566593
Virus strains		
Plasmid encoding HIV-1_{BaL}	NIH AIDS Reagent Program	Cat#ARP-510
Chemicals, Peptides, Enzymes, and Recombinant Proteins		
Dulbecco's PBS (10X) w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red	Capricorn Scientific	Cat#PBS-10XA
RPMI-1640	Fisher Scientific	Cat#12004997
Fetal Bovine Serum	Life Technologies	Cat#A5256701
Bovine Serum Albumin	Merck	Cat#A7906-10G
Brilliant Stain Buffer	Becton Dickinson	Cat#566349
BD GolgiPlug Protein Transport Inhibitor	Becton Dickinson	Cat#555029
BD GolgiStop Protein Transport Inhibitor	Becton Dickinson	Cat#554724
Paraformaldehyde 4%	ThermoFisher	Cat#J19943.K2
NaOH 50% H_2O	Sigma Aldrich	Cat#415413
HEPES buffer solution 1M	Capricorn Scientific	Cat#HEP-B
Penicillin-Streptomycin	Capricorn Scientific	Cat#PS-B
Gentamicin	Gibco	Cat#15750037
Amikacin	Vall d'Hebron Pharmacy	
Amphotericin B	Gibco	Cat#15290026
Timentin	Caisson Labs	Cat#11192002
Human IL-2	Vall d'Hebron Pharmacy	
Collagenase IV	Fisher Scientific	Cat#10780004
Rat tail Collagen I	Merck	Cat#08-115
Collagen IV from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane	Merck	Cat#C0543
Critical Commercial Kits		
LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	ThermoFisher	Cat#L34966
Cell Proliferation Dye eFluor670	eBioscience	Cat#65-0840-90
PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit	Sigma Aldrich	Cat# MINI67-1KT
AO/PI Cell Viability Kit	Isogen	Cat#F23001
Britelite plus Reporter Gene Assay System	Revvity	Cat#6066761
BD Cytofix/Cytoperm™	Becton Dickinson	Cat#554722
EasySep™ Human CD19 Positive Selection Kit II	StemCell	Cat#17854
EasySep™ Human CD56 Positive Selection Kit II	StemCell	Cat#17855
$CD56^+$ Microbeads	Miltenyi Biotec	Cat#130-050-401
Dynabeads™ CD4 Positive Isolation Kit	ThermoFisher	Cat#11145D

Experimental Models: Cell Lines		
K562 human myelogenous leukemia cell line	Merck	Cat#89121407
293T cell line	ATCC	Cat#CRL-3216
TZM-bl cell line	NIH AIDS Reagent Program	Cat#8129
Software		
FlowJo	Becton Dickinson	https://www.flowjo.com/
OMIQ	Dotmatics	https://www.omiq.ai/
GraphPad	Dotmatics	https://www.graphpad.com/
XLSTAT	Lumivero	https://www.xlstat.com/en/
BioRender	BioRender	https://www.biorender.com/

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

We have tried to provide as much information as possible regarding the reagents used in this study. Nonetheless, further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Dr. Maria J Buzón (mariajose.buzon@vhir.org).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents. All reagents used are indicated in this section and are available. All plasmids needed for the generation of viral stocks were obtained through the NIH AIDS Reagent Program.

Data and code availability

All data reported in this paper will be shared by the lead contact upon request. Due to the sensitivity of the data, individual participant data will not be shared.

This paper does not report original code.

Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS

In this study, we used primary human tissue cells recovered from tonsillar resections obtained from routine surgery for treating sleep apnea in children under 18 years old. Tissue samples were obtained from the Otorhinolaryngology Unit of the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona, Spain. Study protocols were approved by the corresponding Ethical Committees (Institutional Review Board numbers PR(AG)270/2015 and PR(AG)582/2020).

All subjects recruited for this study were children under 18 years old who provided parental written informed consent. Information on gender, age, and cause of surgery is summarized in **Supplementary Table S1**. As we used in our experiments samples from donors of different gender, we conclude that findings on the functionality of trNK cells to eliminate the HIV reservoir apply for both, men and women.

Tonsillar specimens were processed in fresh upon collection for phenotypical studies or let overnight in dissection medium when intended for culturing or functional assays to ensure the inactivation of contaminating microorganisms. Dissection medium included RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with 500 U/ml penicillin (Fisher Scientific), 500 µg/ml streptomycin (Fisher Scientific), 1 µg/ml gentamicin (Gibco), and 5 µg/ml amphotericin B (Gibco). Tonsillar tissue explants (5x5 mm blocks) were cultured on the air-liquid interface on absorbable gelatin sponges (Goodwill) as previously described[104]. The hemostatic sponges were soaked in RPMI-1640 medium supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco), 10 mM HEPES (Biowest), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 66 µg/ml amikacin (Vall d'Hebron Hospital pharmacy) (R20 medium). The first day of culture, R20 medium also included 310 µg/ml of timentin (Caisson Labs). For the culture of digested and sorted tonsillar tissue cells, we used R20 medium supplemented with 100 U/ml interleukin-2 (IL-2) obtained from the Vall d'Hebron Hospital pharmacy. In all the experiments, medium was changed every 2-3 days and cultures were maintained at 37ºC in a 5% CO_2 incubator. In order to infect tonsillar tissue explants, we deposited 5 µl drops of HIV_{BaL} on each tissue block cultured on sponges. For infection of sorted tonsillar $CD4^+CD69^+$ T cells and Dynabeads-isolated $CD4^+$ T cells, we employed a spinoculation method[361] in which 300,000 target cells were centrifuged in a 96-well conical bottom plate with a 50% tissue culture infectious dose ($TCID_{50}$) of 625 units of HIV_{BaL} at 1,200 x *g* for 2 h at 37 ºC. Then, cells were washed twice with Dulbecco's 1X PBS (Capricorn Scientific) to remove unbound virus. Uninfected cells were spinoculated with R10 alone and served as infection controls.

To obtain the suspension of tonsillar cells, tonsillar resections were minced into small pieces (5x5 mm) avoiding cauterized and excessively bloody, fatty and pus-containing parts. 10 blocks were added per 1.5 ml Eppendorf containing 400 µl of RPMI-1640 medium supplemented with 5% FBS (R5 medium) and were mechanically digested using pestles (Labolan) coupled to a handheld homogenizer (Labolan). Tonsillar cell suspension was subsequently filtered through 70 and 40 µm pore size cell strainers (LabClinics), and 30 µm pore size CellTrics® filters (Sysmex). Filtered cells were washed twice with 1X PBS and the

remaining red blood cells were lysed using ACK Lysis Buffer (Fisher Scientific). Cell number and viability were assessed with LUNA Automated Cell Counter (Logos Biosystems).

For functional assays employing bulk $CD19^-$ tonsillar tissue cells as well as sorted trNK cells, we enriched the lymphocyte fraction including trNK cells by depleting $CD19^+$ cells using the EasySep™ Human CD19 Positive Selection Kit II (StemCell).

In some experiments, $CD4^+CD69^+$ T cells and trNK cells were obtained by fluorescence-activated cell sorting from tonsillar cell suspensions (Cytek Aurora CS). Alternatively, $CD4^+$ T cells were purified using the Dynabeads™ CD4 Positive Isolation Kit (Thermofisher) (overall purity >95%).

For the study of trNK functionality mediated by extracellular matrix components, $CD56^+$ trNK cells were isolated from the $CD19^-$ fraction using $CD56^+$ Microbeads (Miltenyi Biotec) together with the QuadroMACS™ Separator magnets (Miltenyi Biotec). Alternatively, total $CD56^+$ NK cells were purified using the EasySep™ Human CD56 Positive Selection Kit II (StemCell). Two rounds of cell separation were performed to maximize the purity of the cells (overall purity >85%).

We also used the K562 cell line (Merck), a highly sensitive standard *in vitro* target model to study the natural cytotoxicity function of natural killer cells. These cells were cultured in R10 medium and maintained at 37ºC in a 5% CO_2 incubator. We checked the absence of contaminants in our cell cultures.

All plasmids needed for the generation of viral stocks were obtained through the NIH AIDS Reagent Program. Viral stocks were generated by transfection of 293T cells (ATCC) with the plasmids encoding the HIV_{BaL}, and the resulting viral particles were titrated in TZM-bl cells using an enzyme luminescence assay (Britelite plus Reporter Gene Assay System; Revvity) as described previously[362].

METHOD DETAILS

In this section, detailed information about the different assays performed can be found. Information on the sample size and the number of replicates for each assay is indicated in each figure legend. The assays on the elimination of HIV-infected cells by fluorescence-activated cell sorted trNK cells presented here are complex, among other factors due to the scarcity of the selected NK populations of study in samples. We performed these assays with a large number of tonsillar tissue cells to avoid errors in the interpretations of the results. Other measures to control and assure the proper analysis of the data are detailed for each

assay, such as the use of Fluorescence Minus One (FMO) controls in flow cytometry experiments and uninfected controls to validate the measurement of infected cells.

Tonsillar resident memory NK cell phenotyping

Fresh tonsillar tissue was digested, and the resulting cell suspension was stained with LIVE/DEAD AQUA viability (ThermoFisher) for 20 minutes at room temperature (RT). After washing once with 1X PBS, cells were stained with anti-CD56-FITC (B159; Becton Dickinson), anti-CD49a-PE-Cy7 (TS2/7; BioLegend), anti-pan-KIRs (KIRs2DL1/S1 and KIRs2DL2/3/S2)-PE-Cy5.5 (EB6B & GL183; Beckman Coulter), anti-CD69-PE-CF594 (FN50; Becton Dickinson), anti-NKG2C-PE (134591; R&D Systems), anti-CD3-APC (SK7; BioLegend), anti-CD16-BV786 (3G8; Becton Dickinson), anti-CD103-BV650 (Ber-ACT8; Becton Dickinson), anti-CD45-BV605 (HI30; Becton Dickinson), anti-CD14-V500 (MφP9; Becton Dickinson), and anti-CD19-V500 (HIB19; Becton Dickinson) antibodies mixed with Staining Buffer (1X PBS 3% FBS) containing 50% Brilliant Stain Buffer (Becton Dickinson) for 20 minutes at RT. Cells were then washed with Staining Buffer (SB) and were fixed with 2% PFA. Samples were acquired on a BD LSR Fortessa flow cytometer and data were analyzed using OMIQ software.

Tonsillar innate lymphoid cell phenotyping

Tonsillar cell suspension was assessed by flow cytometry to phenotype innate lymphoid cells (ILCs) and NK cell populations. Cells were stained with LIVE/DEAD AQUA viability (ThermoFisher) for 20 minutes at RT. After washing once with 1X PBS, cells were stained with anti-c-kit-BB700 (YB5.B8; Becton Dickinson), anti-CD56-FITC (B159; Becton Dickinson), anti-CD49a-PE-Cy7 (TS2/7; BioLegend), anti-pan-KIRs (KIRs2DL1/S1 and KIRs2DL2/3/S2)-PE-Cy5.5 (EB6B & GL183; Beckman Coulter), anti-CD69-PE-CF594 (FN50; Becton Dickinson), anti-NKG2C-PE (134591; R&D Systems), anti-CRTH2-APC-Vio770 (REA598; Miltenyi), anti-CD45-AF700 (HI30; BioLegend), anti-CD3-APC (SK7; BioLegend), anti-CD16-BV786 (3G8; Becton Dickinson), anti-CD103-BV650 (Ber-ACT8; Becton Dickinson), anti-CD127-BV605 (A019D5; BioLegend), anti-CD14-V500 (MφP9; Becton Dickinson), anti-CD19-V500 (HIB19; Becton Dickinson), and anti-NKp44-BV421 (p44-8; Becton Dickinson) antibodies mixed with SB containing 50% Brilliant Stain Buffer (Becton Dickinson) for 20 minutes at RT. Cells were then washed with SB and were fixed with 2% PFA. Samples were acquired on a BD LSR Fortessa flow cytometer and data were analyzed using OMIQ software.

Immune checkpoint phenotyping of tonsil-resident memory NK cells

Fresh tonsillar tissue was digested, and the resulting cell suspension was assessed by flow cytometry to measure the expression of immune checkpoints on tonsil-resident memory NK cells. Tonsillar cell suspension was stained with LIVE/DEAD AQUA viability (ThermoFisher) for 20 minutes at RT. After washing once with 1X PBS, cells were stained with anti-CXCR5-BB700 (RF8B2; Becton Dickinson) or anti-CD137-PerCP-Cy5.5 (4B4-1; BioLegend), anti-CD56-FITC (B159; Becton Dickinson), anti-CD49a-PE-Cy7 (TS2/7; BioLegend), anti-pan-KIRs (KIRs2DL1/S1 and KIRs2DL2/3/S2)-PE-Cy5.5 (EB6B & GL183; Beckman Coulter), anti-CD69-PE-CF594 (FN50; Becton Dickinson), anti-NKG2C-PE (134591; R&D Systems), anti-PD-1-APC-Fire750 (EH12.2H7; BioLegend) or CD25-APC-Cy7 (M-A251; Becton Dickinson), anti-CD3-AF700 (SK7; BioLegend), anti-TIGIT-AF647 (MBSA43; ThermoFisher) or anti-NKG2A-APC (Z199; Beckman Coulter), anti-CD16-BV786 (3G8; Becton Dickinson), anti-CD103-BV650 (Ber-ACT8; Becton Dickinson), anti-CD45-BV605 (HI30; Becton Dickinson), anti-CD14-V500 (MφP9; Becton Dickinson), anti-CD19-V500 (HIB19; Becton Dickinson), and anti-LAIR-1-BV421 (DX26; Becton Dickinson) or anti-KLRG1-BV421 (14C2A07; BioLegend) antibodies mixed with SB containing 50% Brilliant Stain Buffer (Becton Dickinson) for 20 minutes at RT. Cells were then washed with SB and were fixed with 2% PFA. Samples were acquired on a BD LSR Fortessa flow cytometer and data were analyzed using OMIQ software.

NK natural cytotoxicity assay

NK natural cytotoxicity potential was measured by the detection of CD107a and IFN-γ by flow cytometry after coculture with the K562 cells. The tonsillar cell suspension containing resident NK cells was depleted from $CD19^+$ cells using a commercial kit (EasySep™ Human CD19 Positive Selection Kit II; StemCell) and cocultured with K562 cells at a 10:1 effector to target ratio ($CD19^-$ fraction (containing NK cells): K562) in a 96-well round (U) bottom plate for 4 h at 37 ºC and 5% CO_2. Previous the 4 h coculture, cells were seeded by contact centrifugation at 400 x *g* for 3 min. Anti-CD107a-BV421 antibody (H4A3; Becton Dickinson), BD Golgiplug Protein Transport Inhibitor (Becton Dickinson), and BD GolgiStop Protein Transport Inhibitor containing monensin (Becton Dickinson) were also added to each well at the recommended concentrations. Cells were then washed and stained for cell viability and surface markers as described in the '*Tonsillar resident memory NK cell phenotyping*' Methods' section. Cells were then fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Becton Dickinson) for 20 minutes at 4ºC, washed with BD Perm/Wash buffer and stained with anti-IFN-γ-AF700 (B27; Life Technologies) for 30 minutes at RT. After washing,

cells were fixed with PFA (2%) and acquired on a BD LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson). Data were analyzed using OMIQ software.

Extracellular matrix effects on the natural cytotoxicity of tonsil-resident NK cells

Effects of extracellular matrix components on resident NK activation were measured by the detection of CD107a and IFN-γ by flow cytometry after coculture with the K562 cells. The tonsillar cell suspension containing resident NK cells was depleted from $CD19^+$ cells using a commercial kit (EasySep™ Human CD19 Positive Selection Kit II; StemCell) and NK cells were purified using the $CD56^+$ Microbeads (Miltenyi Biotec). Cocultures with K562 cells were established at 2:1 effector to target (NK: K562) ratio in different supports: R10 suspension, 10 µg/cm^2 collagen (Col) I and IV coating (2D), and 1.5 mg/ml Col I and 1 mg/mL Col IV 3D gels. For the collagen preparations, 96-well flat-bottom plates and 6-well plates were treated with enough collagen solution volume to cover the wells and were left 30 min at 37 ºC and 5% CO_2 for solidification and successful coating. Exceeding volumes were removed and coated wells were washed with warm 1X PBS. For the generation of collagen 3D gels, acidic collagen stock solutions were neutralized with 2M NaOH (Sigma Aldrich) and buffered with HEPES 1M. 3 million NKs/ml and K562 cells were immediately embedded in the collagen gels maintained on ice to prevent rapid solidification before plating or seeded on collagen-coated plates. To investigate the impact of collagen coating on $CD49a^+$ NK cell production of IFN-γ, we conducted experiments using both high (700,000 NKs/cm^2) and low (70,000 NKs/cm^2) cell densities. This allowed us to distinguish between scenarios where effector and target cells are in direct contact versus when they are spaced apart and compelled to migrate. Cells were incubated for 16 h at 37 ºC and 5% CO_2. Anti-CD107a-BV421 antibody (H4A3; Becton Dickinson), BD Golgiplug Protein Transport Inhibitor (Becton Dickinson), and BD GolgiStop Protein Transport Inhibitor containing monensin (Becton Dickinson) were also added to each well at the recommended concentrations. After the overnight incubation, cells were treated with collagenase IV (Roche) at 1.4 mg/ml for 30 min at 37 Cº and 5% CO_2 while mixing well content every 10 min to disaggregate the collagen matrices and recover the embedded cells. Cells were then washed and stained for cell viability, surface, and intracellular markers as described in the '*NK natural cytotoxicity assay*' Methods' section. Stained cells were acquired on a BD LSR Fortessa flow cytometer. Data were analyzed using OMIQ software.

Extracellular matrix effects on the direct killing activity of tonsil-resident NK cells

Effects of extracellular matrix components on resident NK killing were measured by the decrease in the K562 expression of cell integrity markers eFluor670 (eBioscience) and PKH67 (Sigma Aldrich) by flow cytometry after the coculture. A minimum of 3 million K562 cells were stained following the manufacturer's instructions. The tonsillar cell suspension was processed to isolate $CD56^+$ NK cells as described in the previous Methods' section, as well as the collagen coating and gelation protocols, and the cell seeding in plates containing the different collagen preparations. After overnight coculture, cells were recovered by gentle collagenase digestion, washed with SB, and fixed with PFA (2%). The cells were acquired on an BD LSR Fortessa flow cytometer. Data were analyzed using OMIQ software.

Tonsillar NK cell killing of autologous HIV-infected cells after HIV exposure

Tonsillar tissue was digested, and $CD4^+$ T cells were isolated from the resulting cell suspension using the Dynabeads™ CD4 Positive Isolation Kit (Dynabeads). $CD4^+$ T cells were infected by spinoculation and cultured in R20 medium containing 100 U/ml of IL-2, with media replenished every 2-3 days. In parallel, HIV-infected and uninfected tonsil explants were cultured. After 5 days, total NK cells were purified using the EasySep™ Human CD56 Positive Selection Kit II (StemCell) and cocultured with autologous HIV-infected $CD4^+$ T cells at a 1:1 effector-to-target ratio for 4 hours at 37°C in 5% CO_2. Following the incubation, cells were washed with 1X PBS and stained with LIVE/DEAD AQUA viability dye (ThermoFisher) for 20 min at RT. After another wash with 1X PBS, cells were stained with anti-CD45-AF700 (HI30; BioLegend), anti-CD3-APC (SK7; BioLegend), anti-CD8-BV650 (RPA-T8; Becton Dickinson), and anti-CD4-BV605 (RPA-T4; Becton Dickinson) antibodies for 20 minutes at RT. Cells were then washed with SB, fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Becton Dickinson) for 20 minutes at 4ºC, washed with BD Perm/Wash buffer and stained with anti-p24-PE (KC57; Beckman Coulter) for 30 min on ice followed by 30 min at RT. After washing, cells were fixed with PFA (2%) and acquired on a BD LSR Fortessa flow cytometer. Data were analyzed using OMIQ software.

FACS isolation of tonsil-resident memory NK cells and killing of autologous HIV-infected cells

Tonsillar tissue was digested, and $CD19^-$ cells were purified from the resulting cell suspension using the EasySep™ Human CD19 Positive Selection Kit II. Approximately 100 million $CD19^-$ tonsillar cells were stained for Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) with LIVE/DEAD AQUA viability (ThermoFisher) for 20 minutes at RT. After washing once with 1X PBS, cells were stained with anti-CD56-FITC (B159; Becton Dickinson), anti-CD49a-

PE-Cy7 (TS2/7; BioLegend), anti-pan-KIRs (KIRs2DL1/S1 and KIRs2DL2/3/S2)-PE-Cy5.5 (EB6B & GL183; Beckman Coulter), anti-CD69-PE-CF594 (FN50; Becton Dickinson), anti-NKG2C-PE (134591; R&D Systems), anti-CD19-APC-Fire750 (HIB19; BioLegend), anti-CD45-AF700 (HI30; BioLegend), anti-CD3-APC (SK7; BioLegend), anti-CD16-BV786 (3G8; Becton Dickinson), anti-CD103-BV650 (Ber-ACT8; Becton Dickinson), anti-CD4-BV605 (RPA-T4; Becton Dickinson), and anti-CD14-V500 (MφP9; Becton Dickinson) antibodies mixed with Staining Buffer (1X PBS 3% FBS) containing 50% Brilliant Stain Buffer (Becton Dickinson) for 20 minutes at RT. Cells were then washed with Staining Buffer (SB) and resuspended with 1X PBS 2% BSA at a maximum concentration of 20 million/ml.

Different trNK subsets were immediately sorted using the Cytek Aurora Cell Sorter. The purity of the cells was >95% in all cases. $CD4^+CD69^+$ T cells were also sorted and infected by spinoculation. Uninfected cells were also spinoculated with only R10 and served as an infection control. The different sorted trNK cells were cocultured with the autologous HIV-infected $CD4^+CD69^+$ T cells at a 1:1 ratio in R20 containing 100 U/ml of IL-2. The media was renewed every 2-3 days. After 5 days, cells were harvested and stained for the measurement of remaining alive HIV-infected cells by flow cytometry. Cells were stained with LIVE/DEAD AQUA viability (ThermoFisher) for 20 minutes at RT. After washing once with 1X PBS, cells were stained with anti-CD3-AF700 (SK7; BioLegend), anti-CD8-APC (RPA-T8; Becton Dickinson), and anti-CD45-BV605 (HI30; Becton Dickinson) antibodies for 20 minutes at RT. Cells were then washed with SB, fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Becton Dickinson) for 20 minutes at 4ºC, washed with BD Perm/Wash buffer and stained with anti-p24-PE (KC57; Beckman Coulter) for 30 min on ice followed by 30 min at RT. After washing, cells were fixed with PFA (2%) and acquired on a BD LSR Fortessa flow cytometer. Data were analyzed using FlowJo V10.

Dimensionality Reduction Analysis

Dimensionality reduction analysis of flow cytometry data was performed using the OMIQ software from Dotmatics (https://www.omiq.ai/, www.dotmatics.com). All events within pre-gated Live $CD45^+CD14^-CD19^-CD3^-CD56^+$ NK cells were concatenated for each group per culture condition and analyzed. For NK cell phenotyping, cell clusters were identified by Flow-Self Organizing Maps (FlowSOM) artificial intelligence algorithm based on the expression of CD16, CD49a, CD69, CD103, KIRs, and NKG2C. Next, optimized T-distributed stochastic neighbor embedding (opt-SNE) analysis was employed to depict the identified clusters. The frequency of marker expression in each cluster was represented in a heatmap generated using GraphPad Prism software.

Statistical Analysis

Statistical tests were performed with GraphPad Prism software (version 8.3) and are reported within each figure caption. Skillings-Mack test was performed on XLSTAT software. *P* values <0.05 were considered statistically significant. A minimum threshold of 10-15 cells was set to ensure robust measurement of marker expression by flow cytometry.

Results

Landmarks of tissue residency and memory-like imprints in tonsillar NK cells

We first performed a phenotypic characterization of NK cells present in tonsils. Tissue was obtained from 68 donors, whose characteristics are listed in **Supplementary Table S1**. We found a median of 40.8% of non-B non-myeloid cells in the hematopoietic fraction, measured as $CD45^+CD14^-CD19^-$ cells **(Figure 1A, left)**. NK cells were identified by gating for $CD45^+CD3^-CD14^-CD19^-CD56^+$ cells, which were further classified into $CD16^+$ and $CD16^-$ subsets **(Supplementary Figure S1A-B)**. In general, $CD56^+$ NK cells within tonsils were infrequent, accounting for a median of approximately 0.7% of $CD45^+CD14^-CD19^-$ lymphocytes **(Figure 1A, middle)**, as previously reported by Dogra *et al*.[196]. Notably, the majority of these tonsillar $CD56^+$ NK cells were $CD16^-$ (median 73.1%) **(Figure 1A, right)**. We then analyzed the coexpression of memory-like markers KIRs[357] and NKG2C[220] and the residency markers CD69, CD49a, and CD103 in the two major NK subsets. We found that $CD16^+$ NK cells displayed a higher prevalence of markers associated with tissue residency, specifically CD49a and CD103 **(Figure 1B)**, as well as memory-like markers **(Figure 1C)**. It is noteworthy that NK cells expressing CD69 were abundant in both the $CD16^+$ and $CD16^-$ subsets, with a notably higher frequency in the $CD16^-$ subset (79.4%; p=<0.001) **(Figure 1B)**. Moreover, $CD49a^+$ NK cells exhibited a notable enrichment in the expression of memory-like markers, especially the $CD16^+$ NK subset **(Figure 1D, S1C)**. Apart from NK cells, other innate lymphoid cells (ILCs) were present within the tonsillar samples. Total $CD127^+CD16^-$ ILCs accounted for a median of 0.5% of $CD45^+CD14^-CD19^-$ lymphocytes **(Figure S1D)**, and ILCs represented a median of 18.4% of the $CD3^-CD56^+$ cell subset **(Figure S1E)**. Resident **(Figure S1F)** and memory **(Figure S1G)** receptors were found to be rare on ILCs, except for the abundant expression of CD69 observed **(Figure S1H)**.

In the process of infiltrating into tissues, NK cells first upregulate CD69 expression, which interferes with sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1PR1) and effectively block lymphocyte egress[202,203]. Subsequently, the tissue microenvironment influences the expression of additional residency markers, including CD49a (collagen IV binding)[204] and CD103 (E-cadherin binding)[205,206], in response to local inflammation and cytokine cues from neighboring tissue cells[207–209]. Thus, we analyzed the co-expression of these residency markers in tonsillar tissue, since this might provide important localization and functional information. We observed that the majority of the NK cells in both $CD16^+$ and $CD16^-$ NK subsets were identified as $CD69^+CD49a^-CD103^-$ (SP, single-positive), with a median of 52.0% for $CD16^+$

and 74.0% for CD16$^-$ **(Figure 1E)**. A secondary, but still substantial, population of CD16$^+$CD69$^+$CD49a$^+$CD103$^-$ NK cells (DP, double-positive), was also observed, comprising approximately 20% of all CD16$^+$CD69$^+$ NK cells **(Figure 1E)**. Of note, the majority of CD49a and CD103 expression was detected in CD69$^+$ NK cells. Finally, to gain further insights into the heterogeneity of tonsillar NK cells, we conducted a dimensionality reduction analysis (opt-SNE), which revealed the presence of 11 distinct cell clusters based on resident and memory-like markers **(Figure 1F)**. In concordance with our previous results, clusters #3 and #9 collectively represented the majority of trNK cells within the tonsil, exhibiting a phenotype characterized by the single expression of CD69. In contrast, clusters #4 and #8 corresponded to NK cells with triple resident marker expression (TP, triple-positive), while cluster #5 represented a unique subset of CD16$^+$CD49a$^+$ resident NK cells exhibiting high KIRs and NKG2C expression, and cluster #6 corresponded to its CD16$^-$ counterpart.

In addition, we also assessed the expression of CXCR5 because it is a marker for migration to B cell follicles in lymph nodes[258], a major site of HIV replication[91,92]. Overall, the highest expression was observed in both CD16$^+$ and CD16$^-$ subsets expressing KIRs (NKG2C$^{+/-}$), especially in the CD49a$^+$ fraction **(Figure 1G)**. Accordingly, higher CXCR5 expression has been found in KIRs$^+$ NK cells in lymph nodes[316] and Massoni-Badosa *et al.* observed CD49a immunofluorescence in lymphocytes lining tonsillar B cell follicles[259].

Lastly, we evaluated the coexpression of CD103 and NKp44 **(Figure 1H)**, confirming the existence of the previously described intraepithelial ILC1-like cells (ieILC1s) **(Figure 1I)**. IeILC1s exhibit enhanced functionality when stimulated with IL-12 and IL-15[170], and have been shown to expand in tumor environments[210,219]. Importantly, mucosal NKp44$^+$ ILCs have demonstrated beneficial roles in controlling SIV infection[261,363] and are found expanded in tonsils during chronic SIV infection[364]. However, while NKp44 expression on NK cells can be advantageous, it also results in bystander killing of uninfected but HIV-exposed CD4$^+$ T cells that express NKp44 ligands, ultimately contributing to CD4$^+$ T cell depletion[186].

In summary, we identified the CD56$^+$CD16$^-$CD69$^+$CD49a$^-$CD103$^-$ (CD16$^-$ SP) subpopulation as the predominant NK tissue population in tonsils. Additionally, the CD16$^+$CD49a$^+$ subset, comprising approximately 30% of tonsillar CD16$^+$ NK cells, exhibited a significant expression of KIRs and NKG2C, likely indicating a more mature NK cell phenotype. This finding is consistent with the well-established role of the tonsil as a secondary lymphoid organ, where NK cells undergo differentiation[179]. Furthermore, we found elevated expression of CXCR5 on

CD49a⁺KIRs⁺ NK cells, which is significant in the setting of HIV infection since B cell follicles constitute a reservoir for HIV[44].

Figure 1

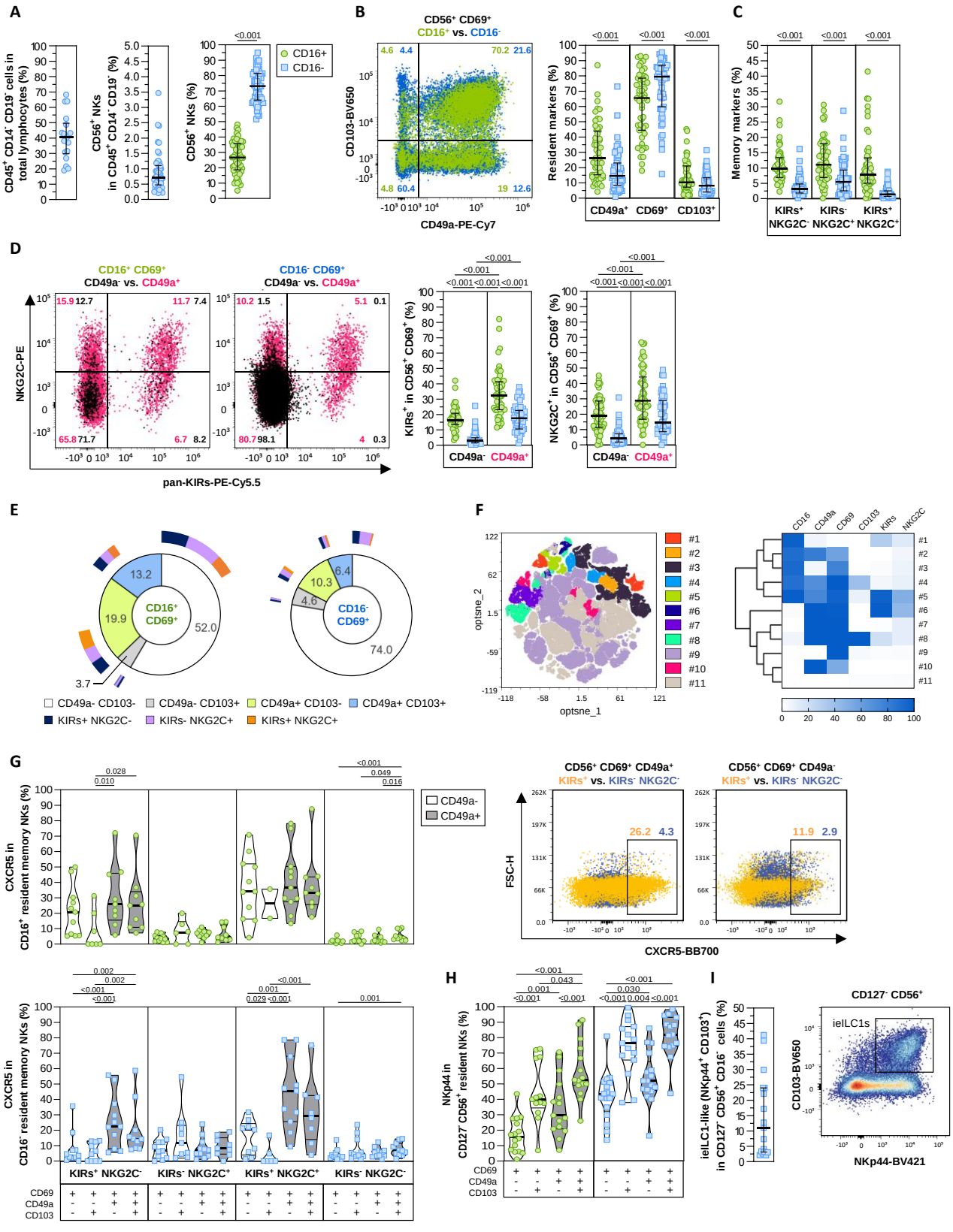


Figure 1. Tissue-resident memory phenotype of tonsillar NK cells.
Expression of resident (CD69, CD49a, and CD103) and memory (KIRs and NKG2C) markers, NKp44, and CXCR5 was measured by flow cytometry in different tonsillar tissue specimens.
(A) Frequencies of $CD45^+CD14^-CD19^-$ Lymphocytes (left), total $CD56^+$ NK cells (middle) and classic $CD16^{+/-}$ NK cell subsets (right).
(B) Frequency of expression of resident markers within $CD56+CD16^{+/-}$ subsets.
(C) Frequency of expression of memory markers within $CD56+CD16^{+/-}$ subsets.
(D) Frequency of expression of memory markers within $CD49a^+$ NK cells.
(E) Coexpression frequencies of resident and memory markers within $CD56^+CD16^{+/-}$ NK cell subsets.
(F) Optimized-t-Distributed Stochastic Neighbor Embeddings (opt-SNEs) plot showing the abundance of tissue-resident memory NK cell clusters (#) within the total pool of $CD56^+$ NK cells in tonsils at baseline. The heatmap shows the frequency of expression of different tissue-resident memory markers per cluster.
(G) Frequency of CXCR5 expression within $CD16^{+/-}$ resident memory NK cells.
(H) Frequency of NKp44 expression within $CD127^-CD56^+CD16^{+/-}$ resident NK cells.
(I) Frequency of ieILC1s ($NKp44^+CD103^+$ within $CD127^-CD56^+CD16^-$ cells).
For (A), (B), (C), and (I), median with interquartile range is represented. Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test and the Skillings-Mack test when appropriate. Significant comparisons $p<0.05$. Tonsillar samples were obtained from the patients listed in the **Supplementary Table S1** and used as follows: #18-35 were used for (A, left), #1-36, #42-48, and #50-56 for (A, middle), #1-48 and #50-56 for (A, right) and (B-F), #38-48 for (G), and #27-43 for (H, I). Circles: $CD16^+$; squares: $CD16^-$.

Functional polarization of $CD49a^+KIRs^+$ tonsillar NK cells

Next, we mapped the distinct functional polarization states of tonsillar NK cells. We first determined the functional status of tonsil-resident memory-like NK cells based on the expression of the degranulation marker CD107a and the proinflammatory cytokine IFN-γ[365–367]. Additionally, their maximum functional degranulation and proinflammatory potentials were assessed as the frequency of $CD107a^+$IFN-$\gamma^{+/-}$ NK cells upon MHC class I-devoid K562 cell stimulation. Initially, we observed that $CD16^+$ NK cells exhibited low expression of CD107a **(Figure 2A)**. Conversely, $CD16^-$ NK cells, in general, showed elevated basal CD107a expression (median of 4.7% vs 45.6% of $CD107a^+$IFN-γ^- cells in the $CD16^+$ and $CD16^-$ NK subsets, respectively, $p<0.001$) **(Figure 2A)**. A more detailed analysis revealed that the $CD16^+$ SP subpopulation was barely functional (median of 6.2% $CD107a^+$IFN-γ^- cells) **(Figure 2B, left)**, while the $CD16^-$ SP counterpart was predominantly $CD107a^+$ (median of 56.2% $CD107a^+$IFN-γ^- cells) **(Figure 2B, right)**, indicating that it is the most functionally activated NK cell subset in the tonsils. In contrast, $CD49a^+$ NK cells exhibited notably low CD107a expression in both the $CD16^+$ **(Figure 2B, left)** and $CD16^-$ **(Figure 2B, right)** subsets. However, when the $CD49a^+$ NK cell fraction was cocultured with K562 cell targets, degranulation was significantly upregulated **(Figure 2B)** and they displayed the highest IFN-γ production rates **(Figure 2C, S2A)**, particularly within the $CD16^-$ subset (FC=4.0, $p<0.001$) **(Figure 2D)**.

In general, KIRs and NKG2C expression did not identify specific signatures prone to solely degranulation (measured as CD107a^{+}IFN-γ^{-}) **(Figure S2B-C)**, but KIRs expression was a clear indicator of CD16^{-} NK cells with enhanced IFN-γ production **(Figure 2E-F)**. Noteworthy, an in-depth analysis revealed that among CD16^{-}CD49a^{+} tonsillar NK cells, the coexpression of KIRs (NKG2C$^{+/-}$) delineated the most stimulated subpopulations able to degranulate **(Figure S2D-E)** and secrete IFN-γ **(Figure 2G-H)**, indicating that KIRs expression in CD49a^{+} NK cells is associated with high cell stimulatory potential.

Overall, we found that tonsillar CD16^{-} SP, the most abundant NK population, have the highest basal functional activity. However, after target encounters CD16^{-}CD49a^{+}KIRs^{+} NK cells showed an enhanced stimulatory potential. This aligns with the work of Brownlie *et al*.[220] in the lung, who observed that CD16^{-}CD49a^{+}KIRs^{+}NKG2C^{+} NK cells responded better than CD49a^{-} NK cells to K562 target cells. Therefore, our contribution adds to the expanding body of literature that elucidates the distinct role of CD49a^{+} memory NK cells in tissues, particularly within the complex microenvironment of the tonsils.

Figure 2

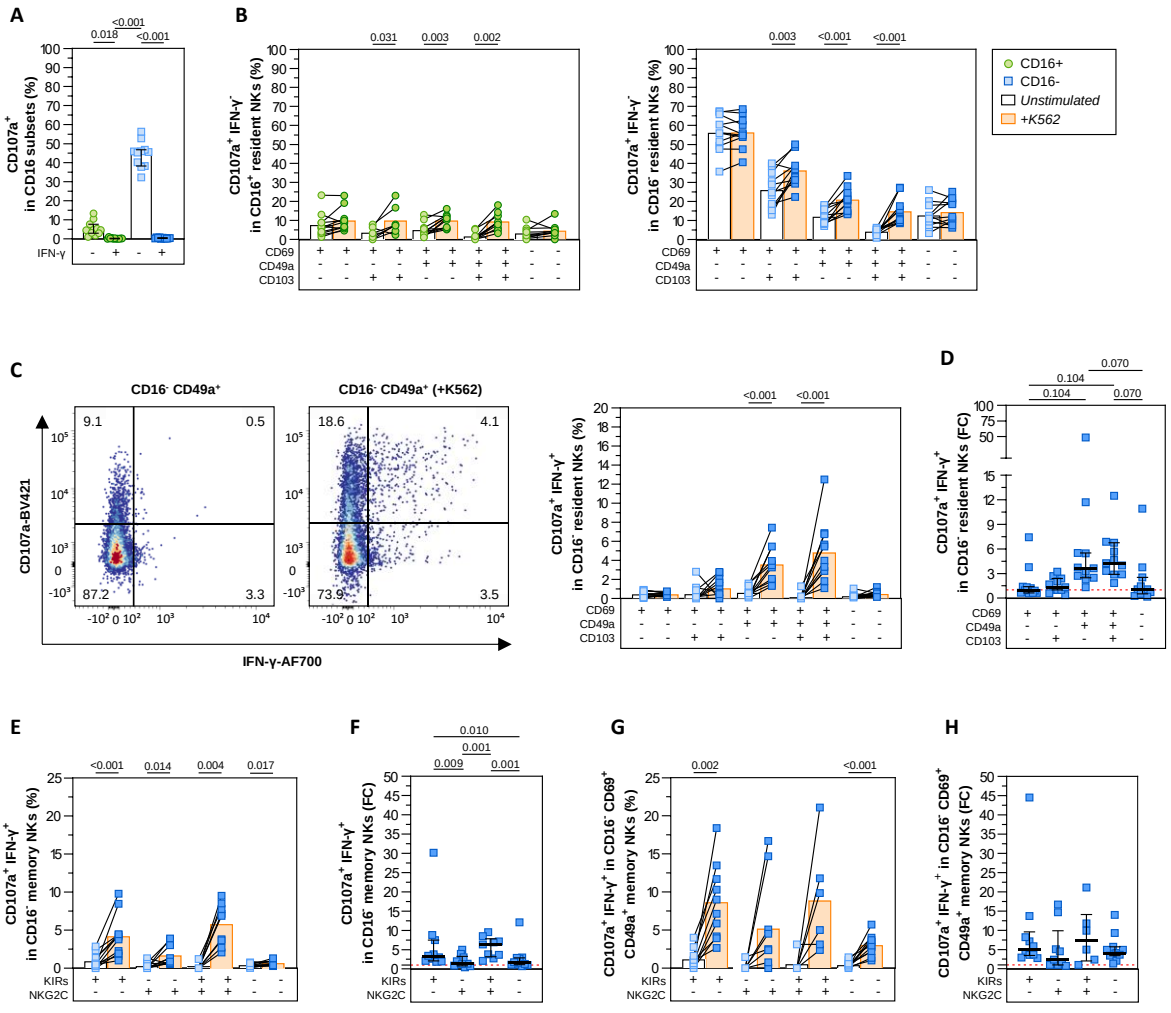


Figure 2. Functionality of tonsil-resident memory NK cells.
Expression of the degranulation marker CD107a and intracellular IFN-γ measured by flow cytometry in different tonsillar tissue specimens in the steady state and upon stimulation with K562 cells.
(A) Basal functional activation of classic $CD16^{+/-}$ NK cell subsets.
(B) Cytotoxic degranulation (% of $CD107a^{+}IFN\text{-}\gamma^{-}$ cells) by resident $CD16^{+}$ (left) and $CD16^{-}$ (right) NK cells.
(C) Gating strategy of functional marker expression in $CD16^{-}CD49a^{+}$ tonsil-resident NK cells and cytokine production (% of $CD107a^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}$ cells) by resident $CD16^{-}$ NK cells.
(D) Cytokine production (fold-change of % $CD107a^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}$ cells) by resident $CD16^{-}$ NK cells.
(E-H) Cytokine production (% and fold-change of % $CD107a^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}$ cells) by **(E, F)** memory $CD16^{-}$ NK cells and **(G, H)** $CD49a^{+}$ memory $CD16^{-}$ NK cells.
Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test, Friedman test, and Skillings-Mack test when appropriate. Significant comparisons $p<0.05$. Red dotted line in fold-change graphs represents FC=1 (no change). Tonsillar samples (#8-18) were obtained from the patients listed in the **Supplementary Table S1**. Circles: $CD16^{+}$; squares: $CD16^{-}$.

Extracellular matrix components diversify the function of tonsil-resident NK cells

The gold standard for the assessment of the functional potential of NK cells includes their coculture with K562 cell targets in suspension to measure functional surrogate markers upon stimulation[212,368]. While this method is most likely well-suitable for the study of circulating NK cells, it is also usually used for tissue NK cells[219,220,222] despite the growing evidence indicating that the extracellular matrix components in tissues might have an impact on NK cell functionality[95]. To account for this, we conducted functional and killing assays with K562 cells incorporating extracellular matrix components into the experimental setup **(Figure 3A)**. We found that, in general, the coating of cell culture plates with collagen (Col) type I or Col type IV (2D culture), as well as embedding cells in Col I 3D gels had no effect on the killing of K562 cells by tonsil-resident NK cells, measured as the loss of the viability markers PKH67 and eFluor670 **(Figure 3B)**. Conversely, culture in Col IV 3D gel led to a reduction of the killing activity **(Figure 3B)**. This aligns with the notion that Col IV may form packed structures that impede infiltration, as shown in tumors[369,370]. Notably, in the context of HIV infection, collagen deposition in lymph nodes[94,275,344] and the gut[102,103] may hinder NK cell infiltration into regions of active viral replication.

Moreover, we found that despite NK cells were maintaining their killing capacity in the presence of Col I 3D gel, classical NK cell functional markers such as CD107a expression were notably diminished **(Figure 3C)**. This suggests that collagen may divert NK cell function towards a non-degranulating mechanism (i.e. death receptor-mediated killing), possibly mediated by collagen sensing through receptors such as LAIR-1, as previously reported for tissue-infiltrating cytotoxic lymphocytes[276,277]. In contrast, Col I and IV 2D positively influenced the functional response. In particular, $CD16^{-}CD49a^{+}$ NK cells increased their CD107a and

IFN-γ production when cocultured with K562 cells on collagen-coated wells **(Figure 3D)**. This functional adaptation might be attributed to CD49a, since $CD16^{-}CD69^{+}CD49a^{-}$ NK cells, even when expressing KIRs, did not show increased degranulation or IFN-γ production under the same conditions **(Figure S3A)**. It is important to note that CD49a is a collagen receptor with a strong affinity for basal lamina Col IV lining epithelia and blood vessels[204], serving as a scaffold for tissue scanning[371]. Thus, the increase in target cell recognition and migration speed may be notable in these cell cocultures, mirroring a tissue infection scenario.

Altogether, our findings indicate that extracellular matrix components alter NK functionality; especially the proinflammatory attributes of the $CD49a^{+}$ NK cell fraction in 2D collagens.

Figure 3

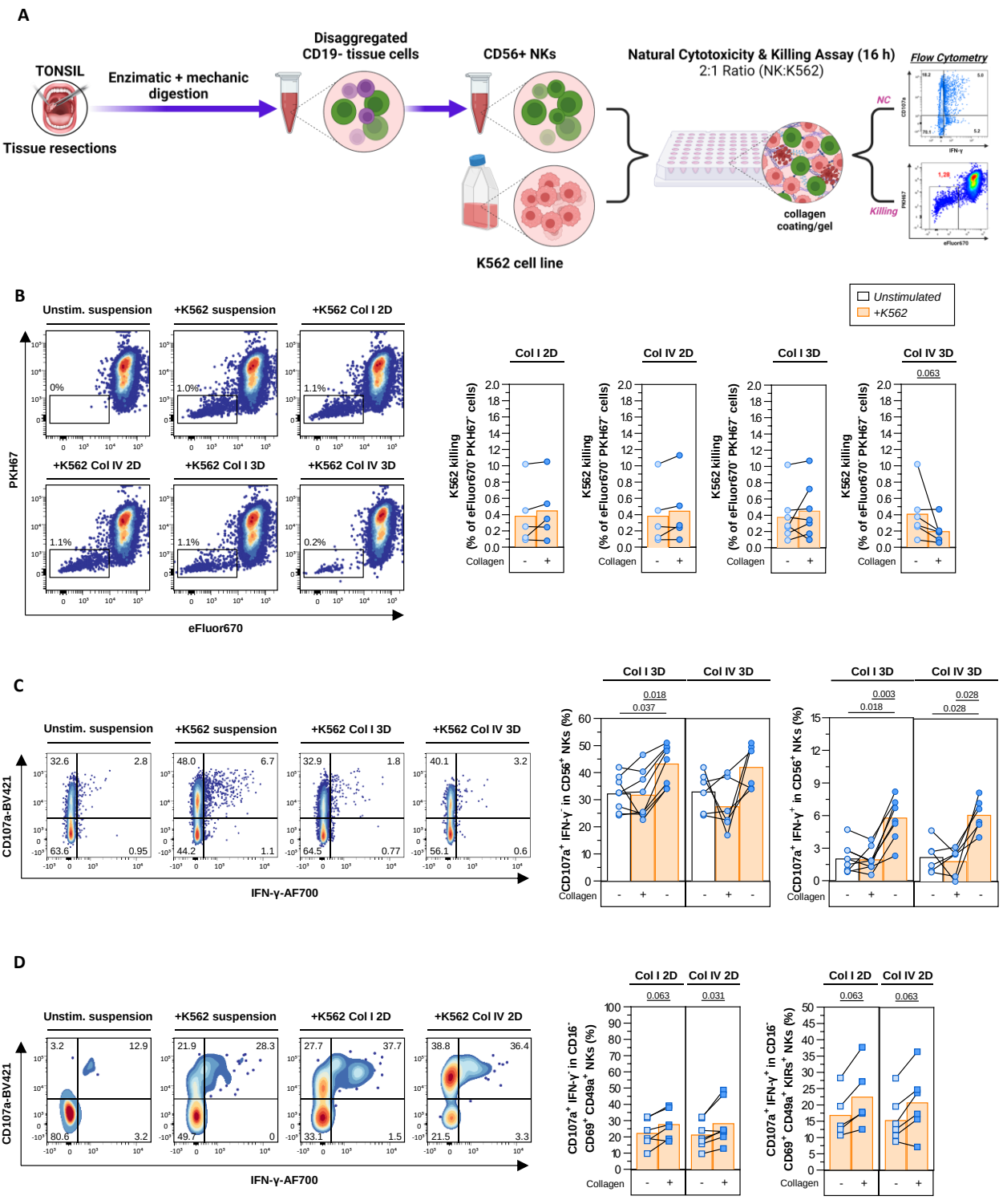


Figure 3. Role of the tonsillar microstructure in the function of resident NK cells.

The effects of extracellular matrix components (collagens) were assessed in a functional coculture assay of tonsillar NK cells against K562 cell targets (2:1 ratio) overnight (16 hours).

(A) Diagram illustrating the functional coculture assay of tonsil-resident NK cells in contact with extracellular matrix components.

(B) Gating strategy of the killing of K562 target cells (% of eFluor670^{-}PKH67^{-} cells) measured by flow cytometry. Tonsillar NK cells were cocultured in suspension, on collagen I-or IV-coated surfaces (10 µg/cm^2), or embedded in collagen I (1.5 mg/mL) or IV (1 mg/mL) 3D gels.
(C) Gating strategy of functional markers within CD56^{+} NK cells measured by flow cytometry**.** Cytotoxic degranulation (% of CD107a^{+}IFN-γ^{-}) and cytokine production (% of CD107a^{+}IFN-γ^{+}) by CD56+ NK cells when cocultured with K562 target cells in suspension or embedded in collagen I (1.5 mg/mL) or IV (1 mg/mL) 3D gels.
(D) Gating strategy of functional markers within CD16^{-}CD49a^{+}KIRs^{+} NK cells measured by flow cytometry**.** Cytotoxic degranulation (% of CD107a^{+}IFN-γ^{-}) by CD16^{-}CD49a^{+} NK cells and cytokine production (% of CD107a^{+}IFN-γ^{+}) by CD16^{-}CD49a^{+}KIRs^{+} NK cells when cocultured with K562 target cells in suspension, on collagen I-or IV-coated surfaces (10 µg/cm^2) at a cell density of 70,000 NK vs. 35,000 K562 cells per cm^2.
Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test or the Friedman's test, as appropriate. Significant comparisons $p<0.05$. Tonsillar samples were obtained from the patients listed in the **Supplementary Table S1** and used as follows: #58-61 and #64 were used for (B), #56-63 for (C), and #61-67 for (D).

Immune checkpoint signatures in tonsil-resident NK cells

Recognizing the distinct functionalities of NK cells across CD16^{+} and CD16^{-} subsets, as well as resident memory populations, we analyzed the expression of various immune checkpoints (ICs) that may influence their functional fate. Inhibitory NKG2A is of particular interest, as HIV viral proteins can alter the expression of its ligand, HLA-E[228,270]. Additionally, LAIR-1 and KLRG1 are important inhibitory receptors for tissue-specific proteins, with LAIR-1 binding to collagens[372] and KLRG1 targeting epithelial E-cadherin[287]. Moreover, we measured the expression of two other widely studied ICs, TIGIT and PD-1, which are known to be upregulated in memory NK cells in chronic HIV infection[373].

Overall, tonsillar NK cells exhibited high expression of NKG2A, LAIR-1, and TIGIT, while PD-1 and KLRG1 levels were relatively low **(Figure 4A)**. The CD16^{+} subset displayed elevated expression of all ICs except LAIR-1, which was more pronounced in the CD16^{-} population **(Figure 4A)**. The division of NK cells into different resident subpopulations revealed distinct IC expression patterns. Interestingly, CD16^{+} resident NK cells had elevated levels of NKG2A and TIGIT **(Figure 4B, top)**, whereas CD16^{-} NK cells showed a progressive increase in NKG2A and TIGIT from the CD16^{-} SP to TP resident NK populations **(Figure 4B, bottom)**. In contrast, LAIR-1 expression followed an inverse pattern in both CD16^{+} and CD16^{-} subsets **(Figure 4B)**. PD-1 and KLRG1 expression remained low overall, though KLRG1 was more prominent in CD16^{+} SP NK cells **(Figure 4B, top)**. When analyzing IC expression in NK cells based on their memory phenotype, differences were less pronounced. LAIR-1 expression remained consistently high **(Figure 4C)**, while memory (KIRs^{+}NKG2C^{+}) CD16$^{+/-}$ NK cells exhibited the lowest NKG2A expression **(Figure 4C)**. These cells also showed the highest expression of TIGIT and PD-1 **(Figure 4C)**, indicating their functional differentiation and possible exhaustion[374,375].

The distinct patterns of IC expression may help explain the functional differences observed between $CD16^+$ and $CD16^-$ NK cells, particularly in the two major resident phenotypes: SP and $CD49a^+$. On one hand, $CD16^+$ resident NK cells expressing only KIRs or lacking both KIRs and NKG2C displayed extremely high NKG2A expression **(Figure S4A)**, which may account for their reduced natural cytotoxicity against K562 cells **(Figure 2B, left)**, however, their higher activation threshold could be offset by potent ADCC when stimulated through the CD16 receptor. Conversely, $CD16^+$ resident $KIRs^+NKG2C^+$ NK cells had the lowest NKG2A expression but showed elevated TIGIT expression **(Figure S4A)**. On the other hand, $CD16^-$ SP NK cells, which exhibited the lowest NKG2A and highest LAIR-1 expression **(Figure 4B, bottom)**, demonstrated heightened activation, as indicated by the high percentage of $CD107a^+$ cells **(Figure 2B, right)**. Despite $CD16^-CD49a^+$ NK cells having the highest NKG2A expression **(Figure 4B, bottom)**, they were the most responsive in terms of degranulation and IFN-γ production following K562 stimulation **(Figure 2C)**. Their functional response was further enhanced by a collagen-coated surface **(Figure 3D)**, due to CD49a's role as an integrin that promotes migration along collagen fibers[253]. Moreover, $CD16^-CD49a^+$ NK cells, with low LAIR-1 expression **(Figure 4B, bottom)**, demonstrated even greater functional potential when expressing KIRs ($NKG2C^{+/-}$) **(Figure 2G)**, which coincided with lower NKG2A expression **(Figure S4B)**.

In conclusion, the functional behavior of tonsil-resident NK cells is closely linked to their immune checkpoint expression, revealing different developmental and functional states.

Figure 4

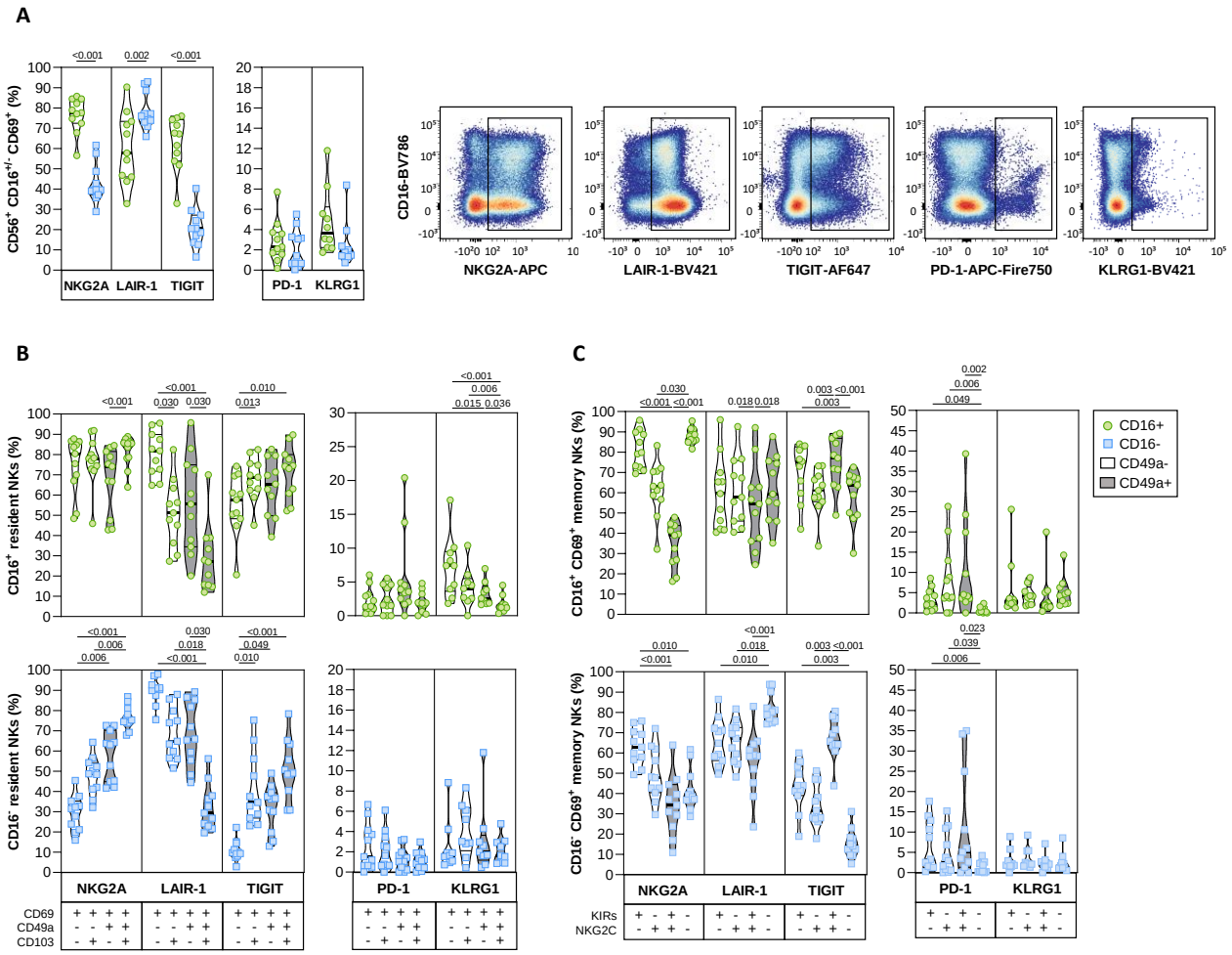


Figure 4. Immune checkpoint expression patterns in tonsil-resident NK cells.
Expression levels of the inhibitory immune checkpoints NKG2A, LAIR-1, TIGIT, PD-1, and KLRG1 were analyzed by flow cytometry in tonsillar tissue samples.
(A) Frequencies of immune checkpoint expression within $CD56^{+}CD16^{+/-}$ subsets.
(B) Frequencies of immune checkpoint expression within resident $CD16^{+}$ (top) and $CD16^{-}$ (bottom) NK cells.
(C) Frequencies of immune checkpoint expression within memory $CD16^{+}$ (top) and $CD16^{-}$ (bottom) $CD69^{+}$ NK cells.
Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test or the Friedman's test, as appropriate. Significant comparisons $p<0.05$. Tonsillar samples (#38-48) were obtained from the patients listed in the **Supplementary Table S1**. Circles: $CD16^{+}$; squares: $CD16^{-}$.

Impact of ex vivo HIV infection in tonsillar NK cells

After characterizing NK cells within tonsils, we examined the alterations in their phenotype and natural cytotoxicity against K562 cells after *ex vivo* HIV infection **(Figure 5A**). To this end, we infected tissue blocks, and after 5-6 days, we measured HIV replication and performed NK cell characterization. The median infection rate, represented by the percentage of $CD3^{+}CD8^{-}$ T cells expressing the viral antigen p24, was 1.0% **(Figure 5B)**,

consistent with other reports[104]. We did not observe a global redistribution of the tonsil-resident NK cell compartment in response to HIV infection **(Figure S5A-D)**. However, certain NK cell subpopulations showed significant variation in memory marker expression as early as 5 days post-infection **(Figure 5C-E)**. KIRs expression was slightly increased in cytotoxic $CD16^{+}CD49a^{+}$ NK cells (p=0.051) **(Figure 5C)**, while the expression of both KIRs and NKG2C was significantly reduced in HIV-exposed $CD16^{-}CD49a^{+}$ NK cells **(Figure 5D-E)**. Additionally, we observed a significant expansion of ielLC1s **(Figure 5F)**, consistent with findings of $NKp44^{+}$ ILC expansion in SIV-infected macaques[364]. This highlights the utility of the explant model in revealing NK cell dynamics in response to HIV infection in lymphatic tissue.

We also assessed the expression of functional markers following HIV exposure and found that the capacity of major resident and memory NK subpopulations to degranulate upon K562 stimulation was conserved **(Figure S5E-H)**. Importantly, no upregulation of CD107a was observed in $CD16^{+}$ resident NK cells upon HIV exposure **(Figure 5G-H, top)**. Instead, cytotoxic $CD16^{+}CD49a^{+}$ NK cells showed a reduced tendency for degranulation upon K562 stimulation **(Figure 5I)**, which may indicate their functional exhaustion. Accordingly, we found higher expression of PD-1 on $CD16^{+}CD49a^{+}KIRs^{+}$ NK cells present in HIV-infected explants **(Figure 5J)**. In contrast, CD107a expression in $CD16^{-}$ SP $KIRs^{+}$ NK cells was increased by HIV exposure (p=0.063) **(Figure 5G, bottom)**, suggesting their potential role in responding to HIV infection within the explant. Moreover, when evaluating the maximum stimulatory potential of NK cells after K562 stimulation and HIV priming, $CD16^{-}$ SP $KIRs^{-}$ (p=0.016) and $KIRs^{+}$ (p=0.063) NK cells **(Figure 5H, bottom, K)** exhibited the most pronounced enhancement in degranulation following HIV exposure. Remarkably, the downregulation of inhibitory receptors LAIR-1 **(Figure 5L)** and TIGIT **(Figure 5M)** on $CD16^{-}$ SP $KIRs^{+}$ NK cells points to a functional shift that could enhance their activation.

After confirming that HIV exposure had differential effects on the degranulation capacity of tonsil-resident memory NK cells against non-specific targets (K562 cells), we proceeded to investigate whether it also influenced their ability to kill autologous HIV-infected $CD4^{+}$ T cells. To this end, we cultured both HIV-infected and uninfected tonsil explants for 5 days, alongside with autologous $CD4^{+}$ T cells infected with HIV via spinoculation. We then quantified the NK cell-mediated killing of HIV^{+} $CD4^{+}$ T cells in a coculture system. Our results indicated that NK cells from both HIV-exposed and unexposed tonsils were equally effective in eliminating $p24^{+}CD4^{+}$ T cells *in vitro* **(Figure 5N)**, showing no evidence of impaired killing capacity or enhancement of memory-driven responses in the total NK cell population.

Therefore, we have elucidated distinct early functional changes in tonsil-resident NK cells in response to initial HIV infection. While the cytotoxicity of CD16⁻ SP NK cells against new cell targets increased, CD16⁺CD49a⁺ NK cells showed impaired degranulation, suggesting a potential exhaustion of their cytotoxic function.

Figure 5

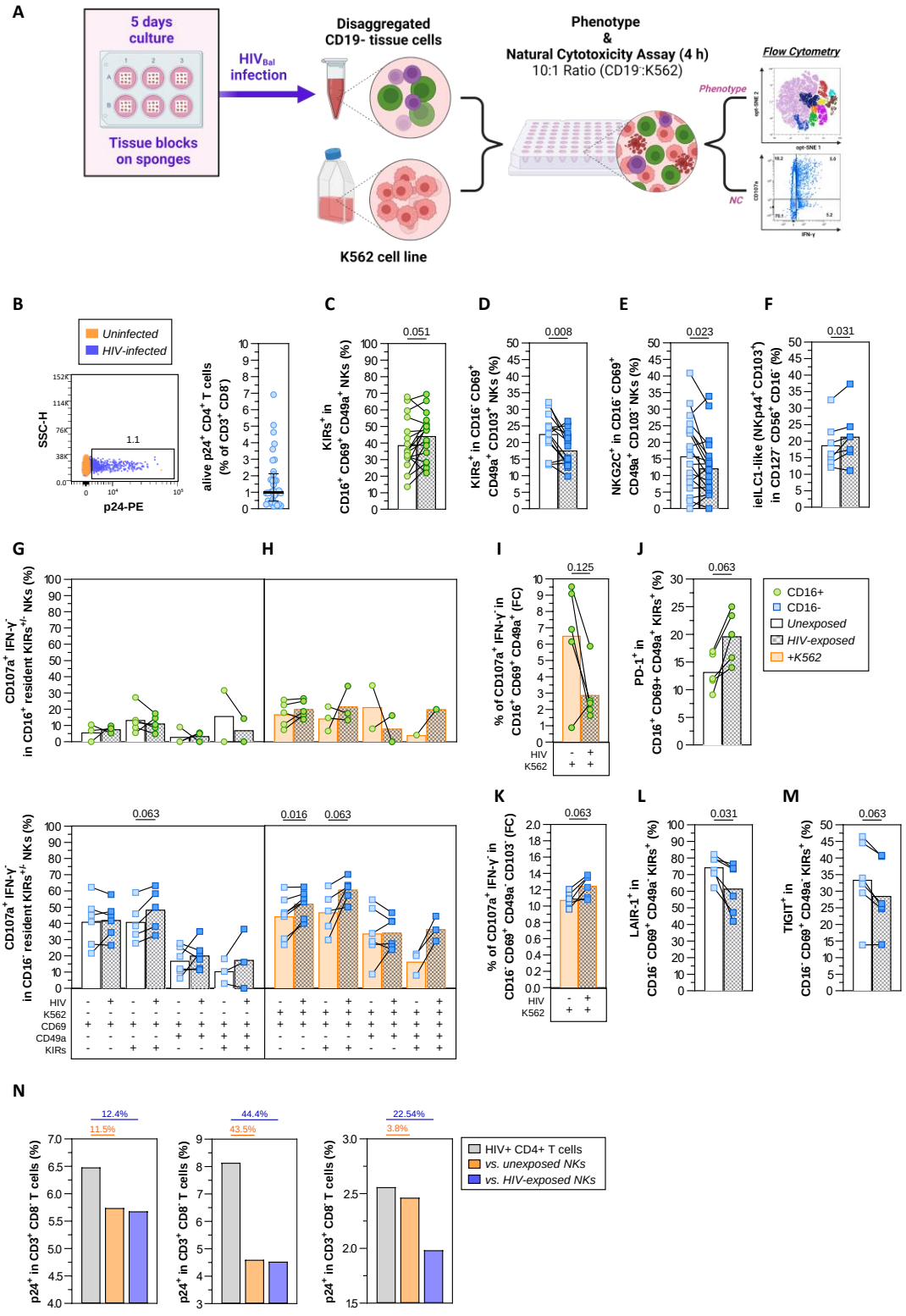


Figure 5. HIV infection of tissue explants alters the dynamics of tonsil-resident memory NK cells.
Tonsillar tissue explants were cultured on hemostatic sponges and *ex vivo*-infected by HIV_{BaL} for 5-6 days. The expression of resident, memory, and functional markers was measured by flow cytometry in the steady state and upon stimulation with K562 cell coculture from uninfected and infected tissue explant cells.
(A) Diagram representation of the experimental workflow.
(B) HIV *ex vivo* infection levels measured as the % of $p24^+$ cells within $CD3^+CD8^-$ T cells.
(C) Expression of KIRs on $CD16^+CD49a^+$ NK cells in the infected culture compared to the uninfected control.
(D) Expression of KIRs on $CD16^-CD49a^+CD103^+$ NK cells in the infected culture compared to the uninfected control.
(E) Expression of NKG2C on $CD16^-CD49a^+CD103^-$ NK cells in the infected culture compared to the uninfected control.
(F) Frequency of ieILC1s in the infected culture compared to the uninfected control.
(G) Degranulation activity (% of $CD107a^+IFN\text{-}\gamma^-$ cells) of $CD16^+$ (top) and $CD16^-$ (bottom) resident $KIRs^{+/-}$ NK cells in uninfected and infected explants.
(H) Degranulation activity (% of $CD107a^+IFN\text{-}\gamma^-$ cells) of $CD16^+$ (top) and $CD16^-$ (bottom) resident $KIRs^{+/-}$ NK cells in uninfected and infected explants upon K562 cell stimulation.
(I) Degranulation potential (fold-change of $CD107a^+IFN\text{-}\gamma^-$ cells) of $CD16^+CD49a^+$ NK cells in uninfected and infected explants upon K562 stimulation.
(J) Expression of PD-1 on $CD16^+CD49a^+KIRs^+$ NK cells in the infected culture compared to the uninfected control.
(K) Degranulation potential (fold-change of $CD107a^+IFN\text{-}\gamma^-$ cells) of $CD16^-CD69^+CD49a^-CD103^-$ NK cells in uninfected and infected explants upon K562 stimulation.
(L) Expression of LAIR-1 on $CD16^-CD49a^-KIRs^+$ NK cells in the infected culture compared to the uninfected control.
(M) Expression of TIGIT on $CD16^-CD49a^-KIRs^+$ NK cells in the infected culture compared to the uninfected control.
(N) Tonsil NK cell killing assay against *ex vivo* HIV-infected autologous $CD4^+$ T cells via spinoculation. Total NK cells were purified from uninfected and HIV-infected tonsil explants. Percentages of reduction of $p24^+CD3^+CD8^-$ T cells are shown for each subject.
For (B), median with interquartile range is represented. Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Significant comparisons $p<0.05$. Tonsillar samples were obtained from the patients listed in the **Supplementary Table S1** and used as follows: #3-16, #20-23, #38-49, and #68 were used for (B), #3-14, #19, #21-23, and #42-49 for (C-E), #42-48 for (F) and (J-M), #8-14 for (G-I) and (K), and #40-41 and #68 for (N). Circles: $CD16^+$; squares: $CD16^-$.

Specific tonsil-resident memory NK cells are associated with enhanced killing of HIV-infected tonsillar $CD4^+$ T cells

Further analyses explored the relationship between the frequencies and functional characteristics of tonsil-resident NK cells and their capacity to control *ex vivo* HIV infection. Our goal was to identify a key signature of tonsil-resident NK cells critical for restraining HIV expansion within tonsils. We found that none of the resident markers in $CD16^+$ subpopulations were associated with improved control of HIV infection in tissue explants **(Figure 6A)**. However, a more detailed analysis revealed that increased frequencies of TP NK cells expressing KIRs and/or NKG2C within the $CD16^+$ subset correlated with lower infection levels **(Figure 6B)**. Notably, the expression of ICs negatively impacted these $CD16^+$ TP NK cells. Specifically, higher levels of p24 in explants were associated with the expression of PD-1 **(Figure S6A-B)** and KLRG1 **(Figure S6C-D)** on these NK cells, highlighting the

importance of this population. For CD16$^-$ NK cells, those expressing CD103 (CD49a$^{+/-}$) exhibited beneficial effects **(Figure 6C)**, likely including the ieILC1s, as most CD16$^-$CD103$^+$ cells express NKp44 **(Figure 1H)**, and were found to expand after HIV exposure **(Figure 5F)**. The expression of PD-1 on CD16$^-$ TP NKG2C$^+$ NK cells correlated with higher p24 levels **(Figure S6E)**. Furthermore, KLRG1 **(Figure S6F)** and TIGIT **(Figure S6G)** on CD16$^-$ DP NK cells were also negatively associated with infection control in explants. Last, CD16$^-$ SP NK cells were only beneficial when expressing KIRs **(Figure 6D)**, which may be related to their increased degranulation upon HIV exposure **(Figure 5K)**. Although the expression of most ICs in resident NK cells correlated with poorer HIV control, LAIR-1 displayed an inverse pattern. Its expression on resident and memory CD16$^+$ **(Figure S6H-I)** and CD16$^-$ **(Figure S6J-K)** NK cells was associated with lower HIV levels. Importantly, we observed that LAIR-1 expression was diminished in CD16$^-$ SP KIRs$^+$ NK cells following HIV exposure **(Figure 5L)**, which may indicate a substantial role of LAIR-1 in the control of HIV infection by NK cells.

To determine the intrinsic cytotoxic potential of different resident NK cell populations without the support of the tissue microenvironment –such as the prominent IFN-γ secretion by CD16$^-$ DP and TP (CD49a$^+$) NK cells, which may activate the local immune response and ultimately enhance NK cell cytotoxicity[376–379]– we isolated different tonsillar NK cell populations using Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) based on CD16, CD69, CD49a, and CD103 expression, and conducted functional killing assays against autologous HIV-infected tonsil-resident (CD69$^+$) CD4$^+$ T cells **(Figure 6E)**. After a 5-day coculture with HIV-infected CD4$^+$ T cells via spinoculation, no significant differences in killing activity were observed between CD16$^+$ and CD16$^-$ NK subsets **(Figure 6F)**. However, SP NK cells demonstrated significantly superior killing of HIV-infected cells compared to TP NK cells, which exhibited poor control of HIV-infected tonsillar CD4$^+$ T cells (92.1% and 70.7% reduction, respectively, p=0.004) **(Figure 6G)**. However, CD16$^-$ TP NK cells (mostly ieILC1-like) were associated with lower HIV levels in explants **(Figure 6C).** This discrepancy may be attributed to the different cytokine milieu in tonsil explants compared to our coculture system after cell sorting.

Taken together, isolated NK cells from tonsils exhibit a different tendency for HIV control compared to NK cells evaluated within the tissue, underscoring the need for more complex models to evaluate the efficacy of tissue NK cells in targeting HIV.

Figure 6

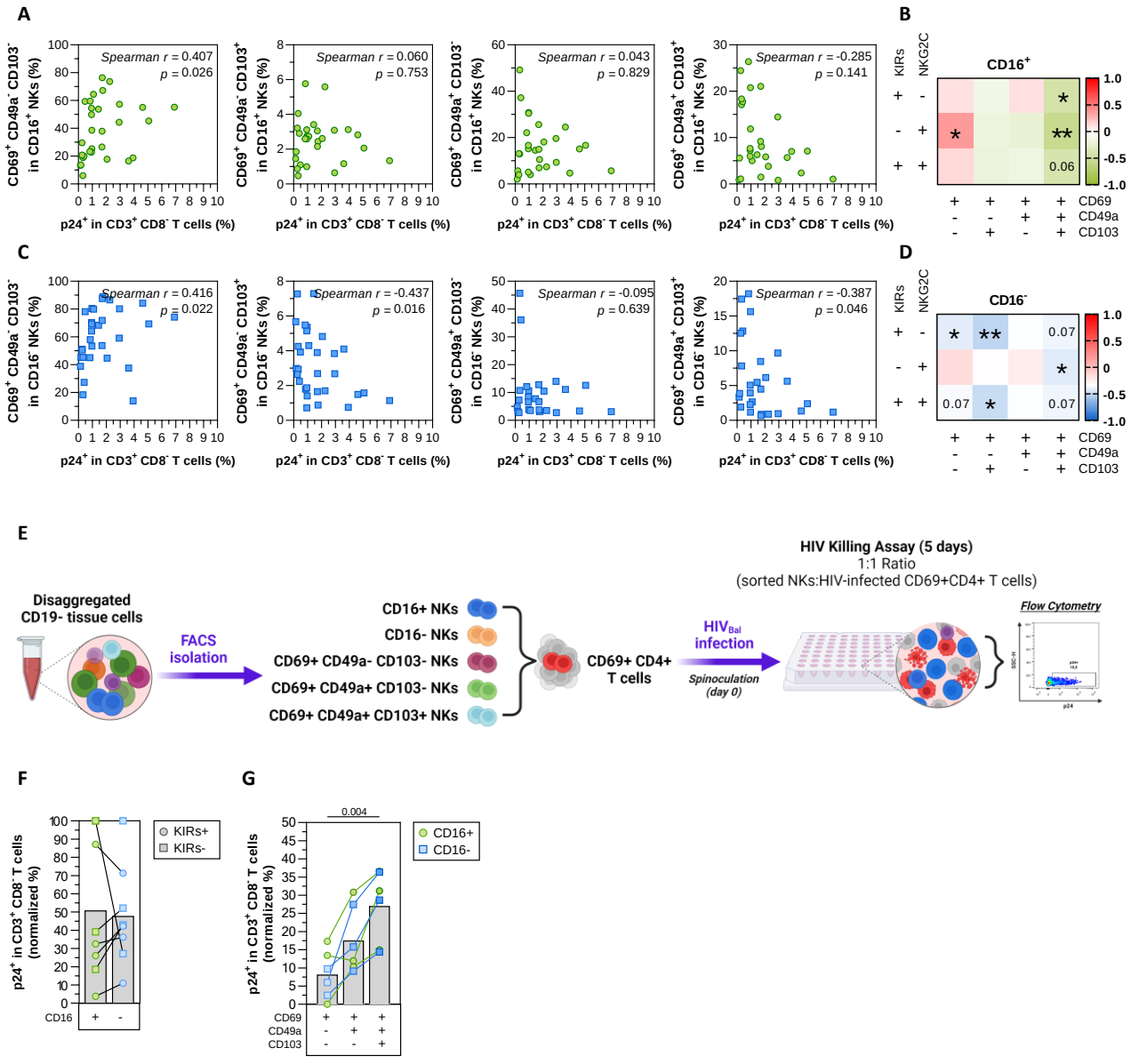


Figure 6. Tonsil-resident NK subpopulations have different capabilities to restrain HIV infection.
Tonsillar tissue explants were cultured on hemostatic sponges and *ex vivo*-infected by HIV_{BaL} for 5 days. The expression of resident and memory markers was measured by flow cytometry at baseline and correlated with the *ex vivo* HIV infection levels (% $p24^+$ cells within $CD3^+CD8^-$ T cells). Spearman correlations of the significant results are shown. NK cells were FACS-isolated based on the expression of resident and memory markers and cocultured with autologous $CD4^+CD69^+$ T cells infected by spinoculation with HIV_{BaL}. Direct cell killing of $HIV^+CD3^+CD8^-$ T cells ($p24^+$) was quantified by flow cytometry 5 days after infection.
(A-D) Spearman correlations and correlation matrices showing the relationship between HIV p24 levels in explants and the initial frequencies of **(A-B)** $CD16^+$ and **(C-D)** $CD16^-$ tonsil-resident memory NK cells on day 0.
(E) Experimental setting of functional cocultures to assess the suppression capacity of HIV infection by tonsil-resident NK subpopulations.
(F-G) Natural cytotoxicity assays of *ex vivo* HIV-infected $CD4^+CD69^+$ T cells after coculturing with isolated NK cells showing differential expression of **(F)** CD16 and **(G)** resident markers.

In (F) and (G), different NK subpopulations and $CD4^+CD69^+$ T cells were isolated by FACS. Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test or Friedman's test, as appropriate. Significant comparisons $p<0.05$. Tonsillar samples were obtained from the patients listed in the **Supplementary Table S1** and used as follows: #3-16, #20-23, and #38-49 were used for (A-D), #53-55 and #57 for (F), and #50-52 for (G).

Discussion

The mechanisms underlying the rapid mounting of local NK cell responses to initial HIV infection in secondary lymphoid tissues are still poorly understood. Despite the innate nature of NK cells[380], circulating NK cells have shown immunological memory to certain viruses[192], including HIV[195]. In tissues, resident NK subpopulations respond firmly to secondary infections[112,221,222,381] and possess recall responses in vaccinated individuals[221,222]. Here, we have investigated the functional diversity of NK cells within human tonsils, examined the effects of *ex vivo* HIV infection, and identified specific NK cell populations exhibiting antiviral effects against HIV in lymphoid tissue. We discovered that specific populations of trNK cells, such as $CD16^{-}$ SP and $CD16^{+}$ TP cells, may serve as the primary force directly impacting HIV infection, while $CD16^{-}CD49a^{+}$ NK cells likely function as tissue sentinels, scanning for infected cells along collagen rails.

$CD16^{+/-}$ NK cell subsets in the tonsillar tissue were clearly opposed in terms of functional activation and residency markers. Minoritarian $CD16^{+}$ tonsillar NK cells had strong imprints of residency and memory, especially when coexpressing CD49a. However, they had low expression of the degranulation marker CD107a, in contrast to the $CD16^{-}$ fraction, which was mostly $CD69^{+}CD107a^{+}$. Remarkably, despite $CD49a^{+}KIRs^{+}$ NK cells were much less frequent in the $CD16^{-}$ fraction, they possess an exacerbated IFN-γ production upon stimulation, suggesting that functional divergences may be linked to the expression of CD16 and CD49a receptors. Functional assays involving components of the tissue extracellular matrix validated that the expression of the collagen receptor CD49a in $CD16^{-}$ tonsillar NK cells confers advantages for NK cells possibly in scanning and contacting target cells[253,382]. Nonetheless, a drawback is the tendency of collagens to promote tissue HIV infection through cell-to-cell transmission[383,384]. Notably, TP NK cells exhibited the lowest LAIR-1 expression, a collagen receptor with inhibitory functions, indicating functional adaptations to tissue components[276,277]. These results suggest that NK cells with direct cytotoxic abilities may not be the most effective if they cannot efficiently interact with infected cells within tissue environments. Of particular interest is the observation that IFN-γ in tissues inhibits collagen synthesis[385,386], thereby facilitating access for killer lymphocytes to localized infections. Additionally, some direct effects of IFN-γ-producing NK cells towards the extracellular matrix have been identified[387].

Our results are consistent with previous studies; in humans, there is compelling evidence that $CD16^{-}CD49a^{+}$ NK cells have higher production of IFN-γ among tissues, but degranulate

poorly in the steady state upon *in vitro* stimulation[217]. However, despite CD49a$^+$ NK cells being proinflammatory across human tissues, certain conditions activate their cytotoxic status. In the human lung, they were found to produce perforin and granzyme B at levels comparable to the CD49a$^-$ fraction when stimulated with IL-15[218]. Moreover, CD16$^-$CD49a$^+$ NK cells from the center of lung tumors degranulated stronger than CD16$^-$CD49a$^-$ NK cells[219]. Indeed, recall responses have been attributed to these trNK cells for Varicella-Zoster Virus[221] and Hepatitis A and B viruses[222]. Of note, a strong parallelism with tissue-resident memory CD8$^+$ T cells (trm CD8$^+$ T cells) exists. After influenza infection, lung trm CD49a$^+$CD8$^+$ T cells slowly upregulate mRNA levels of perforin, granzymes and death-receptor ligands[388], reinforcing the idea that CD49a$^+$ lymphocytes act as initial producers of antiviral IFN-γ against a first-ever-seen pathogen, serving as a warning system, and enhance their cytotoxic response when the infection persists longer[112,222,389,390].

After mapping the functionality of tonsil-resident NK cells on the steady state, we used the tonsillar explant model to define the natural NK response upon HIV infection. HIV exposure drastically reduced the degranulation potential of CD16$^+$CD49a$^+$ NK cells while increasing their PD-1 and KIRs expression. Further reinforcing their importance, CD16$^+$ TP NK cells expressing KIRs and/or NKG2C strongly correlated with reduced HIV levels in the explants, whereas their PD-1 expression was related to higher infectivity rates. Conversely, HIV-induced activation may confer hyperresponsiveness to CD16$^-$ NK cells in the tonsil explants. HIV not only activated some CD16$^-$ trNK cells, but also enhanced their reactivity to new target cell stimulation, and their expression of inhibitory receptors LAIR-1 and TIGIT was decreased. This was particularly notable in the SP KIRs$^+$ NK population, which correlated with reduced *ex vivo* HIV infection and presented the highest antiviral activity in a HIV-specific killing assay. Accordingly, NK cells only expressing CD69 were shown to acquire a resident memory phenotype in a murine model of skin infection[112]. On the other hand, CD16$^-$CD49a$^+$ NK cells decreased expression of memory markers and may suggest potential onset of apoptosis due to lymphocyte activation in response to infection[391].

An interesting observation is the expansion of ieILC1s (CD16$^-$NKp44$^+$CD103$^+$) following HIV infection, suggesting their initial role in combating acute HIV within lymphoid tissue. Notably, CD103 expression on NK cells was strongly correlated with HIV control in the explants, despite their limited intrinsic ability to kill HIV-infected cells in the coculture system. This underscores the importance of evaluating functional features within the appropriate microenvironment. For example, IL-15, which can be transpresented by dendritic cells in the tonsils[209,392], upregulates cytotoxic mediators in CD16$^-$CD49a$^+$ NK cells[218,222,265] and

counteracts the immunosuppressive effects of TGF-β[212,393], thereby promoting the optimal response of ieILC1s[170], although the expression of CD103 is increased by TGF-β[394]. Of note, chronic HIV infection leads to TGF-β-mediated collagen deposition that exacerbates tissue compartmentalization[275,343,344].

Taken together, we propose the existence of a temporospatially regulated defensive mechanism, wherein CD16$^-$ SP KIRs$^+$ and CD16$^+$ TP KIRs$^+$ NK cells are the main populations directly killing HIV-infected cells, while CD16$^-$CD49a$^+$ NK cells act as tissue sentinels, scanning for infected cells along collagen rails. Prior to infection, naturally occurring CD16$^-$ CD49a$^+$ trNK cells may be the initial subset to recognize HIV-infected cells, triggering a robust proinflammatory response mediated by IFN-γ. Importantly, IFN-γ has shown to stimulate IL-15 production by epithelial[395] and dendritic[396] cells, thus IFN-γ derived from CD16$^-$CD49a$^+$ NK cells may serve as a first warning signal that activates and enhances the cytotoxic function of tonsil-resident NK cells. Moreover, IL-15 promotes CD49a expression on trNK cells[208,397,398], indicating a potential mechanism for enhanced cell trafficking. Consistent with this hypothesis are findings of rhesus macaques infected with SIV and SHIV, where intrahepatic CD49a$^+$ NK cells are expanded two-fold and exhibit polyfunctionality (CD107a$^+$IFN-γ$^+$ cells) upon viral infection[351].

Considering that the B cell follicles, where HIV replication localizes in lymph nodes[91,92], are encapsulated with collagen[92], it raises the intriguing possibility that IL-15 may facilitate the access of cytotoxic lymphocytes to lymph nodes but not their entry into the B cell follicles. Despite we found that CD49a$^+$KIRs$^+$ NK cells have elevated CXCR5 expression, Massoni-Badosa *et al.* demonstrated that CD49a$^+$ lymphocytes are only found surrounding B cell follicles in human tonsils[259], thus, the precise resident memory phenotype of NK cells that have demonstrated to colocalize with HIV-infected follicular helper CD4$^+$ T cells in germinal centers needs further clarification.

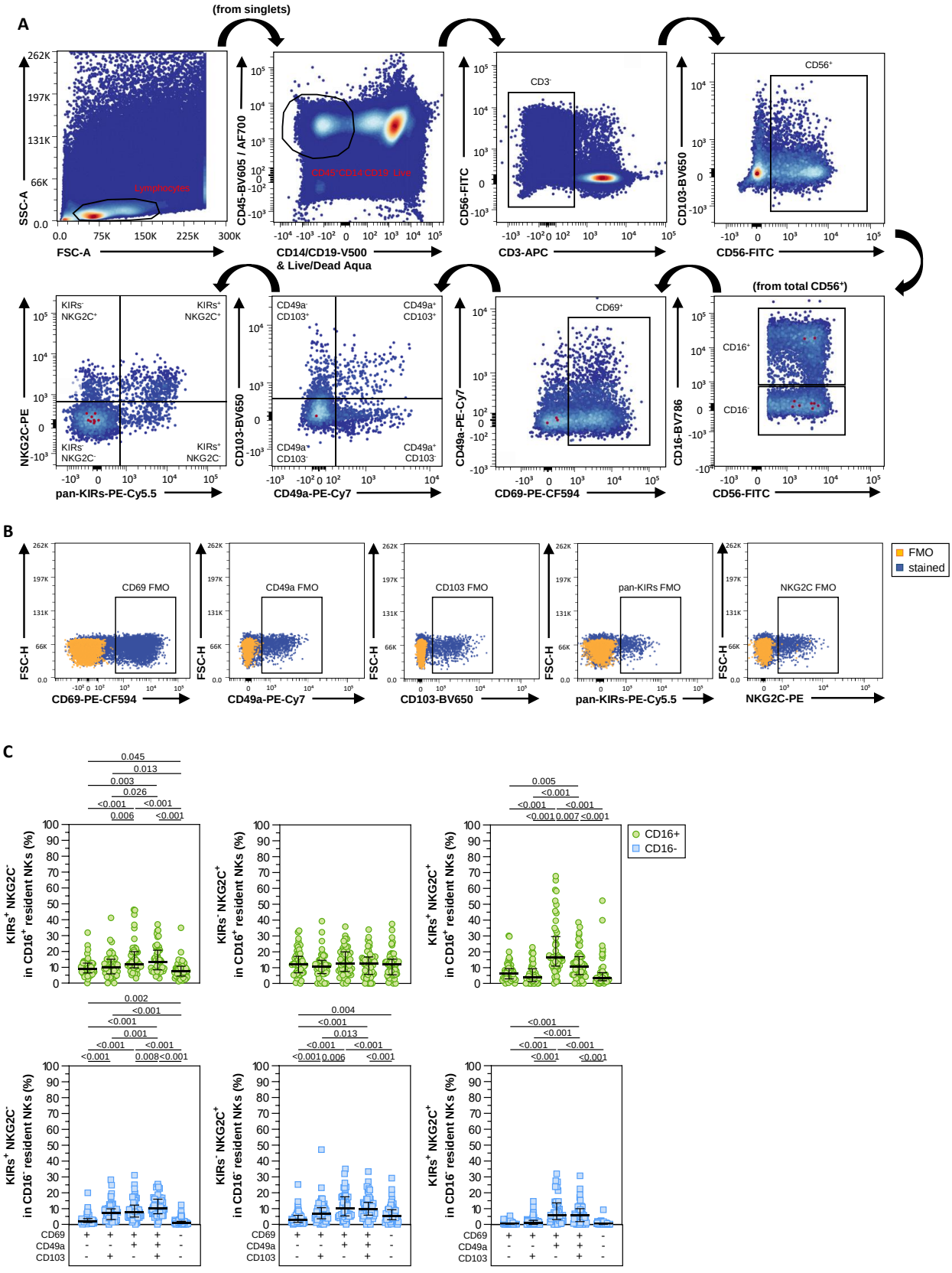
In conclusion, our study provides novel insights into the phenotypical and functional characteristics of human NK cells within secondary lymphoid tissues, both under steady-state conditions and during the early stages of HIV infection. Our findings highlight the significance of considering specific spatial and immunological factors in the design of future therapeutic interventions targeting HIV reservoirs within tissues, with a focus on harnessing the potential of tissue-resident memory NK cells.

Limitations of the study

Our investigation using the tonsillar tissue model has been informative, yet it predominantly focuses on changes occurring within the local NK cell populations, without fully considering potential contributions from mature NK cells recruited from circulation. This is noteworthy given that a significant portion of NK cells in tonsils consists of immature subpopulations undergoing differentiation before they enter circulation[179,209,259]. Nonetheless, the tonsillar explant model presents a unique opportunity to focus exclusively on NK cells that reside within the tonsils, independent of those in circulation. Moreover, tissue remodeling by matrix metalloproteinases (MMPs) results in the shedding of CD16[399], introducing the likelihood that functional (CD107a^{high}) CD16^{-} SP might have initially been CD16^{+} SP NK cells. Prior activation could induce degranulation and CD16 shedding, a process known to be advantageous for promoting serial killing[400]. Finally, our exclusive focus on CD49a expression may oversimplify the diversity within CD49a^{+} NK cells, which can be further subdivided by the expression of CD49b. Coexpression of both CD49a and CD49b identifies currently active NK cells, while those expressing only CD49a are considered long-term residents[401,402]. Addressing these limitations will strengthen the robustness and applicability of our findings in the broader context of immune responses to tissue infections.

Supplementary data

Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S1 ***(continued)***

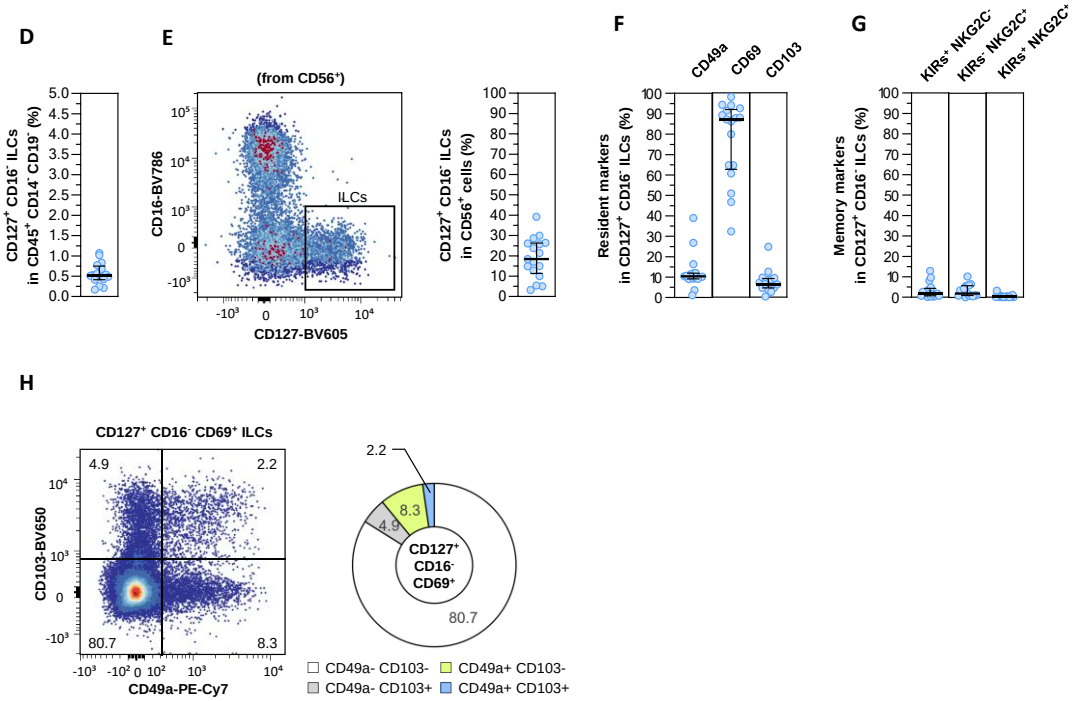


Figure S1. Tissue-resident memory phenotype of tonsillar NK cells.
Expression of resident (CD69, CD49a, and CD103) and memory (KIRs and NKG2C) markers measured by flow cytometry in different tonsillar tissue specimens.
(A) Gating strategy of tissue-resident memory NK cells in tonsils.
(B) Fluorescent Minus One (FMO) controls of tissue-resident memory markers expressed on tonsillar NK cells.
(C) Coexpression frequencies of memory markers within resident CD16^{+} and CD16^{-} NK subpopulations.
(D-E) Frequencies of CD127^{+}CD16^{-} ILCs within **(D)** CD45^{+}CD14^{-}CD19^{-} lymphocytes and **(E)** CD56^{+} cells.
(F) Frequency of resident CD127^{+}CD16^{-} ILCs.
(G) Frequency of memory CD127^{+}CD16^{-} ILCs.
(H) Coexpression frequencies of resident markers within CD127^{+}CD16^{-} ILCs.
Median with interquartile range is represented. Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test and the Skillings-Mack test when appropriate. Significant comparisons p<0.05. Tonsillar samples were obtained from the patients listed in the **Supplementary Table S1** and used as follows: #1-48 and #50-56 were used for (C) and #27-43 for (D-H). Circles: CD16^{+}; squares: CD16^{-}.

Supplementary Figure S2

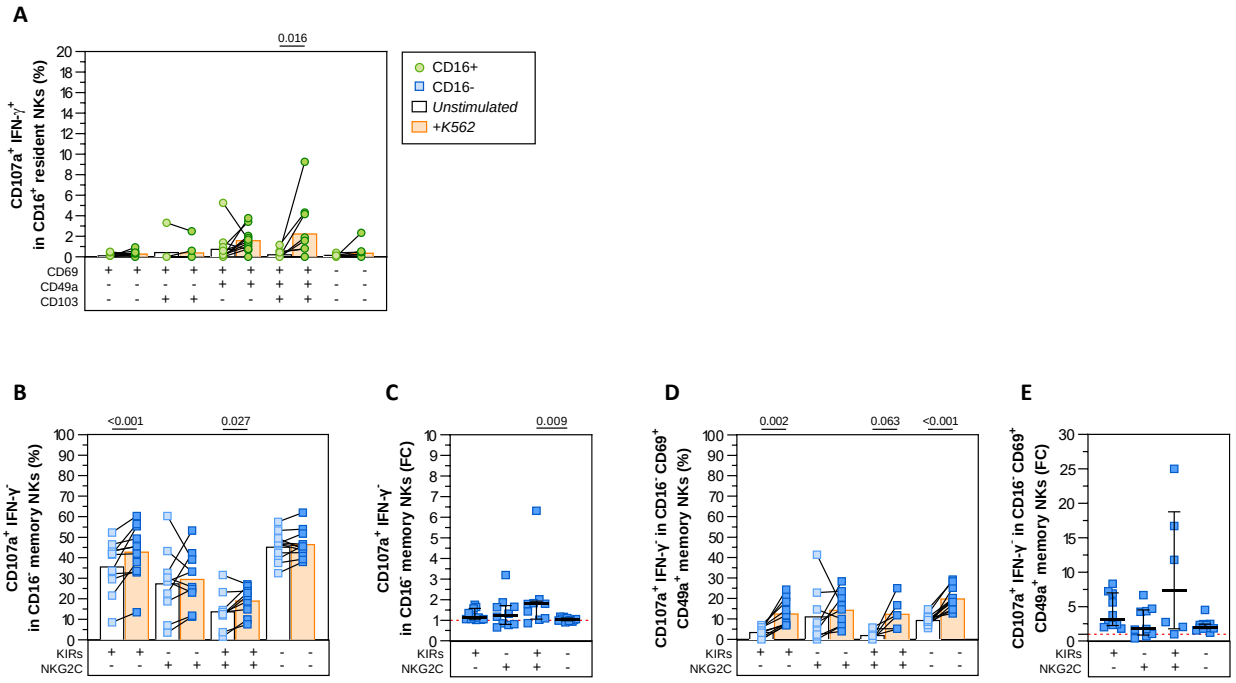


Figure S2. Functionality of tonsil-resident memory NK cells.
Expression of the degranulation marker CD107a and intracellular IFN-γ measured by flow cytometry in different tonsillar tissue specimens in the steady state and upon stimulation with K562 cells.
(A) Cytokine production (% of CD107a$^+$IFN-γ$^+$ cells) by resident CD16$^+$ NK cells.
(B-E) Cytotoxic degranulation (% and fold-change of % CD107a$^+$IFN-γ$^-$ cells) by **(B, C)** memory CD16$^-$ NK cells, and **(D, E)** CD49a$^+$ memory CD16$^-$ NK cells. Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test and Skillings-Mack test when appropriate. Significant comparisons $p<0.05$. Red dotted line in fold-change graphs represents FC=1 (no change). Tonsillar samples (#8-18) were obtained from the patients listed in the **Supplementary Table S1**. Circles: CD16$^+$; squares: CD16$^-$.

Supplementary Figure S3

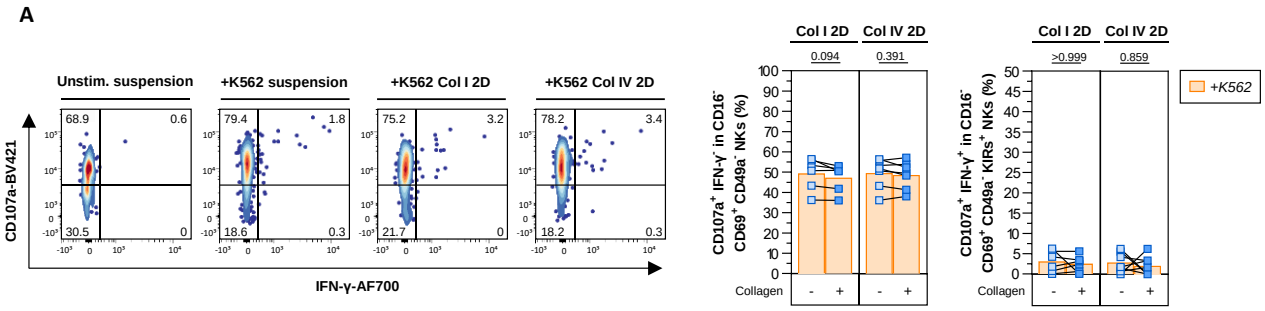


Figure S3. Role of the tonsillar microstructure in the function of resident NK cells.
The effects of extracellular matrix components (collagens) were assessed in a functional coculture assay of tonsillar NK cells against K562 cell targets (2:1 ratio) overnight (16 hours).
(A) Gating strategy of functional markers within $CD16^{-}CD49a^{-}KIRs^{+}$ NK cells measured by flow cytometry. Cytotoxic degranulation (% of $CD107a^{+}IFN\text{-}\gamma^{-}$) by $CD16^{-}CD49a^{-}$ NK cells and cytokine production (% of $CD107a^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}$) by $CD16^{-}CD49a^{-}KIRs^{+}$ NK cells when cocultured with K562 target cells in suspension, on collagen I-or IV-coated surfaces (10 µg/cm^2) at a cell density of 70,000 NK vs. 35,000 K562 cells per cm^2.
Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Significant comparisons $p<0.05$. Tonsillar samples (#61-67) were obtained from the patients listed in the **Supplementary Table S1**.

Supplementary Figure S4

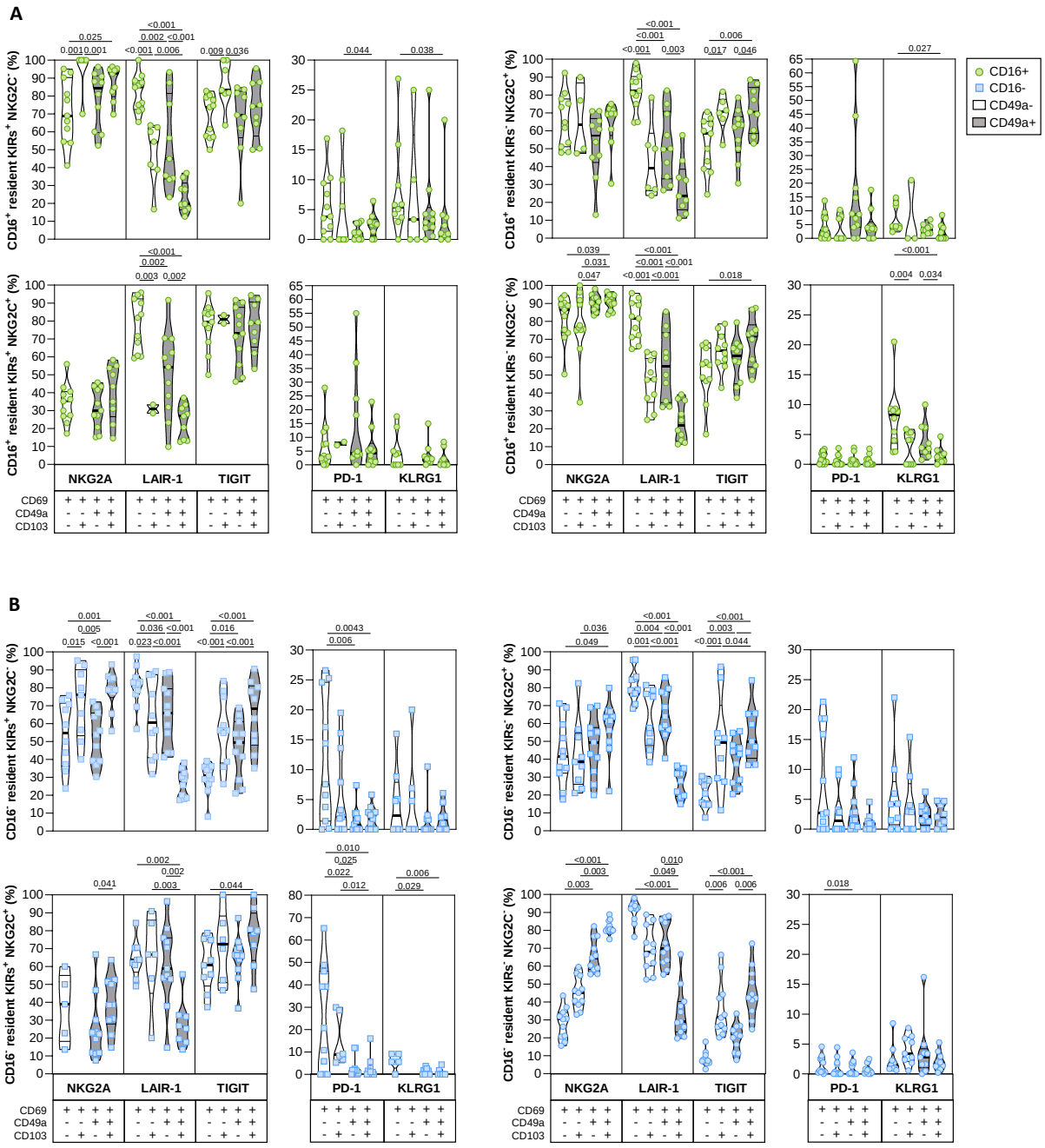


Figure S4. Immune checkpoint expression patterns in tonsil-resident NK cells.
Expression levels of the inhibitory immune checkpoints NKG2A, LAIR-1, TIGIT, PD-1, and KLRG1 were analyzed by flow cytometry in tonsillar tissue samples.
(A) Frequencies of immune checkpoint expression within resident memory CD16^{+} NK cells.
(B) Frequencies of immune checkpoint expression within resident memory CD16^{-} NK cells.
Statistical comparisons were performed using the Friedman's test or the Skillings-Mack test, as appropriate. Significant comparisons $p<0.05$. Tonsillar samples (#38-48) were obtained from the patients listed in the **Supplementary Table S1**. Circles: CD16^{+}; squares: CD16^{-}.

Supplementary Figure S5

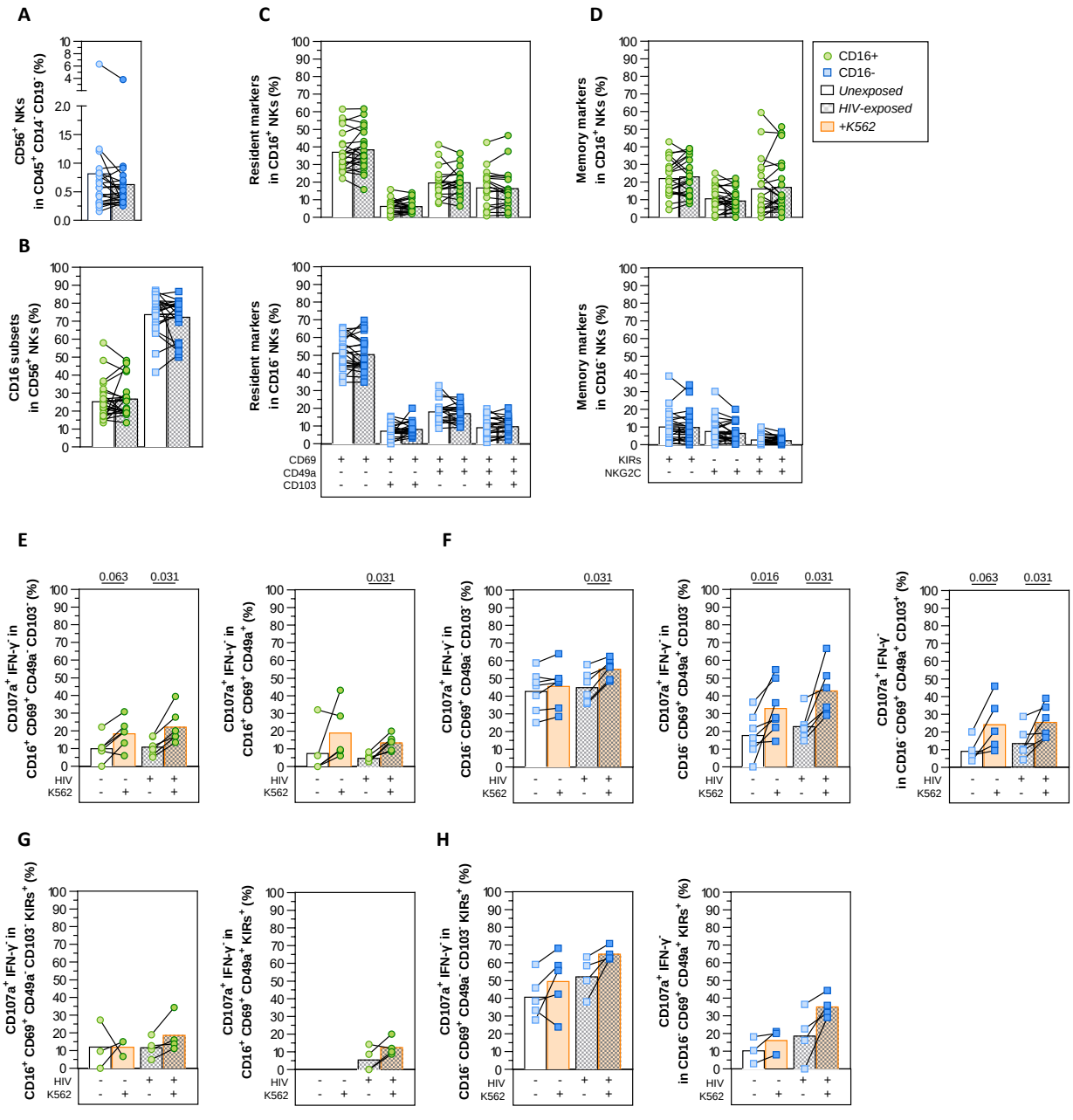


Figure S5. HIV infection of tissue explants alters the dynamics of tonsil-resident memory NK cells.
Tonsillar tissue explants were cultured on hemostatic sponges and *ex vivo*-infected with HIV_{BaL} for 5 days. The expression of resident, memory, and functional markers was measured by flow cytometry in the steady state and upon stimulation with K562 cell coculture from uninfected and infected tissue explant cells.
(A-D) Frequencies of **(A)** total $CD56^+$ NK cells, **(B)** $CD16^{+/-}$ NK cell subsets, **(C)** resident $CD16^{+/-}$ NK cells, and **(D)** memory $CD16^{+/-}$ NK cells in uninfected and infected tissue explants.
(E-F) Degranulation potential upon K562 stimulation of **(E)** $CD16^+$ and **(F)** $CD16^-$ resident NK subpopulations in uninfected and infected tissue explants.
(G-H) Degranulation potential upon K562 stimulation of **(G)** $CD16^+$ and **(H)** $CD16^-$ resident NK subpopulations expressing KIRs in uninfected and infected tissue explants.

Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Significant comparisons. Tonsillar samples were obtained from the patients listed in the **Supplementary Table S1** and used as follows: #3-14, #19, #21-23, and #42-49 for (A-D) and #8-14 for (E-H). Circles: $CD16^{+}$; squares: $CD16^{-}$.

Supplementary Figure S6

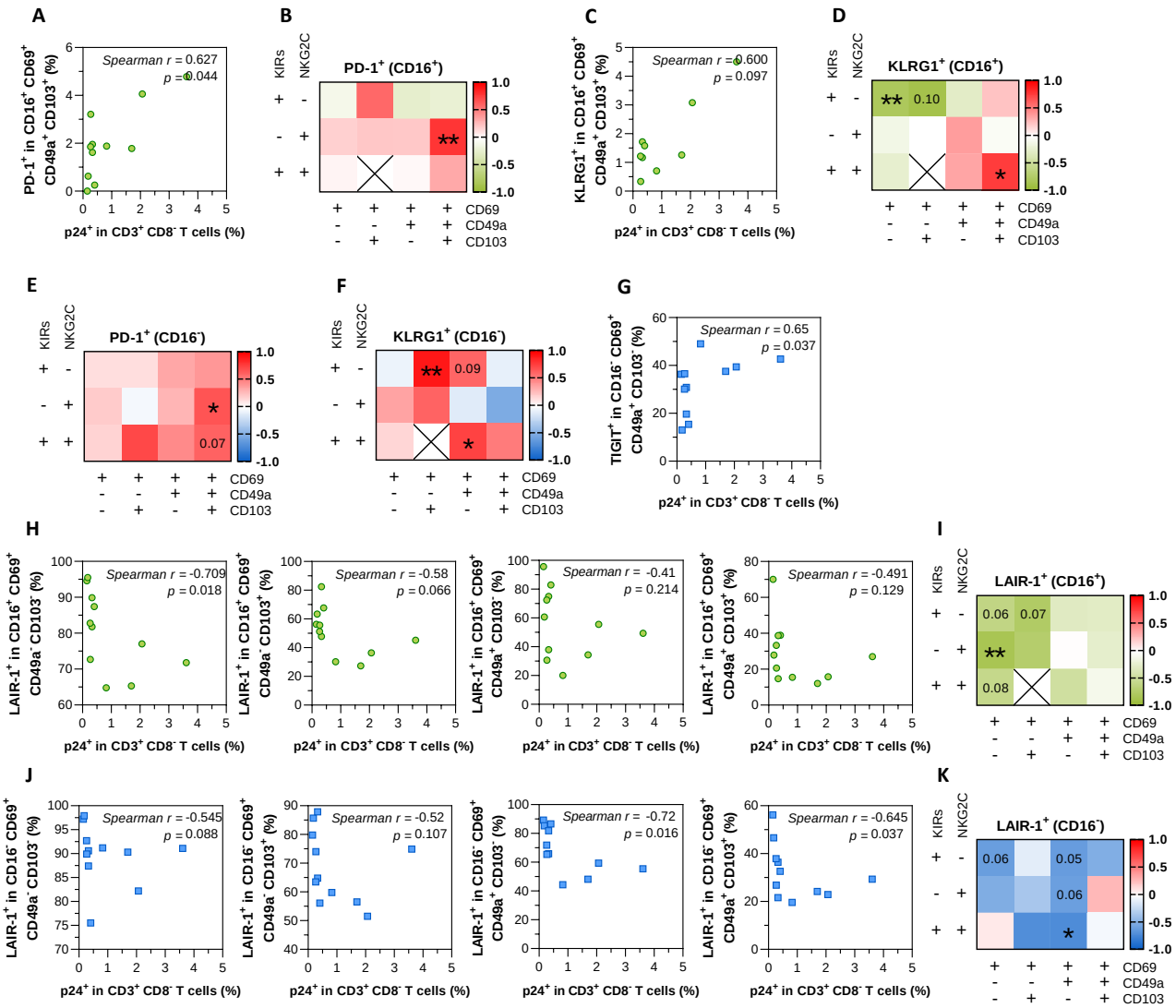


Figure S6. Tonsil-resident NK subpopulations have different capabilities to restrain HIV infection.
Tonsillar tissue explants were cultured on hemostatic sponges and *ex vivo*-infected by HIV_{BaL} for 5 days. The expression of immune checkpoints in tonsil-resident NK cells was measured by flow cytometry at baseline and correlated with the *ex vivo* HIV infection levels (% $p24^{+}$ cells within $CD3^{+}CD8^{-}$ T cells). Spearman correlations of the significant results are shown.

(A) Spearman correlation showing the relationship between HIV p24 levels in explants and the expression of PD-1 on $CD16^{+}CD69^{+}CD49a^{+}CD103^{+}$ NK cells on day 0.

(B) Correlation matrix showing the relationship between HIV p24 levels in explants and the expression of PD-1 on $CD16^{+}$ resident memory NK cells on day 0.

(C) Spearman correlation showing the relationship between HIV p24 levels in explants and the expression of KLRG1 on $CD16^{+}CD69^{+}CD49a^{+}CD103^{+}$ NK cells on day 0.

(D) Correlation matrix showing the relationship between HIV p24 levels in explants and the expression of KLRG1 on $CD16^{+}$ resident memory NK cells on day 0.

(E) Correlation matrix showing the relationship between HIV p24 levels in explants and the expression of PD-1 on $CD16^-$ resident memory NK cells on day 0.
(F) Correlation matrix showing the relationship between HIV p24 levels in explants and the expression of KLRG1 on $CD16^-$ resident memory NK cells on day 0.
(G) Spearman correlation showing the relationship between HIV p24 levels in explants and the expression of TIGIT on $CD16^-CD69^+CD49a^+CD103^-$ NK cells on day 0.
(H-K) Spearman correlations and correlation matrices showing the relationship between HIV p24 levels in explants and the expression of LAIR-1 on **(H-I)** $CD16^+$ and **(J-K)** CD16– tonsil-resident memory NK cells on day 0. Significant Spearman's $p<0.05$. Tonsillar samples (#38-48) were obtained from the patients listed in the **Supplementary Table S1**. Circles: $CD16^+$; squares: $CD16^-$.

Supplementary Table S1

#	Sample	Age	Sex	Cause of surgery
1	Tonsil	4y 4m	M	Chronic snoring
2	Tonsil	4y 6m	F	Apnea
3	Tonsil	5y 6m	M	Apnea
4	Adenoid	7y 3m	F	Chronic snoring
5	Adenoid	3y 4m	M	N/A
6	Tonsil	5y 4m	F	Chronic snoring
7	Tonsil	5y 9m	M	Chronic snoring and apnea
8	Tonsil	4y 2m	F	PFAPA syndrome
9	Tonsil	5y 7m	M	Chronic snoring
10	Tonsil	6y 10m	M	N/A
11	Adenoid	9y 10m	M	Adenoid hypertrophy
12	Tonsil	4y 9m	F	OSAHS
13	Tonsil	2y 6m	M	OSAS
14	Tonsil	4y 10m	F	Chronic snoring
15	Adenoid	2y 11m	M	Chronic snoring
16	Tonsil	2y 6m	M	OSAHS
17	Tonsil	3y 9m	F	Chronic snoring
18	Tonsil	10y 5m	M	Chronic snoring
19	Tonsil	5y 9m	M	Chronic snoring
20	Adenoid	5y 6m	F	Chronic snoring
21	Tonsil	4y 3m	F	Perforating wound and foreign body
22	Adenoid	5y 3m	F	Unspecified acute tonsillitis
23	Adenoid	3y 7m	M	N/A
24	Tonsil	5y 8m	M	Apnea
25	Tonsil	5y 8m	M	Chronic snoring and apnea
26	Tonsil	10y 1m	M	Chronic snoring and recurrent tonsillitis
27	Tonsil	2y 5m	M	N/A
28	Tonsil	10y	M	OSAS and recurrent tonsillitis
29	Tonsil	6y 4m	M	Chronic snoring and apnea
30	Tonsil	7y 12m	M	Chronic snoring and apnea
31	Tonsil	4y 3m	M	Recurrent tonsillitis
32	Tonsil	9y 5m	M	Chronic snoring and apnea
33	Tonsil	2y 9m	M	Apnea
34	Tonsil	2y 4m	M	Apnea
35	Tonsil	5y 9m	M	N/A
36	Tonsil	12y 11m	F	Recurrent acute tonsillitis
37	Tonsil	4y 2m	M	Apnea
38	Tonsil	5y 8m	M	Chronic snoring
39	Tonsil	6y 10m	M	OSAS

40	Tonsil	9y 5m	M	OSAHS
41	Tonsil	4y 9m	M	N/A
42	Tonsil	4y 4m	F	N/A
43	Tonsil	16y 8m	M	OSAHS
44	Tonsil	10y 3m	M	Recurrent tonsillitis
45	Tonsil	15y	M	Peritonsillar abscess
46	Tonsil	3y 5m	F	OSAS
47	Tonsil	5y 5m	M	OSAS
48	Tonsil	9y 12m	M	OSAS
49	Adenoid	5y 8m	M	Apnea
50	Tonsil	3y 9m	M	N/A
51	Tonsil	4y 8m	M	Chronic snoring
52	Tonsil	4y 9m	F	OSAS
53	Tonsil	8y 10m	M	Chronic snoring and apnea
54	Tonsil	7y 8m	M	Chronic bilateral otorrea
55	Tonsil	3y 7m	M	Chronic snoring
56	Tonsil	5y 5m	M	Chronic snoring
57	Tonsil	7y 4m	F	Chronic snoring
58	Tonsil	3y 9m	M	Chronic snoring and apnea
59	Tonsil	4y 3m	M	Chronic snoring
60	Tonsil	4y 10m	M	Chronic snoring and apnea
61	Tonsil	6y 8m	M	Chronic snoring and apnea
62	Tonsil	4y 2m	M	N/A
63	Tonsil	5y 11m	M	Chronic snoring
64	Tonsil	4y 10m	F	Chronic snoring and apnea
65	Tonsil	2y 11m	M	Chronic snoring
66	Tonsil	8y 5m	M	Chronic snoring
67	Tonsil	2y 3m	M	Chronic snoring and apnea
68	Tonsil	14y 7m	M	OSAS

Table S1. Donor characteristics of human lymphoid tissue samples.
y: year; m: month; M: male; F: female; OSAS: Obstructive Sleep Apnea Syndrome; OSAHS: Obstructive Sleep Apnea-Hypopnea Syndrome; PFAPA: Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, and Adenitis; N/A: not available.

IV. DISCUSSIÓ

IV. DISCUSSIÓ

Malgrat els avenços significatius que ha suposat la teràpia antiretroviral combinada en frenar la infecció crònica per VIH-1 i millorar la qualitat de vida de les persones afectades, aquesta infecció continua sent incurable. Una de les raons principals és que la infecció crònica s'associa amb diverses alteracions del sistema immunitari, incloent-hi l'esgotament funcional de cèl·lules com les T CD8$^+$ i les NK, cosa que dificulta l'eliminació completa de les cèl·lules latentment infectades, fins i tot en el cas que es desenvolupés una estratègia de reversió de la latència totalment eficaç. Per aquest motiu, en el **TREBALL 1** s'ha posat l'accent en identificar el paper de les cèl·lules NK KLRG1$^+$ en la infecció per VIH-1, amb l'objectiu de restaurar-les a un estat de màxima funcionalitat.

Un altre obstacle important en la cura del VIH és l'existència de reservoris anatòmics: teixits on el VIH persisteix en cèl·lules latentment infectades i on també es produeix una replicació contínua a baix nivell, la qual és difícilment accessible tant per als antiretrovirals com per a les cèl·lules citotòxiques del sistema immunitari. Per aquesta raó, en el **TREBALL 2** s'han identificat les principals poblacions de cèl·lules NK residents en teixit limfàtic i el seu paper en l'eliminació de la infecció del teixit per VIH-1. La seva importància radica en el fet que prèviament s'ha demostrat que les cèl·lules NK residents en teixit podrien posseir memòria immunològica contra infeccions virals.

- **El receptor KLRG1 en les cèl·lules NK i CD4$^+$ com a potencial diana terapèutica en la infecció per VIH-1**

La infecció per VIH-1 crònica s'associa amb una activació immunològica elevada i una resposta antiviral debilitada[43,294,403]. En les cèl·lules citotòxiques clau de la immunitat adaptativa, els limfòcits T CD8$^+$, s'ha observat una sobreexpressió de punts de control immunològic, com ara PD-1[404], LAG-3[405] i TIGIT[406], que indiquen el seu esgotament funcional. Atès que la TAR no aconsegueix normalitzar els nivells d'expressió d'ICs[153,406], s'ha explorat l´ús d'anticossos monoclonals bloquejants per a restaurar la funció d'aquestes cèl·lules[153,337,406]. De manera similar, la infecció per VIH també condueix a l'esgotament funcional de les cèl·lules NK[229,373] i la TAR tampoc restaura completament la seva funcionalitat[154]. Per això, diversos estudis donen suport a l'ús d'anticossos bloquejants d'ICs per a recuperar la funcionalitat de les cèl·lules NK[229,271].

A més de la sobreexpressió de receptors inhibidors, les cèl·lules NK en la infecció crònica per VIH-1 també es veuen afectades per l'esgotament funcional dels limfòcits T CD4$^+$, fet

que contribueix indirectament al seu malfuncionament[272]. Els limfòcits T CD4⁺ VIH-específics produeixen citocines essencials per a les cèl·lules NK, com la IL-2, i el bloqueig de PD-1 i IL-10 en les cèl·lules T CD4⁺ permet recuperar la seva funció estimuladora[272].

A banda de la regulació dels punts de control immunològic en cèl·lules citotòxiques, cal destacar les alteracions que el VIH-1 pot causar en els lligands d'aquests punts de control. Un exemple és l'E-cadherina, que en condicions normals forma interaccions homodimèriques entre cèl·lules epitelials[282]. Només quan l'E-cadherina queda lliure en forma monomèrica el receptor KLRG1 s'hi pot unir[284]. Cal destacar que els monòcits CD14⁺ tenen una elevada expressió d'E-cadherina, i en persones virèmiques, el patró d'expressió d'E-cadherina en colon està alterat, fet que s'associa a un increment d'E-cadherina soluble en plasma[287]. Així, en aquestes condicions, el KLRG1 podria unir-se tant en sang com a l'intestí. La infecció crònica per VIH-1 augmenta l'expressió de KLRG1 en limfòcits T CD8⁺[337], i en presència d'E-cadherina soluble, la seva funció antiviral específica es veu reduïda[287]. Un fenomen similar es podria observar en les cèl·lules NK KLRG1⁺, ja que en altres infeccions cròniques com l'HCV, l'expansió de cèl·lules NK KLRG1⁺ amb funció reduïda ha estat documentada[291].

En el **TREBALL 1** hem demostrat que les cèl·lules NK en sang de persones amb infecció per VIH, tant virèmiques com tractades amb TAR, presenten una expressió elevada de KLRG1 a la superfície. A més, la correlació entre la càrrega viral plasmàtica i la freqüència de cèl·lules NK KLRG1⁺ en sang suggereix una relació entre la infecció crònica i l'expressió de KLRG1, ja que nivells elevats de càrrega viral, típics de la infecció aguda, s'associen amb menys KLRG1. En canvi, en persones amb càrrega viral suprimida, l'expressió de KLRG1 en les cèl·lules NK està directament relacionada amb les cèl·lules T CD4⁺ amb transcripció viral activa.

També s'ha detectat la presència de cèl·lules NK KLRG1⁺ en els ganglis limfàtics de PVV, però no de persones sanes. Tant pacients amb TAR com en virèmics s'han observat cèl·lules NK KLRG1⁺ en la zona T dels ganglis limfàtics, però només en virèmics s'han trobat també en la zona B, on es localitzen les cèl·lules T *helper* fol·liculars. La sobreexpressió de KLRG1 en cèl·lules NK dels ganglis limfàtics en el context de la infecció per VIH també s'ha observat en ratolins humanitzats tres setmanes després de la infecció, juntament amb altres punts de control immunològic com TIGIT i PD-1[407].

Una anàlisi fenotípica detallada de les cèl·lules NK que expressen KLRG1 ha revelat que la infecció per VIH-1 expandeix poblacions KLRG1⁺ terminalment diferenciades

($KIR^+CD57^+NKG2A^-$) amb característiques de memòria ($NKG2C^+$), i que la TAR no disminueix aquesta població. En consonància amb això, Jost. *et al*. van observar que les cèl·lules NK específiques contra el VIH tenen una expressió incrementada de KLRG1 i el receptor de homing a l'intestí $\alpha4\beta7$[195]. Com que aquesta és una població potencialment citotòxica, però amb una funció continguda per l'expressió de KLRG1, es va investigar l'efecte del bloqueig de KLRG1 sobre la seva funció general i específica contra el VIH-1. Les cèl·lules NK de persones amb càrrega viral suprimida per la TAR, tant $KLRG1^+$ com $KLRG1^-$, eren capaces de degranular i produir IFN-γ enfront de les cèl·lules diana K562, tot i que la resposta de les $KLRG1^+$ era inferior. Aquests resultats indicaven que les cèl·lules NK $KLRG1^+$ podrien tenir una funció alterada, per la qual cosa es va estudiar l'efecte del bloqueig de KLRG1 amb anticossos monoclonals. Es va demostrar que el bloqueig de KLRG1 millora tant la citotoxicitat natural com l'ADCC, afavorint l'eliminació de cèl·lules T $CD4^+$ autòlogues, tant infectades *ex vivo* com amb VIH reactivat.

És important destacar que aquest efecte va ser observat en un sistema de cocultiu aïllat de cèl·lules NK contra T $CD4^+$ autòlogues, on les cèl·lules T $CD4^+$ expressen nivells molt baixos d'E-cadherina, tot i que es va detectar un lleuger enriquiment en les cèl·lules infectades $p24^+$. A més, aproximadament un 5% de les cèl·lules NK en sang expressen E-cadherina[291]. Per tant, la millora en la funció de les cèl·lules NK pel bloqueig del KLRG1 podria deure's, en part, a l'inhibició de la interacció amb el lligand E-cadherina, però no de manera exclusiva. Això queda demostrat pel fet que un anticòs anti-E-cadherina va mostrar una tendència favorable a augmentar l'eliminació de cèl·lules infectades. Una altra possibilitat és que les cèl·lules NK $KLRG1^+$ de persones amb VIH-1 tinguessin adherides molècules d'E-cadherina soluble que l'anticòs anti-KLRG1 podria desplaçar del receptor. Una darrera explicació podria ser una activació inespecífica directa a través de l'anticòs anti-KLRG1; però a l'estudi de Wang *et al*. es va descartar que l'anticòs anti-KLRG1 exercís els seus efectes per una senyalització positiva directa en lloc de bloquejar la senyalització negativa[291]. Tot i això, cal esmentar que el clon de l'anticòs d'anti-KLRG1 utilitzat en aquest treball era diferent. En qualsevol cas, vam poder demostrar que l'efecte era específic en les cèl·lules NK $KLRG1^+$ purificades, i a més, les cèl·lules NK només tractades amb l'anticòs anti-KLRG1 no van mostrar un increment en la producció de CD107a ni IFN-γ. D'altra banda, s'ha descobert que la senyalització del receptor KLRG1 es desencadena per la dimerització amb ponts disulfur de molècules KLRG1 a la membrana cel·lular[408]. El receptor de la transferrina és capaç d'acoblar-se i evitar l'homodimerització de KLRG1[409], fet que suggereix que un anticòs anti-KLRG1 podria tenir una funció no neutralitzant similar.

En la primera part del **TREBALL 1** es va demostrar el potencial d'un anticòs anti-KLRG1 per millorar la fase de *"kill"* en una estratègia de cura funcional. Com que la literatura prèvia ha descrit que el bloqueig de diversos punts de control immunològic pot reactivar el VIH integrat[150], també es va investigar la relació entre el KLRG1 i les cèl·lules latentment infectades.

En PVV amb TAR, l'expressió de KLRG1 en els limfòcits T CD4$^+$ correlacionava directament amb els nivells intracel·lulars d'ARN viral. Tot i així, l'ADN viral total contingut en els limfòcits T CD4$^+$ KLRG1$^+$ era similar al de les KLRG1$^-$, mentre que en ganglis limfàtics, l'expressió de KLRG1 s'associava amb cèl·lules que presentaven producció activa del virus. És important destacar que s'ha descrit que les cèl·lules T CD4$^+$ dels ganglis limfàtics que mostren una expansió clonal amb provirus intactes estan enriquides en l'expressió de KLRG1[85], probablement perquè el KLRG1 s'ha relacionat amb la diferenciació terminal i la senescència cel·lular[410]. En el **TREBALL 1**, el bloqueig de KLRG1 amb anticossos anti-KLRG1 va promoure la reactivació viral, ja que va augmentar el nombre de còpies d'ARN viral. Aquest fet concorda amb el que s'ha descrit anteriorment, on només el bloqueig combinat de PD-1, CTLA-4, TIM-3 i TIGIT s'ha mostrat més efectiu per revertir la latència que altres LRA, com el vorinostat o la briostatina, quan s'utilitzen aïlladament[150].

La transducció del senyal per KLRG1 implica la via de *l'adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK)*. Müller-Durovic *et al*. van trobar que el KLRG1 s'internaliza després de lligar-se amb un anticòs anti-KLRG1 agonista i s'uneix directament a l'AMPK per prevenir la seva fosforilació inhibidora per les fosfatases 2C (PP2C)[280]. Teòricament, la internalització del KLRG1 no podria ocórrer quan s'uneix a l'E-cadherina a la superfície d'altres cèl·lules, sinó que només podria internalitzar-se quan s'uneix a l'E-cadherina soluble. Així, l'E-cadherina soluble en persones virèmiques podria afavorir la transcripció viral i augmentar la càrrega viral. Cal esmentar que en la literatura ja s'ha plantejat la hipòtesi que l'activació d'AMPK podria conduir a la reactivació del VIH-1 latent a causa de l'activació cel·lular[411]. A més, en els limfòcits T CD4$^+$ de persones amb infecció per HCV, Shi *et al*. van trobar que el bloqueig del KLRG1 incrementava la fosforilació d'Akt, comportant la inhibició de repressors del cicle cel·lular a causa d'una minvada activitat de Foxo1[412]. En conseqüència, es promou la progressió del cicle cel·lular en els limfòcits T CD4$^+$ i la proliferació[413]. A més, Roux *et al*. van demostrar que la inhibició *in vitro* de Foxo1 feia que els limfòcits T CD4$^+$ en repòs es tornessin permissius a la infecció per VIH-1 i indueix la reactivació de cèl·lules latentment infectades[414].

En conclusió, s'ha demostrat que el bloqueig del KLRG1 amb anticossos monoclonals podria tenir un efecte tant sobre la fase de "*shock*" com la de "*kill*" en una estratègia de cura funcional. En aquest sentit, la companyia Abcuro, Inc. (Newton, USA) està actualment desenvolupant anticossos anti-KLRG1. En la seva cartera de fàrmacs en estudi, han dissenyat un anti-KLRG1 bloquejant per al tractament de múltiples tumors sòlids (programa preclínic ABC-015) i podria ser d'utilitat per la cura funcional del VIH-1. A més, han desenvolupat un altre anticòs anti-KLRG1 que depleciona les cèl·lules KLRG1$^+$ amb la finalitat de tractar malalties autoimmunes (programa preclínic ABC-008), però també podria ser d'utilitat per a reduir el reservori viral de VIH-1.

- **Paper de les cèl·lules NK residents en amígdala en el control de la infecció per VIH-1**

A causa de l'elevada replicació viral en els reservoris anatòmics, és crucial investigar la resposta antiviral de les cèl·lules NK ja residents en el teixit, ja que serien de les primeres cèl·lules NK en enfrontar-se al VIH de manera local. Aquestes cèl·lules NK ofereixen una resposta contundent contra reinfeccions[112,221,222,381] i mostren característiques de memòria en persones vacunades[221,222]. Concretament, s'ha descrit aquesta funció de memòria en les cèl·lules NK CD16$^-$CD49a$^+$ residents, i sovint s'associa a l'expressió de KIRs i NKG2C, independent de l'estat serològic per a HCMV[220]. Això planteja la possibilitat que la infecció per VIH també indueixi memòria en aquestes cèl·lules NK residents, la qual cosa les fa candidates per estratègies vacunals contra el VIH.

En la infecció per VIH, s'ha observat que en ratolins humanitzats BLT vacunats amb cèl·lules dendrítiques singèniques carregades amb la proteïna d'envolta Env del VIH, les cèl·lules NK residents al fetge eliminen específicament les cèl·lules diana amb els pèptids vacunals 14 dies després de la vacunació[221]. De manera similar, en models d'infecció amb $SHIV_{SF162P3}$ i SIV_{mac251} en primats no humans, s'ha detectat l'expansió de les cèl·lules NK residents al fetge[351], que llisen específicament les cèl·lules dendrítiques autòlogues que han capturat pèptids Env i Gag[415]. Aquest efecte també s'ha observat en macacos vacunats amb Ad26, on les cèl·lules NK residents al fetge llisen les cèl·lules diana amb antígens coincidents fins a 5 anys després de la vacunació[415]. En aquest cas, el bloqueig amb anticossos monoclonals va demostrar que la citotoxicitat específica estava mediada pels receptors NKG2A i NKG2C[415]. A més, la infecció per SIV en micos verds africans va confirmar l'expansió de cèl·lules NK NKG2A^{low} en òrgans limfàtics secundaris, les quals responen específicament a pèptids SIV Env presentats per HLA-E[264]. Recentment, s'ha confirmat que les cèl·lules NK

humanes específiques d'antigen de la sang utilitzen l'eix NKG2C-HLA-E per eliminar cèl·lules infectades pels virus del VIH i la grip[195].

És important destacar que, tot i que els models animals ofereixen una comprensió detallada de la dinàmica de les cèl·lules ILCs i NK en diferents teixits i les seves respostes davant diverses patologies, poden existir diferències significatives entre espècies que limiten la seva aplicabilitat directa als humans. Com a alternativa als models animals, els cultius d'explants de teixit humà s'han convertit en una eina valuosa. En el **TREBALL 2**, s'ha utilitzat aquest model amb reseccions d'amígdales humanes, un teixit limfàtic secundari, per explorar la funcionalitat de les cèl·lules NK. Es va dur a terme una caracterització fenotípica i funcional d'aquestes cèl·lules, observant-se diferències importants entre les subpoblacions de cèl·lules NK $CD16^+$ i $CD16^-$, tot i que ambdues subpoblacions $CD69^+$ coexpressen CD49a i/o CD103.

Per exemple, les cèl·lules NK $CD16^-$ SP mostren una expressió basal elevada del marcador de degranulació CD107a en comparació amb les seves equivalents $CD16^+$ SP. A més, les cèl·lules NK $CD16^-CD49a^+$ degranulen ($CD107a^+$) i produeixen IFN-γ de manera més eficient que les $CD16^+$ quan es cocultiven amb cèl·lules diana K562. La presència de receptors KIRs en les $CD16^-$, especialment en les $CD49a^+$, identifica cèl·lules que produeixen grans quantitats d'IFN-γ. Encara que tant les cèl·lules NK $CD16^-$ DP com les TP produeixen nivells similars d'IFN-γ, difereixen en l'expressió de receptors clau. Cal destacar que les cèl·lules NK $CD103^+$ ($CD49a^{+/-}$) de les amígdales són majoritàriament $NKp44^+$, una població prèviament identificada com a *intraepithelial-like* ILC1s, amb una elevada capacitat citotòxica i proinflamatòria quan s'estimulen amb IL-12 i IL-15[170].

D'altra banda, una possible explicació per a la resposta diferencial entre les cèl·lules $CD16^+$ i $CD16^-$ podria estar relacionada amb l'expressió predominant dels receptors inhibidors NKG2A i TIGIT en les cèl·lules NK $CD16^+$. En canvi, les cèl·lules NK $CD16^-$ presenten un patró d'expressió del NKG2A que varia en funció de l'expressió dels receptors de residència analitzats, amb les $CD16^-$ SP mostrant nivells més baixos d'aquest receptor. Per contra, l'expressió del receptor inhibidor de col·lagen LAIR-1 és abundant en les cèl·lules NK SP. Aquesta inversió en l'expressió dels receptors NKG2A i LAIR-1 podria reflectir els diferents rols funcionals de les cèl·lules NK residents segons la seva localització tissular.

Degut a la naturalesa tissular d'aquestes cèl·lules NK i a la seva expressió de receptors de col·lagen com el LAIR-1 i CD49a, s'ha investigat la possible implicació dels col·làgens I i IV en la funcionalitat de les cèl·lules NK residents a les amígdales. La literatura prèvia ha descrit

que els limfòcits CD49a$^+$ mostren una gran mobilitat a través de les fibres de col·lagen, mentre que les cèl·lules CD103$^+$ es mantenen retingudes en presència d'E-cadherina[253]. En el **TREBALL 2**, s'ha confirmat que les cèl·lules NK CD16$^-$CD49a$^+$ s'adapten a l'arquitectura tissular, ja que els andamis de col·lagen potencien la seva polifuncionalitat, probablement gràcies a una major migració i un major nombre de contactes amb cèl·lules diana. El CD49a, un receptor amb alta afinitat pel col·lagen IV, que recobreix l'endoteli i l'epiteli, facilita la migració de les cèl·lules NK en aquests espais[389,416]. Les cèl·lules NK CD16$^-$CD49a$^+$ són conegudes per la seva hiperproducció d'IFN-γ en diversos teixits i patologies[217,220], tot i que mostren una funció citotòxica reduïda[197,218,253]. No obstant això, poden adquirir una funció citotòxica en resposta a l'estimulació amb la citocina IL-15[218], la producció de la qual augmenta durant les infeccions actives de teixit[417]. De fet, entre les múltiples funcions de la citocina pliotròpica IFN-γ, s'inclou l'activació de cèl·lules dendrítiques[396] i epitelials mitjançant IRF1[395], que pot induir la producció d'IL-15 i establir una retroalimentació positiva. Això suggereix que la producció d'IFN-γ podria servir com a senyal d'alerta per a infeccions emergents, i que, si la infecció es cronifica, les cèl·lules NK residents podrien desenvolupar una major capacitat citotòxica[378]. A més, l'IFN-γ autocrí augmenta directament la citotoxicitat i motilitat[379], i pot exercir una citotoxicitat directa contra cèl·lules tumorals que expressen el receptor d'IFN-γ (IFN-γR)[418]. Malauradament, en el cas del VIH, les cèl·lules infectades són les T CD4$^+$, que expressen naturalment IFN-γR, facilitant la seva activació i diferenciació en Th1[419].

La hipòtesi inicial plantejava que les cèl·lules NK CD16$^-$CD49a$^+$KIRs$^+$NKG2C$^+$ podrien jugar un paper crucial en la resposta contra la infecció hiperaguda per VIH-1 en el teixit limfàtic. A més de mostrar una gran polifuncionalitat i adaptabilitat a la migració tissular, hem observat que aquestes cèl·lules presenten l'expressió més alta de CXCR5. El CXCR5 és un receptor clau per a la migració cap als fol·licles B, on es localitzen els limfòcits Tfh que repliquen el VIH-1 profusament[91,92]. En concordança, Massoni-Badosa *et al*. van trobar que els fol·licles B estan delimitats per limfòcits CD49a$^+$[259]. No obstant això, cal destacar que les cèl·lules CD49a$^+$ es localitzen principalment a la perifèria dels fol·licles B, i no dins dels centres germinals, on es troben principalment les cèl·lules Tfh. A més, els fol·licles B estan envoltats per una capa densa de col·lagen[92], la qual podria limitar la penetració de les cèl·lules NK CD49a$^+$ en aquestes zones.

Gràcies al model d'infecció *ex vivo* en amígdales, s'ha pogut establir una connexió entre les diverses subpoblacions de cèl·lules NK residents i la replicació viral en el teixit limfàtic. Encara que no es van observar canvis significatius en les freqüències generals de les

cèl·lules NK CD16$^{+/-}$ a nivell poblacional, es va detectar un augment en l'expressió de KIRs en les cèl·lules NK CD16^{+} DP. A més, es va observar una expansió de les ieILC1s cinc dies després de la infecció *ex vivo*. Aquesta expansió podria suggerir que la resposta global en els explants afavoreix la secreció de citocines com la IL-12, IL-15 i TGF-β, les quals són determinants en l'expressió de CD49a i CD103 i en la generació de les ieILC1s[170,398,420].

Pel que fa a la funcionalitat de les cèl·lules NK en el model d'explants, es va observar una pèrdua completa en la producció d'IFN-γ per part de les cèl·lules NK estimulades. No obstant això, es mantenien les subpoblacions de cèl·lules NK residents que, en condicions fresques, esdevenien CD107a^{+} quan es cocultivaven amb les K562. Les cèl·lules NK CD16^{+} TP KIRs^{+} i/o NKG2C^{+} es correlacionaven amb una infecció reduïda *ex vivo*, mentre que l'expressió de punts de control immunològic en aquestes cèl·lules tenia un impacte negatiu. La repetició de l'assaig funcional amb cèl·lules NK exposades *ex vivo* al VIH-1 va revelar que la població general de cèl·lules NK CD16^{+}CD49a^{+} estava esgotada funcionalment. Aquests resultats són coherents amb els observats en ratolins humanitzats, on tres setmanes després de la infecció, les cèl·lules NK de diversos teixits com el fetge, la melsa i els ganglis limfàtics mostraven un augment en l'expressió de KLRG1, PD-1 i TIGIT[407]. En canvi, la població general de cèl·lules NK CD16^{-} SP va mostrar una activació amb la infecció *ex vivo*, mentre que les cèl·lules NK CD16^{-} SP KIRs^{+} van augmentar la seva capacitat màxima de degranulació alhora que disminuïen l'expressió de LAIR-1 i TIGIT. A més, una major abundància de cèl·lules NK CD16^{-} SP KIRs^{+} en els explants es correlacionava amb nivells més baixos d'infecció *ex vivo*, i la població total de cèl·lules NK SP presentava la màxima citotoxicitat contra cèl·lules T CD4^{+} autològues recentment infectades.

Donada la funcionalitat dual que promovia la infecció *ex vivo* per VIH, es va avaluar si aquesta infecció tenia implicacions directes en la capacitat d'eliminar cèl·lules infectades. Els assajos funcionals, que comparaven cèl·lules NK exposades i no exposades al VIH-1 en els explants, no van mostrar ni millores ni deterioraments significatius en l'eliminació de cèl·lules infectades. Malgrat que l'exposició al VIH en els explants originava alteracions específiques en diverses subpoblacions de cèl·lules NK residents, només es va poder estudiar la capacitat citotòxica global de les cèl·lules NK d'amígdala exposades al VIH, ja que el nombre de cèl·lules disponibles era tècnicament insuficient per realitzar assajos detallats d'eliminació de cèl·lules T CD4^{+} infectades autòlogues. Aquesta limitació destaca la necessitat d'emprar tècniques amb una resolució més alta per determinar la citotoxicitat específica de les diferents cèl·lules NK residents contra les cèl·lules T CD4^{+} infectades, com les tècniques de microfluídica que permeten analitzar l'efecte citotòxic individual de cada cèl·lula NK[421].

D'altra banda, les cèl·lules NK CD16^{-} CD103^{+}, que inclouen les ieILC1s, també es van associar amb el control de la infecció *ex vivo* dels explants, però van mostrar una baixa activitat anti-VIH directa. A més, el cocultiu prolongat de 5 dies en suspensió es va realitzar en presència d'IL-2, una citocina que promou la supervivència de les cèl·lules T CD4^{+} i NK *in vitro*. Tanmateix, l'IL-2 utilitzada per al manteniment podria haver estimulat les cèl·lules NK, ja que es coneix que aquesta citocina pot provocar una sobreexpressió de receptors d'activació[250], alterant així el comportament natural de les cèl·lules NK residents a les amígdales. A més, la presència de cèl·lules accessòries en els explants d'amígdala podria haver influït en la resposta de les ieILC1s, per exemple, a través de la producció d'IL-15[209,395], augmentant així la seva resposta davant la infecció.

Aquestes ieILC1s es localitzen principalment en els epitelis de les criptes i la superfície de les amígdales[170], un òrgan limfàtic secundari especialitzat amb una naturalesa mucosa i funció de barrera, atès que està exposat a la cavitat oral. En canvi, els ganglis limfàtics, que no presenten un epiteli protector, no contenen cèl·lules NKp44^{+}CD103^{+}[170]. La correlació observada entre les ieILC1s i una menor infecció en els explants podria ser atribuïda a la tècnica d'infecció *ex vivo*, en la qual el virus s'aplica directament sobre la superfície dels blocs d'amígdala. Això implica que una part de l'epiteli de les amígdales queda exposat directament al VIH-1, mentre que en una infecció sistèmica natural, el VIH-1 accedeix a través de les vènules d'endoteli alt i els vasos limfàtics[422]. Tot i que les amígdales estan exposades a l'exterior, la transmissió del VIH-1 per la orofaringe és molt poc freqüent en humans[423]. Quan es segella l'epiteli en estudis *ex vivo* amb explants d'amígdala, el VIH-1 pot infectar els limfòcits localitzats a l'epiteli, però no mostra signes de progressió més endins[424,425]. No obstant, en models de transmissió oral de SIV en macacs rhesus, sí que s'ha observat la infecció de limfòcits T CD4^{+} presents en l'epiteli de les criptes d'amígdala[426]. L'epiteli amigdalari, de naturalesa plana i estratificada[427], ofereix múltiples capes de barrera. Altres virus, com el virus del papil·loma humà (VPH), poden infectar directament l'epiteli de l'amígdala[428,429], i les ieILC1s han demostrat ser beneficioses contra el càncer oral promogut per VPH[210]. En el cas del VIH-1, les ieILC1s, presents també en la mucosa intestinal, podrien jugar un paper clau en combatre l'entrada del VIH a través d'aquesta via. L'epiteli rectal, a diferència de la mucosa amigdalària, és una monocapa columnar simple[430], i la infecció per via rectal està molt més freqüent[431].

Les discrepàncies entre la citotoxicitat observada *in vitro* i el comportament en el teixit també es van evidenciar en els experiments amb cocultius tridimensionals, que simulen la matriu intersticial dels teixits. En aquests models, la presència de col·lagen dens va impedir la

degranulació i la producció d'IFN-γ per part de les cèl·lules NK d'amígdala. Mentre que el col·lagen IV també va inhibir la mort de les cèl·lules K562, el col·lagen I no va mostrar aquest efecte. Aquesta inhibició funcional podria estar relacionada amb l'elevada expressió del receptor LAIR-1. No obstant això, les cèl·lules NK podrien seguir matant les K562 mitjançant mecanismes independents de la degranulació, com la mort cel·lular induïda pels lligands FasL o TRAIL. A més, mentre que el col·lagen I forma naturalment la matriu intersticial tridimensional, el col·lagen IV forma una barrera densa en dues dimensions a la membrana basal que recobreix epitelis i endotelis. En contrast, el col·lagen IV tridimensional es troba sovint en tumors[432,433], on pot dificultar la infiltració de limfòcits citotòxics. De manera similar, en el teixit limfàtic[94,275,344] i en l'intestí[102,103], s'ha observat que la infecció per VIH-1 provoca la deposició de col·lagen, la qual podria interferir amb l'acció de les cèl·lules NK. Així, és important considerar l'adaptació al microambient que podrien tenir les cèl·lules NK residents, més enllà de la seva capacitat citotòxica directa observada *in vitro*. Per exemple, s'ha demostrat que els limfòcits citotòxics poden migrar per la matriu intersticial perforant túnels[254], i l'alliberament focalitzat de granzima B facilita el travessament de la membrana basal[256].

Per tant, el model d'infecció en explants d'amígdala ha revelat els primers signes d'alteracions en les cèl·lules NK residents, però un període de només 5 dies podria ser insuficient per detectar canvis més profunds. Les cèl·lules NK presents de manera natural en el teixit limfàtic podrien no reaccionar amb prou rapidesa a la infecció per VIH-1, cosa que permetria l'establiment de la replicació viral. Les amígdales, a més, són reconegudes com a òrgan crucial per a la maduració i diferenciació de les cèl·lules NK[179,209]. Així doncs, tant les vacunes terapèutiques com les preventives haurien d'enfocar-se en garantir una infiltració sostinguda de cèl·lules NK madures i citotòxiques, ja sigui mitjançant el reclutament de cèl·lules NK des de la circulació cap al teixit limfàtic o potenciant la citotoxicitat de les cèl·lules NK ja presents en el teixit.

En aquesta direcció, l'estratègia més investigada és l'administració de la citocina IL-15, especialment en forma de complex superagonista amb el receptor transpresentador IL-15Rα. *In vitro*, aquest superagonista ha demostrat millorar el metabolisme energètic de les cèl·lules NK[266] i equipar-les amb molècules citotòxiques en diferents teixits[218,265]. Principalment, el complex superagonista IL-15/IL-15Rα aconsegueix rescatar la citotoxicitat de les cèl·lules NK contrarestant l'efecte immunosupressor del TGF-β[212]. També s'ha observat que la IL-15 administrada a ratolins humanitzats inhibeix l'infecció aguda per VIH-1[434]. A més, l'administració subcutània del superagonista d'IL-15 N-803 mobilitza cèl·lules

NK i T CD8$^+$ de la sang perifèrica cap als fol·licles B en macacos rhesus infectats amb SHIV sota tractament antiretroviral[258]. En la infecció natural per SIV en micos verds africans existeixen cèl·lules NK terminalment diferenciades amb baixa expressió d'NKG2A, que s'acumulen en els òrgans limfàtics secundaris i poden evadir la inhibició promoguda per l'HLA-E present en cèl·lules T CD4$^+$ infectades[264]. Donada la rellevància d'aquesta expansió de cèl·lules NK amb baixa expressió d'NKG2A, i el fet que precisament hem observat una elevada expressió d'NKG2A en les cèl·lules NK residents en teixit limfàtic, convindria dissenyar teràpies dirigides a bloquejar l'eix inhibidor NKG2A-HLA-E. En aquest sentit, s'han generat complexes que combinen un anticòs anti-NKG2A amb el superagonista d'IL-15, que ha demostrat augmentar la capacitat de les cèl·lules NK d'eliminar cèl·lules infectades per VIH-1 *in vitro*[157]. Actualment, el superagonista d'IL-15 N-803 es troba en investigació en diversos assaigs clínics, tant per al tractament de tumors (NCT01946789, NCT06239220, NCT04247282) com per avaluar els seus efectes en el reclutament de CTLs als fol·licles B (NCT04808908) i per combatre la persistència del VIH-1 en ganglis limfàtics durant la infecció aguda (NCT04505501).

Finalment, podem concloure que els punts de control immunològic apareixen en etapes específiques durant la infecció per VIH-1. En el **TREBALL 1**, es va observar que les cèl·lules NK KLRG1$^+$ només es trobaven en els ganglis limfàtics de persones amb infecció crònica per VIH. En el **TREBALL 2**, es va identificar que les cèl·lules NK CD16$^+$CD49a$^+$ ràpidament perden funcionalitat i sobreexpressen PD-1 5 dies després de la infecció. En contrast, els receptors inhibidors NKG2A, LAIR-1 i TIGIT es mantenen altament expressats de manera constitutiva en les cèl·lules NK residents al teixit limfàtic. Així, el bloqueig d'aquests receptors inhibidors podria esdevenir clau en una estratègia "*shock and kill*" mediada per cèl·lules NK i dirigida als reservoris anatòmics. A més, la inhibició de TGF-β[277,279,435,436] podria ajudar a reduir la immunosupressió general que es produeix en el teixit infectat, mentre que l'administració conjunta d'IL-15 seria fonamental per mobilitzar les cèl·lules NK cap als fol·licles B[258,267]. De fet, la IL-15 augmenta l'expressió del CD49a[208,397,398] i nosaltres hem observat que les cèl·lules NK CD49a$^+$KIRs$^+$NKG2C$^+$ mostren una alta expressió de CXCR5$^+$, indicant el seu potencial per combatre la infecció per VIH-1 en teixits limfàtics. A més, atès que aquestes cèl·lules poden adquirir memòria immunològica contra infeccions virals[112,221,222,381], la seva manipulació podria ser decisiva per blindar els fol·licles B de la infecció per VIH-1.

V. CONCLUSIONS

V. CONCLUSIONS

1. Les cèl·lules NK KLRG1^{+} estan enriquides en pacients amb VIH virèmics, i la teràpia antiretroviral (TAR) no restableix l'expressió de KLRG1 als nivells normals.
2. Les cèl·lules NK KLRG1^{+} es localitzen específicament en els ganglis limfàtics de les persones amb VIH, i només en individus amb virèmia es poden trobar presents dins els fol·licles B.
3. L'expressió de KLRG1 en cèl·lules NK de sang perifèrica correlaciona directament amb la transcripció activa del VIH en pacients amb TAR, essent un indicador de l'estat de la infecció crònica.
4. L'expressió de KLRG1 es troba especialment enriquida en cèl·lules NK diferenciades terminalment i de memòria (NKG2C^{+}).
5. Les cèl·lules NK KLRG1^{+} presenten una capacitat citotòxica i proinflamatòria reduïda en comparació amb les cèl·lules NK KLRG1^{-}.
6. El bloqueig de KLRG1 amb un anticòs monoclonal restaura la polifuncionalitat exclusivament en les cèl·lules NK KLRG1^{+}.
7. El bloqueig de KLRG1 augmenta l'eliminació per cèl·lules NK de cèl·lules T CD4^{+} infectades *ex vivo* i de cèl·lules latentment infectades amb VIH reactivat.
8. L'expressió de KLRG1 es troba enriquida en cèl·lules T CD4^{+} amb infecció productiva del VIH.
9. El bloqueig de KLRG1 incrementa la transcripció viral en cèl·lules T CD4^{+} infectades.
10. L'anticòs anti-KLRG1 té el potencial de funcionar com una eina dual en l'estratègia de "shock and kill".
11. Les cèl·lules NK residents en les amígdales humanes mostren una diversitat funcional influenciada per l'expressió de diferents marcadors de residència i punts de control immunològic.
12. Les cèl·lules NK CD16^{-}CD49a^{+}KIRs^{+} d'amígdala exhibeixen la màxima resposta polifuncional, amb una diversificació de funcions influenciada per la presència d'elements de la matriu extracel·lular.
13. El model d'infecció *ex vivo* en explants d'amígdales permet analitzar els canvis en les cèl·lules NK induïts per la infecció pel VIH.

14. L'elevada presència de cèl·lules NK $CD16^+$ TP $KIRs^+$/$NKG2C^+$, $CD16^-$ SP $KIRs^+$ i $CD16^-$ $CD103^+$ són factors predictius d'una replicació viral atenuada en un model d'explants d'amígdala.
15. Les cèl·lules NK SP presenten la màxima citotoxicitat dirigida contra limfòcits T $CD4^+$ infectats entre les diferents subpoblacions residents.
16. Les cèl·lules NK $CD103^+$ presenten una citotoxicitat directa disminuïda contra limfòcits T $CD4^+$ infectats, i la infecció *ex vivo* expandeix la fracció $CD16^-NKp44^+CD103^+$ (ieILC1s).
17. La infecció per VIH *ex vivo* provoca una ràpida expressió de KIRs en les cèl·lules $CD16^+CD49a^+$, tot i que es detecta una tendència al seu esgotament funcional.
18. La infecció per VIH *ex vivo* estimula moderadament la capacitat funcional de les cèl·lules NK $CD16^-$ SP $KIRs^+$.
19. L'exposició al VIH-1 en explants d'amígdales durant 5 dies no indueix canvis significatius en la capacitat de les cèl·lules NK residents d'eliminar directament cèl·lules T $CD4^+$ autòlogues infectades.

VI. LÍNIES DE FUTUR

VI. LÍNIES DE FUTUR

Els resultats obtinguts a partir d'aquests estudis han obert noves vies d'exploració. Atesa l'elevada expressió de TIGIT, NKG2A i LAIR-1 en les cèl·lules NK del teixit limfàtic, i tenint en consideració la idoneïtat dels anticossos anti-KLRG1 per a l'estratègia "*shock and kill*", podria ser beneficiós considerar una teràpia combinada que integri un superagonista d'IL-15 amb anticossos bloquejants d'aquests receptors inhibidors per desbloquejar el màxim potencial citotòxic de les cèl·lules NK residents. En aquest sentit, hem desenvolupat un anticòs humà biespecífic contra KLRG1 i TIGIT, el qual actualment es troba en fase d'estudi. Tot i la prometedora naturalesa d'aquesta teràpia combinada d'immunoteràpia, caldria avaluar amb detall les possibles reaccions adverses d'autoimmunitat, ja que la inhibició d'aquests receptors podria desregular la resposta immune inespecífica en cèl·lules NK no educades.

Donat que l'exposició al VIH en explants d'amígdala ha revelat efectes variats en la capacitat funcional de les cèl·lules NK residents, es continuarà investigant aquests efectes amb més profunditat. Seguint aquesta línia, s'està treballant en l'optimització de la tècnica experimental per mesurar l'eliminació dels limfòcits T $CD4^+$ infectats. D'altra banda, estem mesurant les citocines produïdes pels explants infectats que podrien influir en les cèl·lules NK residents. Per tal de detectar possibles canvis subtils que podrien ser inapreciables per citometria, hem generat dades de *single-cell RNA-seq* de les cèl·lules NK exposades al VIH en els explants, les quals actualment estem interpretant.

Paral·lelament, al laboratori també estem investigant les diverses poblacions de cèl·lules NK residents al còlon, un reservori principal i lloc d'entrada del VIH-1. Les cèl·lules NK $CD49a^+$ i $CD103^+$ podrien ser clau en la resposta inicial a la infecció per VIH-1, donat que es localitzen al llarg de l'epiteli i a nivell intraepitelial. No obstant això, el seu potencial citotòxic podria estar limitat. Per tant, serà essencial desenvolupar estratègies per generar cèl·lules NK residents de memòria contra el VIH-1, com les cèl·lules NK $CD49a^+KIRs^+NKG2C^+$, que podrien constituir la primera línia de defensa a la barrera epitelial intestinal.

VII. REFERÈNCIES

VII. REFERÈNCIES

1. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Immunodeficiency Virus-1. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304351/ (2012).

2. Marlink, R. *et al.* Reduced Rate of Disease Development After HIV-2 Infection as Compared to HIV-1. *Science* **265**, 1587–1590 (1994).

3. Hemelaar, J. *et al.* Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect. Dis.* **19**, 143–155 (2019).

4. Heuvel, Y. van, Schatz, S., Rosengarten, J. F. & Stitz, J. Infectious RNA: Human Immunodeficiency Virus (HIV) Biology, Therapeutic Intervention, and the Quest for a Vaccine. *Toxins* **14**, 138 (2022).

5. Dalgleish, A. G. *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763–767 (1984).

6. Deng, H. *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661–666 (1996).

7. Eckert, D. M. & Kim, P. S. Mechanisms of Viral Membrane Fusion and its Inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 777–810 (2001).

8. Bukrinsky, M. I. *et al.* Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 6580–6584 (1992).

9. Bushman, F. D., Fujiwara, T. & Craigie, R. Retroviral DNA Integration Directed by HIV Integration Protein in Vitro. *Science* **249**, 1555–1558 (1990).

10. Craigie, R. & Bushman, F. D. HIV DNA Integration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006890 (2012).

11. Lusic, M. & Siliciano, R. F. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 69–82 (2017).

12. Sengupta, S. & Siliciano, R. F. Targeting the Latent Reservoir for HIV-1. *Immunity* **48**, 872–895 (2018).

13. Mbonye, U. & Karn, J. The Molecular Basis for Human Immunodeficiency Virus Latency. *Annu. Rev. Virol.* **4**, 1–25 (2016).

14. Romani, B. & Allahbakhshi, E. Underlying mechanisms of HIV-1 latency. *Virus Genes* **53**, 329–339 (2017).

15. Cary, D. C., Fujinaga, K. & Peterlin, B. M. Molecular mechanisms of HIV latency. *J. Clin. Investig.* **126**, 448–454 (2016).

16. Pace, M. J. *et al.* Directly Infected Resting CD4+ T Cells Can Produce HIV Gag without Spreading Infection in a Model of HIV Latency. *PLoS Pathog.* **8**, e1002818 (2012).

17. O'Carroll, I. P., Soheilian, F., Kamata, A., Nagashima, K. & Rein, A. Elements in HIV-1 Gag contributing to virus particle assembly. *Virus Res.* **171**, 341–345 (2013).

18. Engelman, A. & Cherepanov, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 279–290 (2012).

19. Sued, O. & Grosso, T. M. Viral Infections and Antiviral Therapies. 339–376 (2023) doi:10.1016/b978-0-323-91814-5.00023-4.

20. Maartens, G., Celum, C. & Lewin, S. R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* **384**, 258–271 (2014).

21. McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N. & Haynes, B. F. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 11–23 (2010).

22. Kahn, J. O. & Walker, B. D. Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *N. Engl. J. Med.* **339**, 33–39 (1998).

23. JM, C., SH, H. & HE, V. *Course of Infection with HIV and SIV*. (1997).

24. Swinkels, H. M., Vaillant, A. A. J., Nguyen, A. D. & Gulick, P. G. *HIV and AIDS*. (2024).

25. An, P. & Winkler, C. A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet.* **26**, 119–131 (2010).

26. Nazli, A. *et al.* HIV-1 gp120 Induces TLR2- and TLR4-Mediated Innate Immune Activation in Human Female Genital Epithelium. *J. Immunol.* **191**, 4246–4258 (2013).

27. Hart, O. M., Athie-Morales, V., O'Connor, G. M. & Gardiner, C. M. TLR7/8-Mediated Activation of Human NK Cells Results in Accessory Cell-Dependent IFN-γ Production. *J. Immunol.* **175**, 1636–1642 (2005).

28. Schlaepfer, E., Audigé, A., Joller, H. & Speck, R. F. TLR7/8 Triggering Exerts Opposing Effects in Acute versus Latent HIV Infection. *J. Immunol.* **176**, 2888–2895 (2006).

29. Berg, R. K. *et al.* Genomic HIV RNA Induces Innate Immune Responses through RIG-I-Dependent Sensing of Secondary-Structured RNA. *PLoS ONE* **7**, e29291 (2012).

30. Jakobsen, M. R. *et al.* IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E4571–E4580 (2013).

31. Gao, D. *et al.* Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune Sensor of HIV and Other Retroviruses. *Science* **341**, 903–906 (2013).

32. Stacey, A. R. *et al.* Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections. *J. Virol.* **83**, 3719–3733 (2009).

33. Alter, G. *et al.* Evolution of Innate and Adaptive Effector Cell Functions during Acute HIV-1 Infection. *J. Infect. Dis.* **195**, 1452–1460 (2007).

34. Alter, G. *et al.* Single-Stranded RNA Derived from HIV-1 Serves as a Potent Activator of NK Cells. *J. Immunol.* **178**, 7658–7666 (2007).

35. Mitchell, J. L. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense HIV replication before detectable viremia following treatment interruption. *J. Clin. Investig.* **130**, 2845–2858 (2020).

36. Tomaras, G. D. *et al.* Initial B-Cell Responses to Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1: Virion-Binding Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies Followed by Plasma Anti-gp41 Antibodies with Ineffective Control of Initial Viremia. *J. Virol.* **82**, 12449–12463 (2008).

37. Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J. & Petropoulos, C. J. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4144–4149 (2003).

38. Kreer, C. *et al.* Probabilities of developing HIV-1 bNAb sequence features in uninfected and chronically infected individuals. *Nat. Commun.* **14**, 7137 (2023).

39. Hraber, P. *et al.* Prevalence of broadly neutralizing antibody responses during chronic HIV-1 infection. *AIDS* **28**, 163–169 (2014).

40. Govindaraj, S. *et al.* Editorial: CD4+ T cells in HIV: A Friend or a Foe? *Front. Immunol.* **14**, 1203531 (2023).

41. Demers, K. R. *et al.* Temporal Dynamics of CD8+ T Cell Effector Responses during Primary HIV Infection. *PLoS Pathog.* **12**, e1005805 (2016).

42. Larsson, M. *et al.* Molecular signatures of T-cell inhibition in HIV-1 infection. *Retrovirology* **10**, 31 (2013).

43. Fenwick, C. *et al.* T-cell exhaustion in HIV infection. *Immunol. Rev.* **292**, 149–163 (2019).

44. Fukazawa, Y. *et al.* B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat. Med.* **21**, 132–139 (2015).

45. Wang, Z., Shang, H. & Jiang, Y. Chemokines and Chemokine Receptors: Accomplices for Human Immunodeficiency Virus Infection and Latency. *Front. Immunol.* **8**, 1274 (2017).

46. Rancez, M., Couëdel-Courteille, A. & Cheynier, R. Chemokines at mucosal barriers and their impact on HIV infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* **23**, 233–243 (2012).

47. UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet. Preprint at https://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet (2024).

48. UNAIDS. HIV and AIDS - Basic facts. https://www.unaids.org/en/frequently-asked-questions-about-hiv-and-aids.

49. Panel de expertos de GeSIDA y de la División de Control de VIH, ITS, Hepatitis virales y Tuberculosis del Ministerio de Sanidad. Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Preprint at https://gesida-seimc.org/category/guias-clinicas/ (2023).

50. Ndashimye, E., Reyes, P. S. & Arts, E. J. New antiretroviral inhibitors and HIV-1 drug resistance: more focus on 90% HIV-1 isolates? *FEMS Microbiol. Rev.* **47**, fuac040 (2022).

51. Pool, M. P. More than 100 low- and middle-income countries have now received the WHO-recommended treatment for HIV thanks to access-oriented voluntary licensing agreements. https://medicinespatentpool.org/news-publications-post/more-than-100-low-and-middle-income-countries-have-now-received-the-who-recommended-treatment-for-hiv-thanks-to-access-oriented-voluntary-licensing-agreements (2022).

52. Coalition, G. H. P. Low-income countries such as Madagascar lack funds to fight Aids. https://hivpreventioncoalition.unaids.org/en/news/low-income-countries-such-madagascar-lack-funds-fight-aids (2024).

53. Streeck, H. *et al.* Dissecting drivers of immune activation in chronic HIV-1 infection. *eBioMedicine* **83**, 104182 (2022).

54. Hunt, P. W. HIV and Inflammation: Mechanisms and Consequences. *Curr. HIVAIDS Rep.* **9**, 139–147 (2012).

55. Watanabe, M. *et al.* Inflammatory and immune markers in HIV-infected older adults on long-term antiretroviral therapy: Persistent elevation of sCD14 and of proinflammatory effector memory T cells. *Aging Cell* **21**, e13681 (2022).

56. Hunt, P. W. *et al.* Relationship between T Cell Activation and CD4+ T Cell Count in HIV-Seropositive Individuals with Undetectable Plasma HIV RNA Levels in the Absence of Therapy. *J. Infect. Dis.* **197**, 126–133 (2008).

57. Bbosa, N., Kaleebu, P. & Ssemwanga, D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr. Opin. HIV AIDS* **14**, 153–160 (2019).

58. Segal-Maurer, S. *et al.* Capsid Inhibition with Lenacapavir in Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. *N. Engl. J. Med.* **386**, 1793–1803 (2022).

59. Perelson, A. S. *et al.* Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* **387**, 188–191 (1997).

60. Siliciano, J. D. *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat. Med.* **9**, 727–728 (2003).

61. Chomont, N. *et al.* HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* **15**, 893–900 (2009).

62. Simonetti, F. R. *et al.* Clonally expanded CD4+ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 1883–1888 (2016).

63. McMyn, N. F. *et al.* The latent reservoir of inducible, infectious HIV-1 does not decrease despite decades of antiretroviral therapy. *J. Clin. Investig.* **133**, e171554 (2023).

64. Chun, T.-W., Davey, R. T., Engel, D., Lane, H. C. & Fauci, A. S. Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature* **401**, 874–875 (1999).

65. Ananth, S. *et al.* Spatial resolution of HIV-1 post-entry steps in resting CD4 T cells. *Cell Rep.* **43**, 113941 (2024).

66. Dai, J. *et al.* Human Immunodeficiency Virus Integrates Directly into Naïve Resting CD4+ T Cells but Enters Naïve Cells Less Efficiently than Memory Cells. *J. Virol.* **83**, 4528–4537 (2009).

67. Tabler, C. O. *et al.* CD4+ Memory Stem Cells Are Infected by HIV-1 in a Manner Regulated in Part by SAMHD1 Expression. *J. Virol.* **88**, 4976–4986 (2014).

68. Shan, L. *et al.* Transcriptional Reprogramming during Effector-to-Memory Transition Renders CD4+ T Cells Permissive for Latent HIV-1 Infection. *Immunity* **47**, 766-775.e3 (2017).

69. Chavez, L., Calvanese, V. & Verdin, E. HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells. *PLoS Pathog.* **11**, e1004955 (2015).

70. Chen, J. *et al.* The reservoir of latent HIV. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 945956 (2022).

71. Ho, Y.-C. *et al.* Replication-Competent Noninduced Proviruses in the Latent Reservoir Increase Barrier to HIV-1 Cure. *Cell* **155**, 540–551 (2013).

72. Kwon, K. J. *et al.* Different human resting memory CD4+ T cell subsets show similar low inducibility of latent HIV-1 proviruses. *Sci. Transl. Med.* **12**, (2020).

73. Stein, J., Bonsmann, M. S. genannt & Streeck, H. Barriers to HIV Cure. *HLA* **88**, 155–163 (2016).

74. Descours, B. *et al.* CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature* **543**, 564–567 (2017).

75. Noto, A. *et al.* CD32+ and PD-1+ Lymph Node CD4 T Cells Support Persistent HIV-1 Transcription in Treated Aviremic Individuals. *J. Virol.* **92**, e00901-18 (2018).

76. Holgado, M. P., Sananez, I., Raiden, S., Geffner, J. R. & Arruvito, L. CD32 Ligation Promotes the Activation of CD4+ T Cells. *Front. Immunol.* **9**, 2814 (2018).

77. Astorga-Gamaza, A. *et al.* Identification of HIV-reservoir cells with reduced susceptibility to antibody-dependent immune response. *eLife* **11**, e78294 (2022).

78. Pérez, L. *et al.* Conflicting evidence for HIV enrichment in CD32+ CD4 T cells. *Nature* **561**, E9–E16 (2018).

79. Osuna, C. E. *et al.* Evidence that CD32a does not mark the HIV-1 latent reservoir. *Nature* **561**, E20–E28 (2018).

80. Bertagnolli, L. N. *et al.* The role of CD32 during HIV-1 infection. *Nature* **561**, E17–E19 (2018).

81. Abdel-Mohsen, M. *et al.* CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaar6759 (2018).

82. Darcis, G. *et al.* CD32+CD4+ T Cells Are Highly Enriched for HIV DNA and Can Support Transcriptional Latency. *Cell Rep.* **30**, 2284-2296.e3 (2020).

83. Quach, D. H. *et al.* Rejection resistant CD30.CAR-modified Epstein-Barr virus-specific T cells as an off-the-shelf platform for CD30+ lymphoma. *Mol. Ther.: Oncol.* **32**, 200814 (2024).

84. Hogan, L. E. *et al.* Increased HIV-1 transcriptional activity and infectious burden in peripheral blood and gut-associated CD4+ T cells expressing CD30. *PLoS Pathog.* **14**, e1006856 (2018).

85. Sun, W. *et al.* Phenotypic signatures of immune selection in HIV-1 reservoir cells. *Nature* **614**, 309–317 (2023).

86. Cao, S. & Woodrow, K. A. Nanotechnology approaches to eradicating HIV reservoirs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **138**, 48–63 (2019).

87. Fletcher, C. V. *et al.* Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 2307–2312 (2014).

88. Schwartz, C. *et al.* On the way to find a cure: Purging latent HIV-1 reservoirs. *Biochem. Pharmacol.* **146**, 10–22 (2017).

89. Chaillon, A. *et al.* HIV persists throughout deep tissues with repopulation from multiple anatomical sources. *J. Clin. Investig.* **130**, 1699–1712 (2020).

90. Farber, D. L., Yudanin, N. A. & Restifo, N. P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 24–35 (2014).

91. Petrovas, C. *et al.* Follicular CD8 T cells accumulate in HIV infection and can kill infected cells in vitro via bispecific antibodies. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaag2285 (2017).

92. Moysi, E. *et al.* In Situ Characterization of Human Lymphoid Tissue Immune Cells by Multispectral Confocal Imaging and Quantitative Image Analysis; Implications for HIV Reservoir Characterization. *Front. Immunol.* **12**, 683396 (2021).

93. Estes, J. D. *et al.* Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies. *Nat. Med.* **23**, 1271–1276 (2017).

94. Zeng, M. *et al.* Lymphoid Tissue Damage in HIV-1 Infection Depletes Naïve T Cells and Limits T Cell Reconstitution after Antiretroviral Therapy. *PLoS Pathog.* **8**, e1002437 (2012).

95. Bunting, M. D. *et al.* Extracellular matrix proteins regulate NK cell function in peripheral tissues. *Sci. Adv.* **8**, eabk3327 (2022).

96. Beck, S. E., Veenhuis, R. T. & Blankson, J. N. Does B Cell Follicle Exclusion of CD8+ T Cells Make Lymph Nodes Sanctuaries of HIV Replication? *Front. Immunol.* **10**, 2362 (2019).

97. Anton, P. A. *et al.* Enhanced levels of functional HIV-1 co-receptors on human mucosal T cells demonstrated using intestinal biopsy tissue. *AIDS* **14**, 1761–1765 (2000).

98. Veazey, R. S. *et al.* Dynamics of CCR5 Expression by CD4+ T Cells in Lymphoid Tissues during Simian Immunodeficiency Virus Infection. *J. Virol.* **74**, 11001–11007 (2000).

99. Mehandru, S. *et al.* Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract. *J. Exp. Med.* **200**, 761–770 (2004).

100. Asowata, O. E. *et al.* Irreversible depletion of intestinal CD4+ T-cells is associated with T-cell activation during chronic HIV infection. *JCI Insight* **6**, e146162 (2021).

101. Khoury, G. *et al.* Human Immunodeficiency Virus Persistence and T-Cell Activation in Blood, Rectal, and Lymph Node Tissue in Human Immunodeficiency Virus–Infected Individuals Receiving Suppressive Antiretroviral Therapy. *J. Infect. Dis.* **215**, 911–919 (2017).

102. Sips, M. *et al.* Altered distribution of mucosal NK cells during HIV infection. *Mucosal Immunol.* **5**, 30–40 (2012).

103. Estes, J. *et al.* Collagen Deposition Limits Immune Reconstitution in the Gut. *J. Infect. Dis.* **198**, 456–464 (2008).

104. Grivel, J.-C. & Margolis, L. Use of human tissue explants to study human infectious agents. *Nat. Protoc.* **4**, 256–269 (2009).

105. Audigé, A. *et al.* HIV-1 Does Not Provoke Alteration of Cytokine Gene Expression in Lymphoid Tissue after Acute Infection Ex Vivo. *J. Immunol.* **172**, 2687–2696 (2004).

106. Murakami, T. *et al.* Secondary lymphoid organ fibroblastic reticular cells mediate trans-infection of HIV-1 via CD44-hyaluronan interactions. *Nat. Commun.* **9**, 2436 (2018).

107. Reif, T. *et al.* Contact-dependent inhibition of HIV-1 replication in ex vivo human tonsil cultures by polymorphonuclear neutrophils. *Cell Rep. Med.* **2**, 100317 (2021).

108. Homann, S. *et al.* Determinants in HIV-1 Nef for enhancement of virus replication and depletion of CD4+ T lymphocytes in human lymphoid tissue ex vivo. *Retrovirology* **6**, 6 (2009).

109. Ackerley, C. G. *et al.* The rectal mucosal immune environment and HIV susceptibility among young men who have sex with men. *Front. Immunol.* **13**, 972170 (2022).

110. Abner, S. R. *et al.* A Human Colorectal Explant Culture to Evaluate Topical Microbicides for the Prevention of HIV Infection. *J. Infect. Dis.* **192**, 1545–1556 (2005).

111. Janocko, L., Althouse, A. D., Brand, R. M., Cranston, R. D. & McGowan, I. The Molecular Characterization of Intestinal Explant HIV Infection Using Polymerase Chain Reaction-Based Techniques. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **31**, 981–991 (2015).

112. Torcellan, T. *et al.* Circulating NK cells establish tissue residency upon acute infection of skin and mediate accelerated effector responses to secondary infection. *Immunity* **57**, 1–17 (2023).

113. Dadi, S. *et al.* Cancer Immunosurveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. *Cell* **164**, 365–377 (2016).

114. Eisele, E. & Siliciano, R. F. Redefining the Viral Reservoirs that Prevent HIV-1 Eradication. *Immunity* **37**, 377–388 (2012).

115. Hütter, G. *et al.* Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **360**, 692–698 (2009).

116. Allers, K. *et al.* Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation. *Blood* **117**, 2791–2799 (2011).

117. Sáez-Cirión, A. *et al.* Absence of viral rebound for 18 months without antiretrovirals after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with wild-type CCR5 donor cells to treat a biphenotypic sarcoma. in (IAS 2023 Conference).

118. Gaebler, C. *et al.* The next Berlin patient: sustained HIV remission surpassing five years without antiretroviral therapy after heterozygous CCR5 WT/Δ32 allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. in (AIDS Conference 2024).

119. Salgado, M., Migueles, S. A., Yu, X. G. & Martinez-Picado, J. Exceptional, naturally occurring HIV-1 control: Insight into a functional cure. *Med* **5**, 1071–1082 (2024).

120. Casado, C. *et al.* Permanent control of HIV-1 pathogenesis in exceptional elite controllers: a model of spontaneous cure. *Sci. Rep.* **10**, 1902 (2020).

121. Conway, J. M. & Perelson, A. S. Post-treatment control of HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 5467–5472 (2015).

122. Sáez-Cirión, A. *et al.* Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog.* **9**, e1003211 (2013).

123. Etemad, B. *et al.* HIV post-treatment controllers have distinct immunological and virological features. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **120**, e2218960120 (2023).

124. Climent, N. *et al.* Immunological and virological findings in a patient with exceptional post-treatment control: a case report. *Lancet HIV* **10**, e42–e51 (2023).

125. Gaebler, C. *et al.* Prolonged viral suppression with anti-HIV-1 antibody therapy. *Nature* **606**, 368–374 (2022).

126. Niessl, J. *et al.* Combination anti-HIV-1 antibody therapy is associated with increased virus-specific T cell immunity. *Nat. Med.* **26**, 222–227 (2020).

127. Blazkova, J. *et al.* Distinct mechanisms of long-term virologic control in two HIV-infected individuals after treatment interruption of anti-retroviral therapy. *Nat. Med.* **27**, 1893–1898 (2021).

128. Martinez-Navio, J. M. *et al.* Adeno-Associated Virus Delivery of Anti-HIV Monoclonal Antibodies Can Drive Long-Term Virologic Suppression. *Immunity* **50**, 567-575.e5 (2019).

129. Schiffner, T. *et al.* Vaccination induces broadly neutralizing antibody precursors to HIV gp41. *Nat. Immunol.* **25**, 1073–1082 (2024).

130. Williams, W. B. *et al.* Vaccine induction of heterologous HIV-1-neutralizing antibody B cell lineages in humans. *Cell* **187**, 2919-2934.e20 (2024).

131. Haynes, B. F. *et al.* Strategies for HIV-1 vaccines that induce broadly neutralizing antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* **23**, 142–158 (2023).

132. Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B. & Das, A. T. CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Res.* **244**, 321–332 (2018).

133. Peng, R., Lin, G. & Li, J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J.* **283**, 1218–1231 (2016).

134. Wang, Z. *et al.* CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Rep.* **15**, 481–489 (2016).

135. Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B. & Das, A. T. A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Cultures. *Cell Rep.* **17**, 2819–2826 (2016).

136. Yeh, Y.-H. J. & Ho, Y.-C. Shock-and-kill versus block-and-lock: Targeting the fluctuating and heterogeneous HIV-1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2103692118 (2021).

137. Mousseau, G., Mediouni, S. & Valente, S. T. The Future of HIV-1 Therapeutics, Resistance Is Futile? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **389**, 121–145 (2015).

138. Li, C., Mori, L. & Valente, S. T. The Block-and-Lock Strategy for Human Immunodeficiency Virus Cure: Lessons Learned from Didehydro–Cortistatin A. *J. Infect. Dis.* **223**, 46–53 (2021).

139. Coffin, J. & Swanstrom, R. HIV Pathogenesis: Dynamics and Genetics of Viral Populations and Infected Cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, a012526 (2013).

140. Kim, Y., Anderson, J. L. & Lewin, S. R. Getting the "Kill" into "Shock and Kill": Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell Host Microbe* **23**, 14–26 (2018).

141. Pardons, M., Fromentin, R., Pagliuzza, A., Routy, J.-P. & Chomont, N. Latency-Reversing Agents Induce Differential Responses in Distinct Memory CD4 T Cell Subsets in Individuals on Antiretroviral Therapy. *Cell Rep.* **29**, 2783-2795.e5 (2019).

142. Grau-Expósito, J. *et al.* Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4+ T subpopulations. *PLoS Pathog.* **15**, e1007991 (2019).

143. Matsuda, K. *et al.* A widely distributed HIV-1 provirus elimination assay to evaluate latency-reversing agents in vitro. *Cell Rep. Methods* **1**, 100122 (2021).

144. Wei, D. G. *et al.* Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin Induces HIV Expression in CD4 T Cells from Patients on Suppressive Antiretroviral Therapy at Concentrations Achieved by Clinical Dosing. *PLoS Pathog.* **10**, e1004071 (2014).

145. Archin, N. M. *et al.* HIV-1 Expression Within Resting CD4+ T Cells After Multiple Doses of Vorinostat. *J. Infect. Dis.* **210**, 728–735 (2014).

146. Rasmussen, T. A. *et al.* Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *Lancet HIV* **1**, e13–e21 (2014).

147. Rodari, A., Darcis, G. & Lint, C. M. V. The Current Status of Latency Reversing Agents for HIV-1 Remission. *Annu. Rev. Virol.* **8**, 491–514 (2021).

148. Kovochich, M., Marsden, M. D. & Zack, J. A. Activation of Latent HIV Using Drug-Loaded Nanoparticles. *PLoS ONE* **6**, e18270 (2011).

149. Arandjelovic, P. *et al.* Venetoclax, alone and in combination with the BH3 mimetic S63845, depletes HIV-1 latently infected cells and delays rebound in humanized mice. *Cell Rep. Med.* **4**, 101178 (2023).

150. Sluis, R. M. V. der *et al.* Combination Immune Checkpoint Blockade to Reverse HIV Latency. *J. Immunol.* **204**, 1242–1254 (2020).

151. Zicari, S. *et al.* Immune Activation, Inflammation, and Non-AIDS Co-Morbidities in HIV-Infected Patients under Long-Term ART. *Viruses* **11**, 200 (2019).

152. Merino, A. M. *et al.* Chronic stimulation drives human NK cell dysfunction and epigenetic reprograming. *J. Clin. Investig.* **129**, 3770–3785 (2019).

153. Alrubayyi, A. *et al.* Functional Restoration of Exhausted CD8 T Cells in Chronic HIV-1 Infection by Targeting Mitochondrial Dysfunction. *Front. Immunol.* **13**, 908697 (2022).

154. Nabatanzi, R., Cose, S., Joloba, M., Jones, S. R. & Nakanjako, D. Effects of HIV infection and ART on phenotype and function of circulating monocytes, natural killer, and innate lymphoid cells. *AIDS Res. Ther.* **15**, 7 (2018).

155. Miller, J. S. *et al.* Safety and Virologic Impact of Haploidentical NK Cells Plus Interleukin 2 or N-803 in HIV Infection. *J. Infect. Dis.* **229**, 1256–1265 (2024).

156. Kim, J. T. *et al.* Latency reversal plus natural killer cells diminish HIV reservoir in vivo. *Nat. Commun.* **13**, 121 (2022).

157. Schober, R. *et al.* Multimeric immunotherapeutic complexes activating natural killer cells towards HIV-1 cure. *J. Transl. Med.* **21**, 791 (2023).

158. Board, N. L. *et al.* Bispecific antibodies promote natural killer cell-mediated elimination of HIV-1 reservoir cells. *Nat. Immunol.* **25**, 462–470 (2024).

159. Leth, S. *et al.* Combined effect of Vacc-4x, recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor vaccination, and romidepsin on the HIV-1 reservoir (REDUC): a single-arm, phase 1B/2A trial. *Lancet HIV* **3**, e463–e472 (2016).

160. Lim, S.-Y. *et al.* TLR7 agonists induce transient viremia and reduce the viral reservoir in SIV-infected rhesus macaques on antiretroviral therapy. *Sci. Transl. Med.* **10**, (2018).

161. Akbari, E., Seyedinkhorasani, M. & Bolhassani, A. Conserved multiepitope vaccine constructs: A potent HIV-1 therapeutic vaccine in clinical trials. *Braz. J. Infect. Dis.* **27**, 102774 (2023).

162. Trkola, A. & Moore, P. L. Vaccinating people living with HIV: a fast track to preventive and therapeutic HIV vaccines. *Lancet Infect. Dis.* **24**, e252–e255 (2024).

163. Benson, D. M. & Caligiuri, M. A. Hematology (Seventh Edition). *Part III: Immunol. Basis Hematol.* 240-246.e3 (2018) doi:10.1016/b978-0-323-35762-3.00022-6.

164. Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H.-G. & Bryceson, Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* **115**, 2167–2176 (2010).

165. Lachota, M. *et al.* Mapping the chemotactic landscape in NK cells reveals subset-specific synergistic migratory responses to dual chemokine receptor ligation. *eBioMedicine* **96**, 104811 (2023).

166. Gasteiger, G., Fan, X., Dikiy, S., Lee, S. Y. & Rudensky, A. Y. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science* **350**, 981–985 (2015).

167. Yudanin, N. A. *et al.* Spatial and Temporal Mapping of Human Innate Lymphoid Cells Reveals Elements of Tissue Specificity. *Immunity* **50**, 505-519.e4 (2019).

168. Calvi, M. *et al.* Development of Human ILCs and Impact of Unconventional Cytotoxic Subsets in the Pathophysiology of Inflammatory Diseases and Cancer. *Front. Immunol.* **13**, 914266 (2022).

169. Simoni, Y. *et al.* Human Innate Lymphoid Cell Subsets Possess Tissue-Type Based Heterogeneity in Phenotype and Frequency. *Immunity* **46**, 148–161 (2017).

170. Fuchs, A. *et al.* Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN-γ-Producing Cells. *Immunity* **38**, 769–781 (2013).

171. Raykova, A. *et al.* Interleukins 12 and 15 induce cytotoxicity and early NK-cell differentiation in type 3 innate lymphoid cells. *Blood Adv.* **1**, 2679–2691 (2017).

172. Cella, M. *et al.* Subsets of ILC3−ILC1-like cells generate a diversity spectrum of innate lymphoid cells in human mucosal tissues. *Nat. Immunol.* **20**, 980–991 (2019).

173. Gao, Y. *et al.* Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* **18**, 1004–1015 (2017).

174. Cortez, V. S. *et al.* SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing non-canonical TGF-β signaling. *Nat. Immunol.* **18**, 995–1003 (2017).

175. Murphy, J. M., Ngai, L., Mortha, A. & Crome, S. Q. Tissue-Dependent Adaptations and Functions of Innate Lymphoid Cells. *Front. Immunol.* **13**, 836999 (2022).

176. Bal, S. M., Golebski, K. & Spits, H. Plasticity of innate lymphoid cell subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 552–565 (2020).

177. Lim, A. I. *et al.* Systemic Human ILC Precursors Provide a Substrate for Tissue ILC Differentiation. *Cell* **168**, 1086-1100.e10 (2017).

178. Vito, C. D., Mikulak, J. & Mavilio, D. On the Way to Become a Natural Killer Cell. *Front. Immunol.* **10**, 1812 (2019).

179. Hegewisch-Solloa, E., Nalin, A. P., Freud, A. G. & Mace, E. M. Deciphering the localization and trajectory of human natural killer cell development. *J. Leukoc. Biol.* **00**, 1–20 (2023).

180. Mace, E. M. *et al.* Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 245–255 (2014).

181. Stenger, T. D. & Miller, J. S. Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity. *Front. Immunol.* **15**, 1356666 (2024).

182. Prager, I. *et al.* NK cells switch from granzyme B to death receptor–mediated cytotoxicity during serial killing. *J. Exp. Med.* **216**, 2113–2127 (2019).

183. Ward, J. *et al.* HIV modulates the expression of ligands important in triggering natural killer cell cytotoxic responses on infected primary T-cell blasts. *Blood* **110**, 1207–1214 (2007).

184. Körner, C. *et al.* HIV-1-Mediated Downmodulation of HLA-C Impacts Target Cell Recognition and Antiviral Activity of NK Cells. *Cell Host Microbe* **22**, 111-119.e4 (2017).

185. Tremblay-McLean, A. *et al.* Expression Profiles of Ligands for Activating Natural Killer Cell Receptors on HIV Infected and Uninfected CD4+ T Cells. *Viruses* **9**, 295 (2017).

186. Vieillard, V., Strominger, J. L. & Debré, P. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: A gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 10981–10986 (2005).

187. Marras, F. *et al.* Natural killer cells in HIV controller patients express an activated effector phenotype and do not up-regulate NKp44 on IL-2 stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 11970–11975 (2013).

188. Solana, R., Campos, C., Pera, A. & Tarazona, R. Shaping of NK cell subsets by aging. *Curr. Opin. Immunol.* **29**, 56–61 (2014).

189. Flórez-Álvarez, L., Hernandez, J. C. & Zapata, W. NK Cells in HIV-1 Infection: From Basic Science to Vaccine Strategies. *Front. Immunol.* **9**, 2290 (2018).

190. Lopez-Vergès, S. *et al.* CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* **116**, 3865–3874 (2010).

191. Pal, M. *et al.* Tumor-priming converts NK cells to memory-like NK cells. *OncoImmunology* **6**, e1317411 (2017).

192. Hammer, Q. *et al.* Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. *Nat. Immunol.* **19**, 453–463 (2018).

193. Peppa, D. Natural Killer Cells in Human Immunodeficiency Virus-1 Infection: Spotlight on the Impact of Human Cytomegalovirus. *Front. Immunol.* **8**, 1322 (2017).

194. Hearps, A. C. *et al.* Adaptive NK Cells Rapidly Expand during Acute HIV Infection and Persist Despite Early Initiation of Antiretroviral Therapy. *J. Immunol.* **212**, 1553–1563 (2024).

195. Jost, S. *et al.* Antigen-specific memory NK cell responses against HIV and influenza use the NKG2/HLA-E axis. *Sci. Immunol.* **8**, eadi3974 (2023).

196. Dogra, P. *et al.* Tissue Determinants of Human NK Cell Development, Function, and Residence. *Cell* **180**, 749-763.e13 (2020).

197. Li, H. *et al.* CD49a regulates the function of human decidual natural killer cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **81**, e13101 (2019).

198. Vieira, R. de M. *et al.* Human Term Pregnancy Decidual NK Cells Generate Distinct Cytotoxic Responses. *J. Immunol.* **204**, 3149–3159 (2020).

199. Du, X. *et al.* Human-Induced CD49a+ NK Cells Promote Fetal Growth. *Front. Immunol.* **13**, 821542 (2022).

200. Crespo, A. C. *et al.* Decidual NK Cells Transfer Granulysin to Selectively Kill Bacteria in Trophoblasts. *Cell* **182**, 1125-1139.e18 (2020).

201. Björkström, N. K., Strunz, B. & Ljunggren, H.-G. Natural killer cells in antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 112–123 (2022).

202. Shiow, L. R. *et al.* CD69 acts downstream of interferon-α/β to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* **440**, 540–544 (2006).

203. Chen, H., Qin, Y., Chou, M., Cyster, J. G. & Li, X. Transmembrane protein CD69 acts as an S1PR1 agonist. *eLife* **12**, e88204 (2023).

204. Richter, M. *et al.* Collagen Distribution and Expression of Collagen-Binding α1β1 (VLA-1) and α2β1 (VLA-2) Integrins on CD4 and CD8 T Cells during Influenza Infection. *J. Immunol.* **178**, 4506–4516 (2007).

205. Cepek, K. L. *et al.* Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the αEβ7 integrin. *Nature* **372**, 190–193 (1994).

206. Woodberry, T. *et al.* αEβ7 (CD103) Expression Identifies a Highly Active, Tonsil-Resident Effector-Memory CTL Population. *J. Immunol.* **175**, 4355–4362 (2005).

207. Devocelle, A. *et al.* Inhibition of TGF-β1 Signaling by IL-15: A Novel Role for IL-15 in the Control of Renal Epithelial-Mesenchymal Transition: IL-15 Counteracts TGF-β1-Induced EMT in Renal Fibrosis. *Int. J. Cell Biol.* **2019**, 9151394 (2019).

208. Beuneu, H. *et al.* Dynamic behavior of NK cells during activation in lymph nodes. *Blood* **114**, 3227–3234 (2009).

209. Hegewisch-Solloa, E. *et al.* Mapping human natural killer cell development in pediatric tonsil by imaging mass cytometry and high-resolution microscopy. *bioRxiv* 2023.09.05.556371 (2023) doi:10.1101/2023.09.05.556371.

210. Moreno-Nieves, U. Y. *et al.* Landscape of innate lymphoid cells in human head and neck cancer reveals divergent NK cell states in the tumor microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2101169118 (2021).

211. Zhu, Y. *et al.* Intestinal epithelial cell-derived IL-15 determines local maintenance and maturation of intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Int. Immunol.* **32**, 307–319 (2019).

212. Viel, S. *et al.* TGF-β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci. Signal.* **9**, ra19 (2016).

213. Maizels, R. M. The multi-faceted roles of TGF-β in regulation of immunity to infection. *Adv. Immunol.* **150**, 1–42 (2021).

214. Wahlen, S. *et al.* The transcription factor RUNX2 drives the generation of human NK cells and promotes tissue residency. *eLife* **11**, e80320 (2022).

215. Zitti, B. *et al.* Human skin-resident CD8+ T cells require RUNX2 and RUNX3 for induction of cytotoxicity and expression of the integrin CD49a. *Immunity* **56**, 1285-1302.e7 (2023).

216. Tang, F. *et al.* A pan-cancer single-cell panorama of human natural killer cells. *Cell* **186**, 4235-4251.e20 (2023).

217. Marquardt, N. *et al.* Cutting Edge: Identification and Characterization of Human Intrahepatic CD49a+ NK Cells. *J. Immunol.* **194**, 2467–2471 (2015).

218. Marquardt, N. *et al.* Unique transcriptional and protein-expression signature in human lung tissue-resident NK cells. *Nat. Commun.* **10**, 3841 (2019).

219. Brownlie, D. *et al.* Accumulation of tissue-resident natural killer cells, innate lymphoid cells, and CD8+ T cells towards the center of human lung tumors. *OncoImmunology* **12**, 2233402 (2023).

220. Brownlie, D. *et al.* Expansions of adaptive-like NK cells with a tissue-resident phenotype in human lung and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2016580118 (2021).

221. Nikzad, R. *et al.* Human natural killer cells mediate adaptive immunity to viral antigens. *Sci. Immunol.* **4**, eaat8116 (2019).

222. Stary, V. *et al.* A discrete subset of epigenetically primed human NK cells mediates antigen-specific immune responses. *Sci. Immunol.* **5**, eaba6232 (2020).

223. Wang, Y. *et al.* HIV-1-induced cytokines deplete homeostatic innate lymphoid cells and expand TCF7-dependent memory NK cells. *Nat. Immunol.* **21**, 274–286 (2020).

224. Perreau, M., Banga, R. & Pantaleo, G. Targeted Immune Interventions for an HIV-1 Cure. *Trends Mol. Med.* **23**, 945–961 (2017).

225. Hashimoto, M. *et al.* CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions. *Annu. Rev. Med.* **69**, 301–318 (2018).

226. Saeidi, A. *et al.* T-Cell Exhaustion in Chronic Infections: Reversing the State of Exhaustion and Reinvigorating Optimal Protective Immune Responses. *Front. Immunol.* **9**, 2569 (2018).

227. Pesini, C. *et al.* PD-1 is expressed in cytotoxic granules of NK cells and rapidly mobilized to the cell membrane following recognition of tumor cells. *OncoImmunology* **11**, 2096359 (2022).

228. Nattermann, J. *et al.* HIV-1 Infection Leads to Increased HLA-E Expression Resulting in Impaired Function of Natural Killer Cells. *Antivir. Ther.* **10**, 95–107 (2004).

229. Yin, X. *et al.* Expression of the Inhibitory Receptor TIGIT Is Up-Regulated Specifically on NK Cells With CD226 Activating Receptor From HIV-Infected Individuals. *Front. Immunol.* **9**, 2341 (2018).

230. Norris, S. *et al.* PD-1 Expression on Natural Killer Cells and CD8+ T Cells During Chronic HIV-1 Infection. *Viral Immunol.* **25**, 329–332 (2012).

231. Jost, S. & Altfeld, M. Evasion from NK cell-mediated immune responses by HIV-1. *Microbes Infect.* **14**, 904–915 (2012).

232. Alter, G. *et al.* HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature* **476**, 96–100 (2011).

233. Boulet, S. *et al.* Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *AIDS* **22**, 595–599 (2008).

234. Bernard, N. F. Natural killer (NK) cell receptor-HLA ligand genotype combinations associated with protection from HIV infection: investigation of how protective genotypes influence anti HIV NK cell functions. *AIDS Res. Ther.* **14**, 38 (2017).

235. Alter, G. *et al.* Differential natural killer cell–mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J. Exp. Med.* **204**, 3027–3036 (2007).

236. Martin, M. P. *et al.* Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* **31**, 429–434 (2002).

237. Li, S. S. *et al.* HLA-B∗46 associates with rapid HIV disease progression in Asian cohorts and prominent differences in NK cell phenotype. *Cell Host Microbe* **30**, 1173-1185.e8 (2022).

238. Jennes, W. *et al.* Inhibitory KIR/HLA incompatibility between sexual partners confers protection against HIV-1 transmission. *Blood* **121**, 1157–1164 (2013).

239. Luteijn, R. *et al.* Early viral replication in lymph nodes provides HIV with a means by which to escape NK-cell-mediated control. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2729–2740 (2011).

240. Reeves, R. K., Evans, T. I., Gillis, J. & Johnson, R. P. Simian Immunodeficiency Virus Infection Induces Expansion of α4β7 + and Cytotoxic CD56 + NK Cells. *J. Virol.* **84**, 8959–8963 (2010).

241. Schafer, J. L., Li, H., Evans, T. I., Estes, J. D. & Reeves, R. K. Accumulation of Cytotoxic CD16 + NK Cells in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Lymph Nodes Associated with In Situ Differentiation and Functional Anergy. *J. Virol.* **89**, 6887–6894 (2015).

242. Naranbhai, V. *et al.* Changes in Natural Killer Cell Activation and Function during Primary HIV-1 Infection. *PLoS ONE* **8**, e53251 (2013).

243. Reeves, R. K. *et al.* Gut inflammation and indoleamine deoxygenase inhibit IL-17 production and promote cytotoxic potential in NKp44+ mucosal NK cells during SIV infection. *Blood* **118**, 3321–3330 (2011).

244. Krabbendam, L., Heesters, B. A., Kradolfer, C. M. A., Spits, H. & Bernink, J. H. Identification of human cytotoxic ILC3s. *Eur. J. Immunol.* **51**, 811–823 (2021).

245. Cao, W.-J. *et al.* Immune Dysfunctions of CD56neg NK Cells Are Associated With HIV-1 Disease Progression. *Front. Immunol.* **12**, 811091 (2022).

246. Cocker, A. T. H., Liu, F., Djaoud, Z., Guethlein, L. A. & Parham, P. CD56-negative NK cells: Frequency in peripheral blood, expansion during HIV-1 infection, functional capacity, and KIR expression. *Front. Immunol.* **13**, 992723 (2022).

247. Milush, J. M. *et al.* CD56negCD16+NK cells are activated mature NK cells with impaired effector function during HIV-1 infection. *Retrovirology* **10**, 158 (2013).

248. Gunesch, J. T. *et al.* CD56 regulates human NK cell cytotoxicity through Pyk2. *eLife* **9**, e57346 (2020).

249. Martinez, A. L., Shannon, M. J., Sloan, T. & Mace, E. M. CD56/NCAM mediates cell migration of human NK cells by promoting integrin-mediated adhesion turnove. *MBoC* **35**, 5 (2023).

250. Ferlazzo, G. *et al.* The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic. *J. Immunol.* **172**, 1455–1462 (2004).

251. Melgar, S., Hammarström, S., Öberg, Å., Danielsson, Å. & Hammarström, M. -L. Cytolytic Capabilities of Lamina Propria and Intraepithelial Lymphocytes in Normal and Chronically Inflamed Human Intestine. *Scand. J. Immunol.* **60**, 167–177 (2004).

252. Meyaard, L. LAIR and collagens in immune regulation. *Immunol. Lett.* **128**, 26–28 (2010).

253. TRM integrins CD103 and CD49a differentially support adherence and motility after resolution of influenza virus infection. doi:10.1073/pnas.1915681117.

254. Sadjadi, Z., Zhao, R., Hoth, M., Qu, B. & Rieger, H. Migration of Cytotoxic T Lymphocytes in 3D Collagen Matrices. *Biophys. J.* **119**, 2141–2152 (2020).

255. Prakash, M. D., Bird, C. H. & Bird, P. I. Active and zymogen forms of granzyme B are constitutively released from cytotoxic lymphocytes in the absence of target cell engagement. *Immunol. Cell Biol.* **87**, 249–254 (2009).

256. Prakash, M. D. *et al.* Granzyme B Promotes Cytotoxic Lymphocyte Transmigration via Basement Membrane Remodeling. *Immunity* **41**, 960–972 (2014).

257. Lim, Y. S. *et al.* NK cell-derived extracellular granzyme B drives epithelial ulceration during HSV-2 genital infection. *Cell Rep.* **42**, 112410 (2023).

258. Webb, G. M. *et al.* The human IL-15 superagonist N-803 promotes migration of virus-specific CD8+ T and NK cells to B cell follicles but does not reverse latency in ART-suppressed, SHIV-infected macaques. *PLoS Pathog.* **16**, e1008339 (2020).

259. Massoni-Badosa, R. *et al.* An atlas of cells in the human tonsil. *Immunity* 2022.06.24.497299 (2024) doi:10.1016/j.immuni.2024.01.006.

260. Kløverpris, H. N. *et al.* Innate Lymphoid Cells Are Depleted Irreversibly during Acute HIV-1 Infection in the Absence of Viral Suppression. *Immunity* **44**, 391–405 (2016).

261. Li, H. *et al.* Hypercytotoxicity and Rapid Loss of NKp44+ Innate Lymphoid Cells during Acute SIV Infection. *PLoS Pathog.* **10**, e1004551 (2014).

262. Favre, D. *et al.* Tryptophan Catabolism by Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Alters the Balance of TH17 to Regulatory T Cells in HIV Disease. *Sci. Transl. Med.* **2**, 32ra36 (2010).

263. Harper, J. *et al.* IL-21 and IFNα therapy rescues terminally differentiated NK cells and limits SIV reservoir in ART-treated macaques. *Nat. Commun.* **12**, 2866 (2021).

264. Huot, N. *et al.* SIV-induced terminally differentiated adaptive NK cells in lymph nodes associated with enhanced MHC-E restricted activity. *Nat. Commun.* **12**, 1282 (2021).

265. Dean, I. *et al.* Rapid functional impairment of natural killer cells following tumor entry limits anti-tumor immunity. *Nat. Commun.* **15**, 683 (2024).

266. Moreno-Cubero, E. *et al.* IL-15 reprogramming compensates for NK cell mitochondrial dysfunction in HIV-1 infection. *JCI Insight* **9**, e173099 (2024).

267. Huot, N. *et al.* Natural killer cells migrate into and control simian immunodeficiency virus replication in lymph node follicles in African green monkeys. *Nat. Med.* **23**, 1277–1286 (2017).

268. Huot, N., Rascle, P., Garcia-Tellez, T., Jacquelin, B. & Müller-Trutwin, M. Innate immune cell responses in non pathogenic versus pathogenic SIV infections. *Curr. Opin. Virol.* **19**, 37–44 (2016).

269. Manganaro, L. *et al.* IL-15 regulates susceptibility of CD4+ T cells to HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E9659–E9667 (2018).

270. Thans, T. van S. *et al.* Primary HIV-1 Strains Use Nef To Downmodulate HLA-E Surface Expression. *J. Virol.* **93**, (2019).

271. Sánchez-Cerrillo, I. *et al.* Combined Dendritic Cell And Anti-TIGIT Immunotherapy Potentiate Trail+ Memory NK Cells Against HIV-1 Infected Cells. *bioRxiv* 2024.04.09.587160 (2024) doi:10.1101/2024.04.09.587160.

272. Porichis, F. *et al.* Immune Checkpoint Blockade Restores HIV-Specific CD4 T Cell Help for NK Cells. *J. Immunol.* **201**, 971–981 (2018).

273. Kang, X. *et al.* Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell Cycle* **15**, 25–40 (2016).

274. Meyaard, L. *et al.* LAIR-1, a Novel Inhibitory Receptor Expressed on Human Mononuclear Leukocytes. *Immunity* **7**, 283–290 (1997).

275. Diaz, A. *et al.* Lymphoid Tissue Collagen Deposition in HIV-Infected Patients Correlates With the Imbalance Between Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors. *J. Infect. Dis.* **203**, 810–813 (2011).

276. Xie, J. *et al.* Blocking LAIR1 signaling in immune cells inhibits tumor development. *Front. Immunol.* **13**, 996026 (2022).

277. Horn, L. A. *et al.* Remodeling the tumor microenvironment via blockade of LAIR-1 and TGF-β signaling enables PD-L1-mediated tumor eradication. *J. Clin. Investig.* **132**, e155148 (2022).

278. Cabo, M. *et al.* CD137 costimulation counteracts TGFβ inhibition of NK-cell antitumor function. *Cancer Immunol. Res.* **9**, canimm.0030.2021 (2021).

279. Shaim, H. *et al.* Targeting the αv integrin-TGF-β axis improves natural killer cell function against glioblastoma stem cells. *J. Clin. Investig.* **131**, (2021).

280. Müller-Durovic, B. *et al.* Killer Cell Lectin-like Receptor G1 Inhibits NK Cell Function through Activation of Adenosine 5′-Monophosphate–Activated Protein Kinase. *J. Immunol.* **197**, 2891–2899 (2016).

281. Ibegbu, C. C. *et al.* Expression of Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 on Antigen-Specific Human CD8+ T Lymphocytes during Active, Latent, and Resolved Infection and its Relation with CD57. *J. Immunol.* **174**, 6088–6094 (2005).

282. Ito, M. *et al.* Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **203**, 289–295 (2006).

283. Bossche, J. V. den, Malissen, B., Mantovani, A., Baetselier, P. D. & Ginderachter, J. A. V. Regulation and function of the E-cadherin/catenin complex in cells of the monocyte-macrophage lineage and DCs. *Blood* **119**, 1623–1633 (2012).

284. Li, Y. *et al.* Structure of Natural Killer Cell Receptor KLRG1 Bound to E-Cadherin Reveals Basis for MHC-Independent Missing Self Recognition. *Immunity* **31**, 35–46 (2009).

285. Nava, P., Kamekura, R. & Nusrat, A. Cleavage of transmembrane junction proteins and their role in regulating epithelial homeostasis. *Tissue Barriers* **1**, e24783 (2013).

286. Inge, L. J. *et al.* Soluble E-cadherin promotes cell survival by activating epidermal growth factor receptor. *Exp. Cell Res.* **317**, 838–848 (2011).

287. Streeck, H. *et al.* Epithelial adhesion molecules can inhibit HIV-1–specific CD8+ T-cell functions. *Blood* **117**, 5112–5122 (2011).

288. Wang, Z.-R. *et al.* Implications of soluble E-cadherin level of antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Int. Immunopharmacol.* **74**, 105708 (2019).

289. Mezouar, S. *et al.* High Concentrations of Serum Soluble E-Cadherin in Patients With Q Fever. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 219 (2019).

290. Lien, K., Mayer, W., Herrera, R., Rosbe, K. & Tugizov, S. M. HIV-1 proteins gp120 and tat induce the epithelial–mesenchymal transition in oral and genital mucosal epithelial cells. *PLoS ONE* **14**, e0226343 (2019).

291. Wang, J. M. *et al.* KLRG1 Negatively Regulates Natural Killer Cell Functions through the Akt Pathway in Individuals with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* **87**, 11626–11636 (2013).

292. Astorga-Gamaza, A. *et al.* Antibody cooperative adsorption onto AuNPs and its exploitation to force natural killer cells to kill HIV-infected T cells. *Nano Today* **36**, 101056 (2021).

293. Astorga-Gamaza, A. & Buzon, M. J. The active human immunodeficiency virus reservoir during antiretroviral therapy: emerging players in viral persistence. *Current Opinion in HIV and AIDS* **16**, 193–199 (2021).

294. Lichtfuss, G. F. *et al.* Virologically Suppressed HIV Patients Show Activation of NK Cells and Persistent Innate Immune Activation. *J. Immunol.* **189**, 1491–1499 (2012).

295. Nabatanzi, R. *et al.* Aberrant natural killer (NK) cell activation and dysfunction among ART-treated HIV-infected adults in an African cohort. *Clinical Immunology* **201**, 55–60 (2019).

296. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology* **9**, 503–510 (2008).

297. Paust, S., Blish, C. A. & Reeves, R. K. Redefining Memory: Building the Case for Adaptive NK Cells. *Journal of Virology* **91**, 10.1128/jvi.00169-17 (2017).

298. Olesen, R. *et al.* Innate Immune Activity Correlates with CD4 T Cell-Associated HIV-1 DNA Decline during Latency-Reversing Treatment with Panobinostat. *Journal of Virology* **89**, 10176–10189 (2015).

299. Lanier, L. L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature Immunology* **9**, 495–502 (2008).

300. Horowitz, A. *et al.* Genetic and Environmental Determinants of Human NK Cell Diversity Revealed by Mass Cytometry. *Science Translational Medicine* **5**, 208ra145 (2013).

301. Hanke, T., Corral, L., Vance, R. E. & Raulet, D. H. 2F1 antigen, the mouse homolog of the rat "mast cell function-associated antigen", is a lectin-like type II transmembrane receptor expressed by natural killer cells. *European Journal of Immunology* **28**, 4409–4417 (1998).

302. Blaser, C., Kaufmann, M. & Pircher, H. Cutting Edge: Virus-Activated CD8 T Cells and Lymphokine-Activated NK Cells Express the Mast Cell Function-Associated Antigen, An Inhibitory C-Type Lectin. *The Journal of Immunology* **161**, 6451–6454 (1998).

303. Robbins, S. H., Terrizzi, S. C., Sydora, B. C., Mikayama, T. & Brossay, L. Differential Regulation of Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 Expression on T Cells. *The Journal of Immunology* **170**, 5876–5885 (2003).

304. Beyersdorf, N., Ding, X., Tietze, J. K. & Hanke, T. Characterization of mouse CD4 T cell subsets defined by expression of KLRG1. *European Journal of Immunology* **37**, 3445–3454 (2007).

305. Stephens, G. L., Andersson, J. & Shevach, E. M. Distinct Subsets of FoxP3+ Regulatory T Cells Participate in the Control of Immune Responses. *The Journal of Immunology* **178**, 6901–6911 (2007).

306. Voehringer, D., Koschella, M. & Pircher, H. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). *Blood* **100**, 3698–3702 (2002).

307. Voehringer, D. *et al.* Viral Infections Induce Abundant Numbers of Senescent CD8 T Cells. *The Journal of Immunology* **167**, 4838–4843 (2001).

308. Thimme, R. *et al.* Increased Expression of the NK Cell Receptor KLRG1 by Virus-Specific CD8 T Cells during Persistent Antigen Stimulation. *Journal of Virology* **79**, 12112–12116 (2005).

309. Huntington, N. D. *et al.* NK Cell Maturation and Peripheral Homeostasis Is Associated with KLRG1 Up-Regulation. *The Journal of Immunology* **178**, 4764–4770 (2007).

310. Robbins, S. H. *et al.* Cutting Edge: Inhibitory Functions of the Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 Molecule During the Activation of Mouse NK Cells. *The Journal of Immunology* **168**, 2585–2589 (2002).

311. Tessmer, M. S. *et al.* KLRG1 binds cadherins and preferentially associates with SHIP-1. *International Immunology* **19**, 391–400 (2007).

312. Gründemann, C. *et al.* Cutting Edge: Identification of E-Cadherin as a Ligand for the Murine Killer Cell Lectin-Like Receptor G1. *The Journal of Immunology* **176**, 1311–1315 (2006).

313. Bruner, K. M. *et al.* A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nature* **566**, 120–125 (2019).

314. Banga, R. *et al.* PD-1+ and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat. Med.* **22**, 754–761 (2016).

315. Serra-Peinado, C. *et al.* Expression of CD20 after viral reactivation renders HIV-reservoir cells susceptible to Rituximab. *Nature Communications* **10**, 3705 (2019).

316. Guo, A.-L. *et al.* Implications of the accumulation of CXCR5+ NK cells in lymph nodes of HIV-1 infected patients. *eBioMedicine* **75**, 103794 (2022).

317. Groom, J. R. & Luster, A. D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunology and Cell Biology* **89**, 207–215 (2011).

318. Wei, S. C., Duffy, C. R. & Allison, J. P. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discovery* **8**, 1069–1086 (2018).

319. Fromentin, R. *et al.* PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in CD4+ T cells from ART-suppressed individuals. *Nature Communications* **10**, 814 (2019).

320. Lian, X. *et al.* Progressive transformation of the HIV-1 reservoir cell profile over two decades of antiviral therapy. *Cell Host & Microbe* **31**, 83-96.e5 (2023).

321. Duette, G. *et al.* The HIV-1 proviral landscape reveals Nef contributes to HIV-1 persistence in effector memory CD4+ T-cells. *Journal of Clinical Investigation* **132**, e154422 (2022).

322. Ren, Y. *et al.* BCL-2 antagonism sensitizes cytotoxic T cell-resistant HIV reservoirs to elimination ex vivo. *Journal of Clinical Investigation* **130**, 2542–2559 (2020).

323. Pino, M. *et al.* Limited impact of fingolimod treatment during the initial weeks of ART in SIV-infected rhesus macaques. *Nature Communications* **13**, 5055 (2022).

324. Wijaya, R. S. *et al.* KLRG1+ natural killer cells exert a novel antifibrotic function in chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* **71**, 252–264 (2019).

325. Borys, S. M., Bag, A. K., Brossay, L. & Adeegbe, D. O. The Yin and Yang of Targeting KLRG1+ Tregs and Effector Cells. *Frontiers in Immunology* **13**, 894508 (2022).

326. Novelli, L. *et al.* KLRG1 is reduced on NK cells in SLE patients, inversely correlates with disease activity and is modulated by hydroxychloroquine in vitro. *Lupus* **32**, 549–559 (2023).

327. Moretta, L. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood* **116**, 3689–3691 (2010).

328. Nie, Y. *et al.* Increased expression of TIGIT and KLRG1 correlates with impaired CD56bright NK cell immunity in HPV16-related cervical intraepithelial neoplasia. *Virology Journal* **19**, 68 (2022).

329. Alpert, M. D. *et al.* ADCC Develops Over Time during Persistent Infection with Live-Attenuated SIV and Is Associated with Complete Protection against SIVmac251 Challenge. *PLoS Pathogens* **8**, e1002890 (2012).

330. Haynes, B. F. *et al.* Immune-Correlates Analysis of an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial. *New England Journal of Medicine* **366**, 1275–1286 (2012).

331. Lopez-Vergès, S. *et al.* Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 14725–14732 (2011).

332. Wijaya, R. S. *et al.* Hepatitis C Virus (HCV) Eradication With Interferon-Free Direct-Acting Antiviral-Based Therapy Results in KLRG1+ HCV-Specific Memory Natural Killer Cells. *The Journal of Infectious Diseases* **223**, 1183–1195 (2020).

333. Judge, S. J., Murphy, W. J. & Canter, R. J. Characterizing the Dysfunctional NK Cell: Assessing the Clinical Relevance of Exhaustion, Anergy, and Senescence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **10**, 49 (2020).

334. Alvarez, M. *et al.* Regulation of murine NK cell exhaustion through the activation of the DNA damage repair pathway. *JCI Insight* **4**, e127729 (2019).

335. Tata, A. *et al.* Combination blockade of KLRG1 and PD-1 promotes immune control of local and disseminated cancers. *OncoImmunology* **10**, 1933808 (2021).

336. Greenberg, S. A., Kong, S. W., Thompson, E. & Gulla, S. V. Co-inhibitory T cell receptor KLRG1: human cancer expression and efficacy of neutralization in murine cancer models. *Oncotarget* **10**, 1399–1406 (2019).

337. Wang, S. *et al.* An atlas of immune cell exhaustion in HIV-infected individuals revealed by single-cell transcriptomics. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 2333–2347 (2020).

338. Broyles, L. N., Luo, R., Boeras, D. & Vojnov, L. The risk of sexual transmission of HIV in individuals with low-level HIV viraemia: a systematic review. *Lancet* **402**, 464–471 (2023).

339. Schacker, T. *et al.* Rapid Accumulation of Human Immunodeficiency Virus (HIV) in Lymphatic Tissue Reservoirs during Acute and Early HIV Infection: Implications for Timing of Antiretroviral Therapy. *J. Infect. Dis.* **181**, 354–357 (2000).

340. Brodin, P., Kärre, K. & Höglund, P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol.* **30**, 143–149 (2009).

341. He, Y. & Tian, Z. NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands. *Cell. Mol. Immunol.* **14**, 321–330 (2017).

342. Kazer, S. W. *et al.* Integrated single-cell analysis of multicellular immune dynamics during hyperacute HIV-1 infection. *Nat. Med.* **26**, 511–518 (2020).

343. Estes, J. D. Pathobiology of HIV/SIV-associated changes in secondary lymphoid tissues. *Immunol. Rev.* **254**, 65–77 (2013).

344. Estes, J. D. *et al.* Simian Immunodeficiency virus-Induced Lymphatic Tissue Fibrosis Is Mediated by Transforming Growth Factor β1-positive Regulatory T Cells and Begins in Early Infection. *J. Infect. Dis.* **195**, 551–561 (2007).

345. Schacker, T. W. *et al.* Lymphatic Tissue Fibrosis Is Associated with Reduced Numbers of Naïve CD4+ T Cells in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *American Society for Microbiology* **13**, 556–560 (2006).

346. Astorga-Gamaza, A. *et al.* KLRG1 expression on natural killer cells is associated with HIV persistence, and its targeting promotes the reduction of the viral reservoir. *Cell Rep. Med.* **4**, 101202 (2023).

347. Morvan, M. G. & Lanier, L. L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 7–19 (2016).

348. Zhang, Q. *et al.* Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat. Immunol.* **19**, 723–732 (2018).

349. Wu, C. *et al.* Barcode clonal tracking of tissue-resident immune cells in rhesus macaque highlights distinct clonal distribution pattern of tissue NK cells. *Front. Immunol.* **13**, 994498 (2022).

350. Melsen, J. E., Lugthart, G., Lankester, A. C. & Schilham, M. W. Human Circulating and Tissue-Resident CD56bright Natural Killer Cell Populations. *Front. Immunol.* **7**, 262 (2016).

351. Ram, D. R. *et al.* Characterization of Rhesus Macaque Liver-Resident CD49a+ NK Cells During Retrovirus Infections. *Front. Immunol.* **11**, 1676 (2020).

352. Cooper, G. E., Ostridge, K., Khakoo, S. I., Wilkinson, T. M. A. & Staples, K. J. Human CD49a+ Lung Natural Killer Cell Cytotoxicity in Response to Influenza A Virus. *Front. Immunol.* **9**, 1671 (2018).

353. Schuster, I. S. *et al.* Infection induces tissue-resident memory NK cells that safeguard tissue health. *Immunity* **56**, 531-546.e6 (2023).

354. Carrega, P. *et al.* CD56brightPerforinlow Noncytotoxic Human NK Cells Are Abundant in Both Healthy and Neoplastic Solid Tissues and Recirculate to Secondary Lymphoid Organs via Afferent Lymph. *J. Immunol.* **192**, 3805–3815 (2014).

355. Gumá, M. *et al.* Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* **104**, 3664–3671 (2004).

356. Merino, A. *et al.* Adaptive NK Cells Are Expanded By NKG2C-Agonist Antibodies and Retain Their Cytotoxic and Secretory Properties. *Blood* **132**, 3695 (2018).

357. Béziat, V. *et al.* NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* **121**, 2678–2688 (2013).

358. Suliman, S. *et al.* Bacillus Calmette–Guérin (BCG) Revaccination of Adults with Latent Mycobacterium tuberculosis Infection Induces Long-Lived BCG-Reactive NK Cell Responses. *J. Immunol.* **197**, 1100–1110 (2016).

359. Rölle, A., Meyer, M., Calderazzo, S., Jäger, D. & Momburg, F. Distinct HLA-E Peptide Complexes Modify Antibody-Driven Effector Functions of Adaptive NK Cells. *Cell Rep.* **24**, 1967-1976.e4 (2018).

360. Wijaya, R. S. *et al.* HBV vaccination and HBV infection induces HBV-specific natural killer cell memory. *Gut* **70**, 357–369 (2021).

361. Guo, J., Wang, W., Yu, D. & Wu, Y. Spinoculation Triggers Dynamic Actin and Cofilin Activity That Facilitates HIV-1 Infection of Transformed and Resting CD4 T Cells. *J. Virol.* **85**, 9824–9833 (2011).

362. Sarzotti-Kelsoe, M. *et al.* Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. *J. Immunol. Methods* **409**, 131–146 (2014).

363. Rahman, M. A. *et al.* Differential Effect of Mucosal NKp44+ Innate Lymphoid Cells and Δγ Cells on Simian Immunodeficiency Virus Infection Outcome in Rhesus Macaques. *J. Immunol.* **203**, 2459–2471 (2019).

364. Li, H. & Reeves, R. K. Functional perturbation of classical natural killer and innate lymphoid cells in the oral mucosa during SIV infection. *Front. Immunol.* **3**, 417 (2013).

365. Alter, G., Malenfant, J. M. & Altfeld, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* **294**, 15–22 (2004).

366. Aktas, E., Kucuksezer, U. C., Bilgic, S., Erten, G. & Deniz, G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell. Immunol.* **254**, 149–154 (2009).

367. Cohnen, A. *et al.* Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood* **122**, 1411–1418 (2013).

368. Choi, Y. H. *et al.* IL-27 enhances IL-15/IL-18-mediated activation of human natural killer cells. *J. Immunother. Cancer* **7**, 168 (2019).

369. Robertson, C. *et al.* Extracellular matrix modulates T cell clearance of malignant cells in vitro. *Biomaterials* **282**, 121378 (2022).

370. Revert, F. *et al.* Selective targeting of collagen IV in the cancer cell microenvironment reduces tumor burden. *Oncotarget* **9**, 11020–11045 (2018).

371. TRM integrins CD103 and CD49a differentially support adherence and motility after resolution of influenza virus infection.

372. Borrego, X. T., Gloria Esteso Tornero, John E. Coligan, Francisco. Characterization of the in vivo function of the leukocyte-associated Ig-like receptor (LAIR)-1. *The Journal of Immunology* **182**, 90 (2009).

373. Vendrame, E. *et al.* TIGIT is upregulated by HIV-1 infection and marks a highly functional adaptive and mature subset of natural killer cells. *AIDS* **34**, 801–813 (2020).

374. Ge, Z. *et al.* TIGIT and PD1 Co-blockade Restores ex vivo Functions of Human Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 443–464 (2021).

375. Banta, K. L. *et al.* Mechanistic convergence of the TIGIT and PD-1 inhibitory pathways necessitates co-blockade to optimize anti-tumor CD8+ T cell responses. *Immunity* **55**, 512-526.e9 (2022).

376. Papaioannou, S. *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells orchestrate NK cell recruitment and activation in acute inflammatory liver injury. *Cell Rep.* **42**, 112836 (2023).

377. Wendel, M., Galani, I. E., Suri-Payer, E. & Cerwenka, A. Natural Killer Cell Accumulation in Tumors Is Dependent on IFN-γ and CXCR3 Ligands. *Cancer Res.* **68**, 8437–8445 (2008).

378. Gao, N. *et al.* LFA-1/ ICAM-1 promotes NK cell cytotoxicity associated with the pathogenesis of ocular toxoplasmosis in murine model. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **16**, e0010848 (2022).

379. Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N. & Frazer, I. H. Interferon-γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis.* **8**, e2836–e2836 (2017).

380. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* **22**, 633–640 (2001).

381. Zimmer, C. L. *et al.* NK cells are activated and primed for skin-homing during acute dengue virus infection in humans. *Nat. Commun.* **10**, 3897 (2019).

382. Pruitt, H. C. *et al.* Collagen fiber structure guides 3D motility of cytotoxic T lymphocytes. *Matrix Biol.* **85**, 147–159 (2020).

383. Imle, A. *et al.* Experimental and computational analyses reveal that environmental restrictions shape HIV-1 spread in 3D cultures. *Nat. Commun.* **10**, 2144 (2019).

384. Lopez, P. *et al.* T cell migration potentiates HIV infection by enhancing viral fusion and integration. *Cell Rep.* **38**, 110406 (2022).

385. Hu, X. & Ivashkiv, L. B. Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon-γ: Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases. *Immunity* **31**, 539–550 (2009).

386. Ghosh, A. K., Bhattacharyya, S., Mori, Y. & Varga, J. Inhibition of collagen gene expression by interferon-γ: Novel role of the CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBPβ). *J. Cell. Physiol.* **207**, 251–260 (2006).

387. Glasner, A. *et al.* NKp46 Receptor-Mediated Interferon-γ Production by Natural Killer Cells Increases Fibronectin 1 to Alter Tumor Architecture and Control Metastasis. *Immunity* **48**, 107-119.e4 (2018).

388. Reilly, E. C. *et al.* CD49a Identifies Polyfunctional Memory CD8 T Cell Subsets that Persist in the Lungs After Influenza Infection. *Front. Immunol.* **12**, 728669 (2021).

389. Bromley, S. K. *et al.* CD49a Regulates Cutaneous Resident Memory CD8+ T Cell Persistence and Response. *Cell Rep.* **32**, 108085 (2020).

390. Jiang, X. *et al.* Skin infection generates non-migratory memory CD8+ TRM cells providing global skin immunity. *Nature* **483**, 227–231 (2012).

391. Min-Oo, G., Bezman, N. A., Madera, S., Sun, J. C. & Lanier, L. L. Proapoptotic Bim regulates antigen-specific NK cell contraction and the generation of the memory NK cell pool after cytomegalovirus infection. *J. Exp. Med.* **211**, 1289–1296 (2014).

392. Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P. & Diefenbach, A. Dendritic Cells Prime Natural Killer Cells by trans-Presenting Interleukin 15. *Immunity* **26**, 503–517 (2007).

393. Fujii, R. *et al.* An IL-15 superagonist/IL-15Rα fusion complex protects and rescues NK cell-cytotoxic function from TGF-β1-mediated immunosuppression. *Cancer Immunol., Immunother.* **67**, 675–689 (2018).

394. Zhang, N. & Bevan, M. J. Transforming Growth Factor-β Signaling Controls the Formation and Maintenance of Gut-Resident Memory T Cells by Regulating Migration and Retention. *Immunity* **39**, 687–696 (2013).

395. Kim, T.-S., Rha, M.-S. & Shin, E.-C. IFN-γ Induces IL-15 Trans-Presentation by Epithelial Cells via IRF1. *J. Immunol.* **208**, 338–346 (2022).

396. Lee, N. *et al.* Human monocytes have increased IFN-γ-mediated IL-15 production with age alongside altered IFN-γ receptor signaling. *Clin. Immunol.* **152**, 101–110 (2014).

397. Ni, X. *et al.* Cytokine-Based Generation of CD49a+Eomes−/+ Natural Killer Cell Subsets. *Front. Immunol.* **9**, 2126 (2018).

398. Hydes, T. *et al.* IL-12 and IL-15 induce the expression of CXCR6 and CD49a on peripheral natural killer cells. *Immun., Inflamm. Dis.* **6**, 34–46 (2018).

399. Romee, R. *et al.* NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood* **121**, 3599–3608 (2013).

400. Srpan, K. *et al.* Shedding of CD16 disassembles the NK cell immune synapse and boosts serial engagement of target cells. *J. Cell Biol.* **217**, 3267–3283 (2018).

401. Li, W. *et al.* CD49a+CD49b+ NK cells induced by viral infection reflect an activated state of conventional NK cells. *Sci. China Life Sci.* **63**, 1725–1733 (2020).

402. Melssen, M. M. *et al.* Differential Expression of CD49a and CD49b Determines Localization and Function of Tumor-Infiltrating CD8+ T CellsCD49a/CD49b Integrins Affect CD8+ T-cell Function in Tumors. *Cancer Immunol. Res.* **9**, 583–597 (2021).

403. Yu, T. *et al.* Elevated expression of miR-146a correlates with high levels of immune cell exhaustion markers and suppresses cellular immune function in chronic HIV-1-infected patients. *Sci. Rep.* **9**, 18829 (2019).

404. Trautmann, L. *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* **12**, 1198–1202 (2006).

405. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* **10**, 29–37 (2009).

406. Chew, G. M. *et al.* TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. *PLoS Pathog.* **12**, e1005349 (2016).

407. Sungur, C. M. *et al.* Human natural killer cells confer protection against HIV-1 infection in humanized mice. *J. Clin. Investig.* **132**, e162694 (2022).

408. Hofmann, M., Schweier, O. & Pircher, H. Different inhibitory capacities of human and mouse KLRG1 are linked to distinct disulfide-mediated oligomerizations. *Eur. J. Immunol.* **42**, 2484–2490 (2012).

409. Schweier, O., Hofmann, M. & Pircher, H. KLRG1 activity is regulated by association with the transferrin receptor. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1851–1856 (2014).

410. Henson, S. M. & Akbar, A. N. KLRG1—more than a marker for T cell senescence. *AGE* **31**, 285–291 (2009).

411. Finley, J. Elimination of cancer stem cells and reactivation of latent HIV-1 via AMPK activation: Common mechanism of action linking inhibition of tumorigenesis and the potential eradication of HIV-1. *Méd. Hypotheses* **104**, 133–146 (2017).

412. Shi, L. *et al.* KLRG1 Impairs CD4+ T Cell Responses via p16ink4a and p27kip1 Pathways: Role in Hepatitis B Vaccine Failure in Individuals with Hepatitis C Virus Infection. *J. Immunol.* **192**, 649–657 (2014).

413. Huang, P. *et al.* Hematopoietic-Specific Deletion of Foxo1 Promotes NK Cell Specification and Proliferation. *Front. Immunol.* **10**, 1016 (2019).

414. Roux, A. *et al.* FOXO1 transcription factor plays a key role in T cell—HIV-1 interaction. *PLoS Pathog.* **15**, e1007669 (2019).

415. Reeves, R. K. *et al.* Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques. *Nat. Immunol.* **16**, 927–932 (2015).

416. Cheuk, S. *et al.* CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8+ T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin. *Immunity* **46**, 287–300 (2017).

417. Jabri, B. & Abadie, V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 771–783 (2015).

418. Boulch, M. *et al.* Tumor-intrinsic sensitivity to the pro-apoptotic effects of IFN-γ is a major determinant of CD4+ CAR T-cell antitumor activity. *Nat. Cancer* **4**, 968–983 (2023).

419. Smeltz, R. B., Chen, J., Ehrhardt, R. & Shevach, E. M. Role of IFN-γ in Th1 Differentiation: IFN-γ Regulates IL-18Rα Expression by Preventing the Negative Effects of IL-4 and by Inducing/Maintaining IL-12 Receptor β2 Expression. *J. Immunol.* **168**, 6165–6172 (2002).

420. Melssen, M. M., Hutchison, C., Mauldin, I. S., Bullock, T. N. & Slingluff, C. L. Cytokines and TLR agonists influence the expression of retention integrins CD49a, CD49b and CD103 by T cells. *J. Immunother. Cancer* **3**, P235 (2015).

421. Subedi, N. *et al.* An automated real-time microfluidic platform to probe single NK cell heterogeneity and cytotoxicity on-chip. *Sci. Rep.* **11**, 17084 (2021).

422. Scholz, E. M. B. & Kashuba, A. D. M. The Lymph Node Reservoir: Physiology, HIV Infection, and Antiretroviral Therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **109**, 918–927 (2021).

423. Page-Shafer, K. *et al.* Risk of HIV infection attributable to oral sex among men who have sex with men and in the population of men who have sex with men. *AIDS* **16**, 2350–2352 (2002).

424. Maher, D., Wu, X., Schacker, T., Larson, M. & Southern, P. A Model System of Oral HIV Exposure, Using Human Palatine Tonsil, Reveals Extensive Binding of HIV Infectivity, with Limited Progression to Primary Infection. *J. Infect. Dis.* **190**, 1989–1997 (2004).

425. Maher, D. M., Zhang, Z.-Q., Schacker, T. W. & Southern, P. J. Ex Vivo Modeling of Oral HIV Transmission in Human Palatine Tonsil. *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 631–642 (2004).

426. Stahl-Hennig, C. *et al.* Rapid Infection of Oral Mucosal-Associated Lymphoid Tissue with Simian Immunodeficiency Virus. *Science* **285**, 1261–1265 (1999).

427. Kumar, R. B., Maher, D. M., Herzberg, M. C. & Southern, P. J. Expression of HIV receptors, alternate receptors and co-receptors on tonsillar epithelium: implications for HIV binding and primary oral infection. *Virol. J.* **3**, 25 (2006).

428. Kang, S. Y. C. *et al.* Characterization of Epithelial Progenitors in Normal Human Palatine Tonsils and Their HPV16 E6/E7-Induced Perturbation. *Stem Cell Rep.* **5**, 1210–1225 (2015).

429. Lim, Y. X., Mierzwa, M. L., Sartor, M. A. & D'Silva, N. J. Clinical, morphologic and molecular heterogeneity of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oncogene* **42**, 2939–2955 (2023).

430. Tanaka, E. *et al.* Morphology of the epithelium of the lower rectum and the anal canal in the adult human. *Méd. Mol. Morphol.* **45**, 72–79 (2012).

431. Patel, P. *et al.* Estimating per-act HIV transmission risk. *AIDS* **28**, 1509–1519 (2014).

432. Chen, S.-Y., Lin, J.-S. & Yang, B.-C. Modulation of tumor cell stiffness and migration by type IV collagen through direct activation of integrin signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **555**, 1–8 (2014).

433. Fang, M., Yuan, J., Peng, C. & Li, Y. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumor Biol.* **35**, 2871–2882 (2014).

434. Seay, K. *et al.* In Vivo Activation of Human NK Cells by Treatment with an Interleukin-15 Superagonist Potently Inhibits Acute In Vivo HIV-1 Infection in Humanized Mice. *J. Virol.* **89**, 6264–6274 (2015).

435. Wong, J. K. M. *et al.* TGF-β signalling limits effector function capacity of NK cell anti-tumour immunity in human bladder cancer. *eBioMedicine* **104**, 105176 (2024).

436. Liu, B. *et al.* Bifunctional TGF-β trap/IL-15 protein complex elicits potent NK cell and CD8+ T cell immunity against solid tumors. *Mol. Ther.* **29**, 2949–2962 (2021).

VIII. PUBLICACIONS

VIII. PUBLICACIONS

Llista de publicacions durant la tesi doctoral

Astorga-Gamaza, A.*, **Perea, D.***, Sanchez-Gaona, N., Calvet-Mirabent, M., Gallego-Cortés, A., Grau-Expósito, J., Sanchez-Cerrillo, I., Rey, J., Castellví, J., Curran, A., *et al*. (2023). KLRG1 expression on natural killer cells is associated with HIV persistence, and its targeting promotes the reduction of the viral reservoir. Cell Rep. Med. *4*, 101202.

Grau-Expósito, J.*, **Perea, D.***, Suppi, M., Massana, N., Vergara, A., Soler, M.J., Trinite, B., Blanco, J., García-Pérez, J., Alcamí, J., *et al*. (2022). Evaluation of SARS-CoV-2 entry, inflammation and new therapeutics in human lung tissue cells. PLoS Pathog. *18*, e1010171.

Kladnik, J., Dolinar, A., Kljun, J., **Perea, D.**, Grau-Expósito, J., Genescà, M., Novinec, M., Buzon, M.J., and Turel, I. (2022). Zinc pyrithione is a potent inhibitor of PLPro and cathepsin L enzymes with *ex vivo* inhibition of SARS-CoV-2 entry and replication. J. Enzym. Inhib. Med. Chem. *37*, 2118–2128.

Peralta-Garcia, A., Torrens-Fontanals, M., Stepniewski, T.M., Grau-Expósito, J., **Perea, D.**, Ayinampudi, V., Waldhoer, M., Zimmermann, M., Buzón, M.J., Genescà, M., *et al*. (2021). Entrectinib—A SARS-CoV-2 Inhibitor in Human Lung Tissue (HLT) Cells. Int. J. Mol. Sci. *22*, 17992.

Grau-Expósito, J., Sánchez-Gaona, N., Massana, N., Suppi, M., Astorga-Gamaza, A., **Perea, D.**, Rosado, J., Falcó, A., Kirkegaard, C., Torrella, A., *et al*. (2021). Peripheral and lung resident memory T cell re-sponses against SARS-CoV-2. Nat. Commun. *12*, 7010.

En procés

Perea, D., Sanchez-Gaona, N., Pumarola, F., Ortiz, N., Llano, I., Lorente, J., Falcó, V., Genescà, M., and Buzon, M.J. Early resident NK cell response to local HIV infection in lymphoid tissue. *Manuscrit en preparació*.