

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "SAPIENZA"



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dipartimento di Sanita' Pubblica e Malattie Infettive

Dottorato di ricerca in Scienze Infettivologiche e Terapie Immunologiche

***Effetti della cART sulla risposta dei linfociti Th17 in pazienti con  
Infezione da HIV.***

Relatori: Prof. Vincenzo VULLO

Dott.ssa Gabriella D'ETTORE

Candidato: Lorenzo ZAFFIRI

## INDICE:

### Introduzione

### Materiali e Metodi:

#### Popolazione in studio

- *Trattamento dei campioni di sangue e isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico;*
- *Stimolazione delle cellule ed ELISA;*
- *Analisi statistica*

### Risultati

- *IL-15 aumenta in maniera dose dipendente la produzione di IL-17 da parte delle cellule mononucleate CD4+ dei soggetti sani.*
- *IL15 induce la produzione di IL17 da parte dei cellule mononucleate CD4+ dei pazienti HIV+ con soppressione della replicazione virale.*

### Discussione

### Figure

### Bibliografia

## INTRODUZIONE

La terapia antiretrovirale combinata (cART) e' in grado di indurre una persistente soppressione della replicazione del Virus dell'Immunodeficienza Umana (HIV), inducendo una sostanziale riduzione della morbidity e della mortalita' nei pazienti HIV-1 positivi. Nonostante i significativi benefici ottenuti dalla cART, le persone affette da HIV-1 continuano a presentare una serie di fenomeni immunologici che si ipotizza derivino da uno stato di immunoattivazione sistemica cronica.

L'infezione da HIV-1 e' caratterizzata da una progressiva perdita di linfociti T CD4+ e da una severa disregolazione del sistema immunitario, che determina lo sviluppo della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). La patogenesi dell'infezione da HIV-1 e' particolarmente complessa e inizia il suo corso durante la fase acuta dell'infezione con una robusta replicazione virale e la deplezione dei linfociti CD4+ a livello mucosale. I principali recettori per l'ingresso dell'HIV-1 all'interno delle cellule linfocitarie sono considerati i recettori CD4 e CCR5, che sono ampiamente espressi dai linfociti T memory. Questi linfociti memory sono particolarmente numerosi proprio a livello del tessuto linfocitario associate alla mucosa. A seguito dell'infezione da HIV-1, si assiste ad una rapida deplezione proprio a livello della mucosa intestinale gia' dopo le prime 3-4

settimane dall'infezione primaria. Mentre a livello del sangue periferico e dei linfonodi sono prevalenti i linfociti T CD4+ ma che non esprimono il recettore CCR5, perciò risparmiati durante la fase acuta di infezione.

E' noto che i linfociti CD4+ naïve si differenziano in cellule effettrici in seguito alla stimolazione da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC) e l'interazione tra il recettore delle cellule T (TRC) e l'MHC, espresso dalle APC stesse. I linfociti T CD4+ si possono differenziare in diverse sottopopolazioni a seconda del tipo di antigene presentato, dell'interazione con le cellule APC e del milieu di citochine presenti localmente. L'eterogenicità di queste cellule assicura l'attivazione di differenti tipi di risposte da parte del sistema immunitario. Infatti l'attivazione di differenti sottopopolazioni di linfociti T CD4+ risulta nella produzione di distinti patterns di citochine, che a loro volta segnalano la presenza dell'antigene e inducono la risposta di differenti cellule del sistema immunitario. I linfociti T-helper sono stati tradizionalmente classificati in base al profilo di citochine prodotte in due grandi sottopopolazioni: i linfociti Th1 e Th2.

I linfociti Th1, che sono considerati i mediatori della risposta immunitaria cellulare, sono caratterizzati dalla produzione e secrezione di Interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleuchina 2 (IL-2). Mentre i linfociti Th2 sono considerati i mediatori della risposta immunitaria umorale e a tal fine producono un particolare gruppo di citochine: interleuchina 4 (IL-4), interleuchina 5 (IL-5) e interleuchina 13 (IL-13).

Sebbene ancora non del tutto chiaro, la polarizzazione di queste cellule T CD4+ progenitrici verso un determinato subset di T-helper e' caratterizzato dalla presenza di particolari molecole stimolatorie espresse dalle APC. Come detto precedentemente, il

milieu di citochine presenti localmente induce la attivazione di specifici fattori di trascrizione intracellulari. Infatti la polarizzazione dei linfociti T CD4+ naïve verso i linfociti Th1 e' determinata dalla presenza di IFN- $\gamma$  e IL-12, che a loro volta attivano i fattori di trascrizione: STAT1, STAT4 e Tbet. Questi sono in grado di indurre la produzione da parte di questa sottopopolazione di linfociti T helper di IFN- $\gamma$ , IL10 e TNF e inibire la produzione IL-4, IL-5 e IL-6. Allo stesso modo, la polarizzazione verso i linfociti Th2 e' indotta dalla presenza di IL-4, che attiva il fattore di trascrizione GATA3. Questo induce la produzione delle citochine specifiche di questo subset come: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e inibisce la produzione delle citochine appartenenti ai Th1.

Recentemente tuttavia sono stati individuati nuove sottopopolazioni di linfociti T helper, che espandono il paradigma Th1/Th2. Tra questi bisogna ricordare: i linfociti T-helper follicolari (Tfh); i linfociti T-helper che producono la interleuchina 9 (Th9); i linfociti T regolatori (Treg), che sono identificabili in base alla espressione di CD25 e del fattore di trascrizione FoxP3. Inoltre grazie alla identificazione delle principali citochine che inducono la polarizzazione e dei fattori di trascrizione chiave per la produzione dell'Interleuchina 17, i linfociti Th17 sono stati definitivamente considerati come un nuovo e separato gruppo di linfociti T Helper.

Prima della identificazione delle citochine chiave per la differenziazione dei linfociti Th17, i linfociti CD4+ che producevano IL-17 erano considerate parte della sottopopolazione dei linfociti Th1. La relazione tra questi due distinte linee di linfociti T helper non e' ancora non del tutto chiara. Inizialmente, alcuni studi avevano suggerito la possibilita' che i linfociti T CD4+ che producono IL-17 fossero una linea distinta dai Th1 ma che origina da uno stesso precursore cellulare. A seguito di numerosi studi, ad oggi i linfociti Th17 sono

definiti dalla secrezione dell'interleuchina 17 (IL-17) e dalla espressione del fattore di trascrizione ROR  $\gamma$ t, necessario per la loro differenziazione.

Nell'uomo tutte le cellule Th17 esprimono il recettore CCR6 , il quale dirige il processo di homing di queste cellule verso la cute e alcuni siti mucosali. Inoltre una parte dei linfociti Th17 esprime il recettore CCR5 e il recettore per la migrazione verso l'intestino  $\alpha$ 4 $\beta$ 7, che rappresentano dei co-recettori per l'entry dell'HIV. La maggior parte dei linfociti Th17 esprimono anche il recettore IL23R per l'interleuchina 23, la quale agisce come una citochina proinfiammatoria necessaria per l'espansione e la persistenza di questa classe di linfociti. L'espressione di questi recettori che ne dirigono l'homing, le funzioni pro-infiammatorie e la massiccia presenza a livello della lamina propria del tratto intestinale indicherebbe il ruolo fondamentale dei linfociti Th17 nella difesa mucosale.

I linfociti Th17 rappresentano dal punto di vista immunologico un subset di cellule T effettrici che promuovono il processo di infiammazione stimolando il rilascio di citochine, l'espressione di chemochine e il reclutamento di neutrofili nel sito di infiammazione. I linfociti Th17 sono coinvolti nelle risposte di tipo infiammatorio protettive verso una varietà di batteri e funghi, specialmente a livello dei siti mucosali e della cute. Tuttavia, essi sono stati anche coinvolti in processi infiammatori alla base dei patologie auto-immuni. I linfociti Th17 non producono solamente IL-17, ma possono secernere anche TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-21 e IL-22, tutte citochine con una forte funzione pro-infiammatoria. I linfociti Th17 sono inoltre in grado di reclutare i neutrofili e le cellule mieloidi nei siti effettori attraverso la produzione del fattore stimolante le colonie granulocitiche (G-CSF).

Infine, i linfociti Th17 sono anche coinvolti nei processi di rigenerazione epiteliale a livello dei tessuti mucosali.

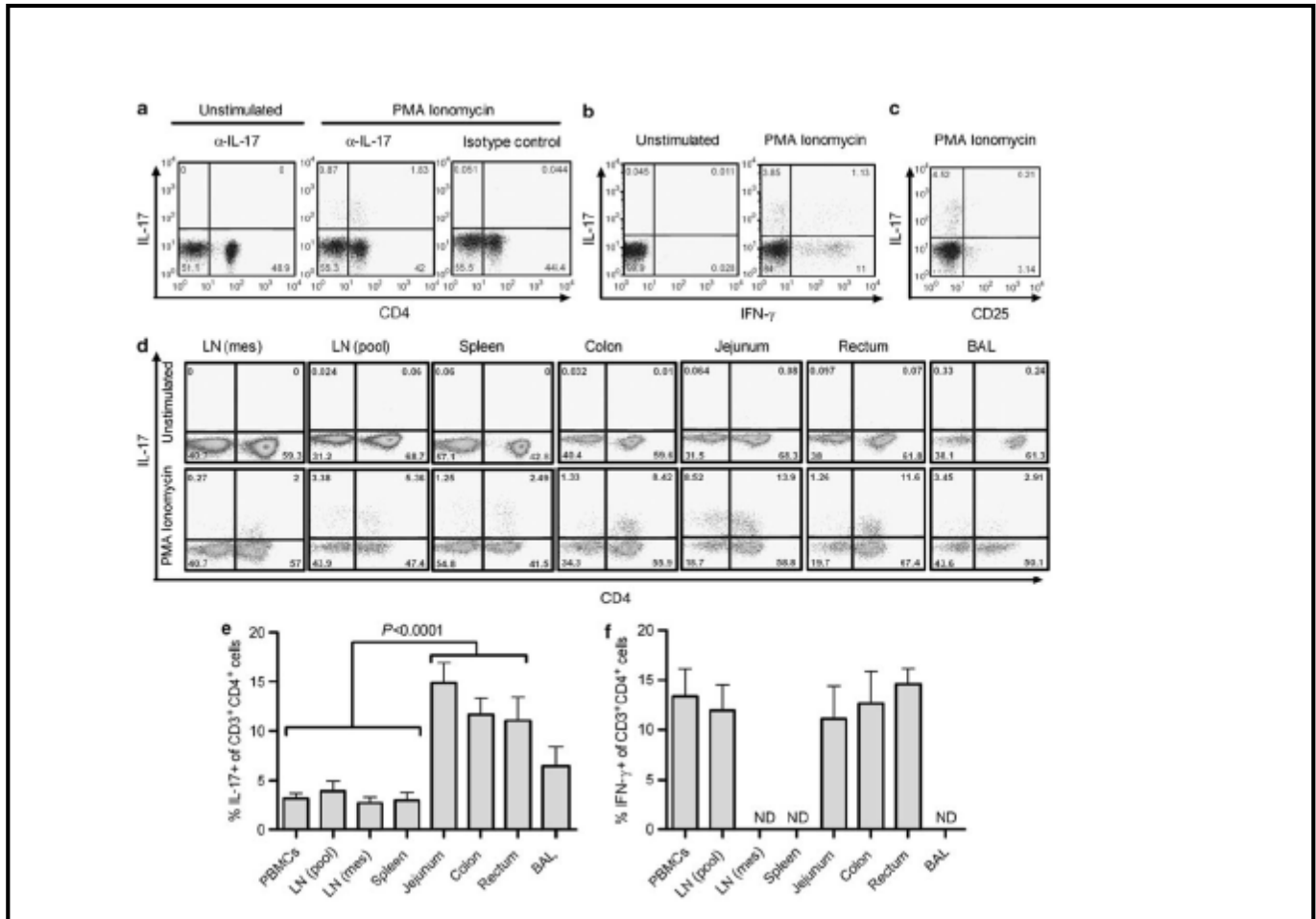
Dal punto di vista funzionale, i linfociti Th17 sono coinvolti nei processi di difesa contro batteri extracellulari come *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium Tuberculosis* e funghi come *Candida albicans*. Inoltre recentemente è stato dimostrato il ruolo fondamentale a livello clinico di questa classe di linfociti. Infatti, i pazienti affetti da sindrome da iper-IgE, la quale è caratterizzata da ricorrenti infezioni da stafilococco e candida, presentano un'alterazione nello sviluppo dei linfociti Th17.

I linfociti Th17 sono inoltre implicati nello sviluppo di diverse patologie auto-immuni. Il ruolo dell'IL-17 è stato recentemente descritto nel corso di patologie come morbo di Crohn, psoriasi e dermatite atopica. Ad esempio, nel caso delle patologie infiammatorie intestinali come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa, esiste una associazione tra l'infiammazione mucosale e il numero di cellule che producono IL-17 a livello della mucosa stessa quando comparata con soggetti sani. Un'aumentata produzione di IL-17 nel plasma è stata inoltre messa in evidenza anche in altre patologie infiammatorie come l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico e lo scleroderma. Numerosi studi sono stati anche iniziati per chiarire le implicazioni del ruolo dei linfociti Th17 durante la progressione verso l'AIDS.

Inizialmente attraverso la collaborazione ad uno studio sulla patogenesi dell'infezione con Simian Immunodeficiency Virus (SIV) nel modello animale condotto presso i laboratori del National Institute of Health (NIH, Bethesda Maryland, USA) è stato

possibile individuare e caratterizzare questa nuova popolazione di Linfociti CD4+ Th17 in rhesus macaques. Poiché è stato ipotizzato che i linfociti Th17 giochino un ruolo importante nella difesa immunitaria antibatterica, in particolare a livello delle mucose, abbiamo voluto studiare e caratterizzare questa popolazione nel modello animale a livello del sangue periferico, dei linfonodi, del broncolavaggio alveolare e del tratto gastrointestinale. Abbiamo dimostrato che è possibile individuare negli animali non infetti una popolazione di linfociti Th17 in grado di produrre l'IL17 dopo stimolazione con PMA e ionomicina.





**Fig 1. La frequenza delle cellule T CD3+ CD4+ che producono IL-17 e' significativamente superiore a livello dei siti mucosali nei modello animale.**

*a) Distinta popolazione di linfociti T CD3+/CD4+ produce IL-17 dopo stimolazione con PMA/ionomycina; b)PBMC ottenuti da rhesus macaques non infetti e stimolati con o senza PMA/ionomycina e anticorpi per IL-17 e IFN $\gamma$ . (Cellule non stimolate a sinistra)*

*c) La maggior parte dei linfociti T CD3+CD4+ che producono IL-17 presentano anche CD25 dopo stimolazione*

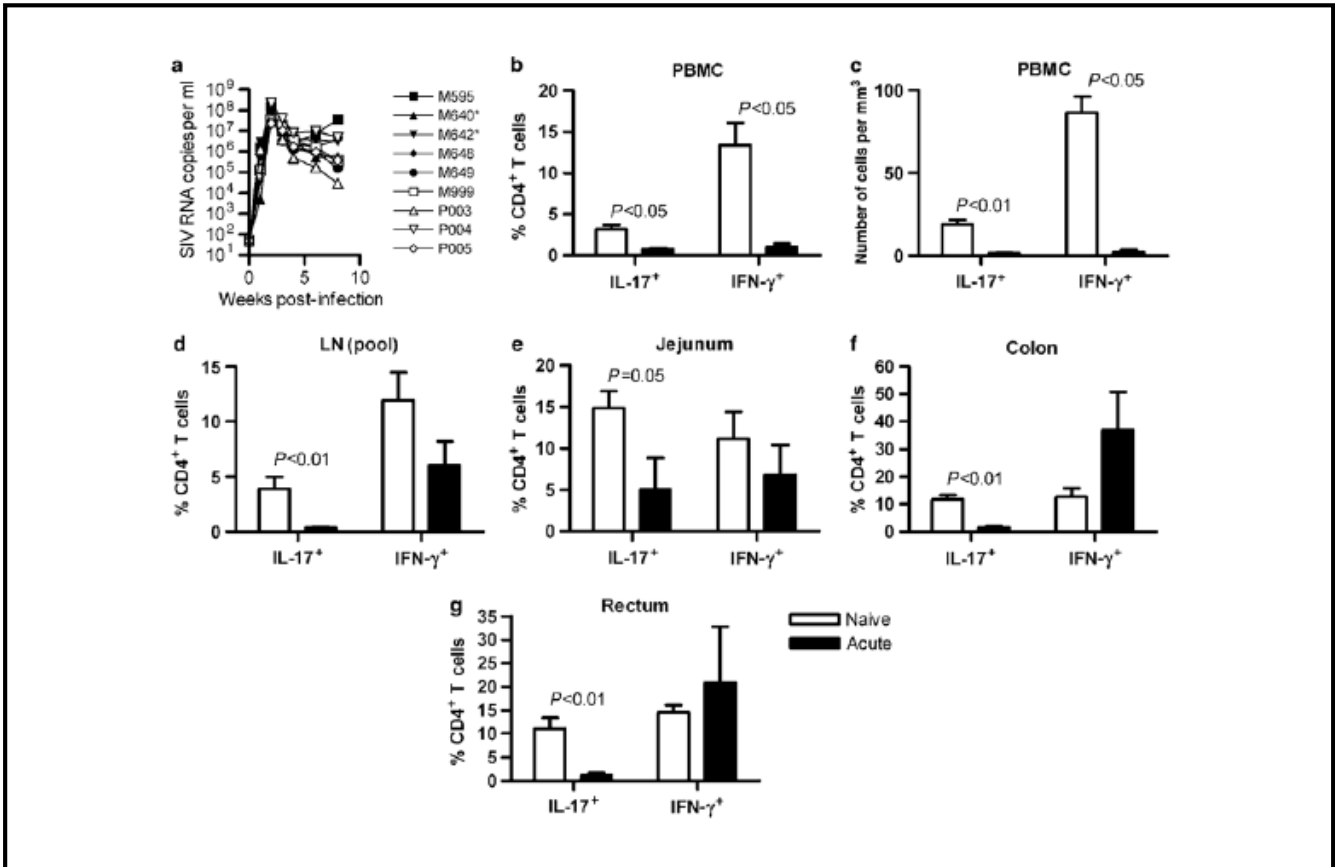
*d) Frequenza delle cellule T CD4+ che producono IL-17 a livello sistemico e dei siti mucosali ottenute da rhesus macaques non infetti.*

Questa classe di linfociti Th17 si distingue nettamente dai linfociti Th1 in grado di secernere IFN- $\gamma$ . Successivamente abbiamo studiato la distribuzione sistemica e mucosale di questi due diversi subsets di linfociti. È stato possibile notare che la frequenza dei linfociti T CD4+ che producono IL17 nel sangue, nella milza e nei linfonodi era minore rispetto a quella individuata a livello dei siti mucosali. Abbiamo quindi osservato che esiste una differenza significativa nella distribuzione dei linfociti Th17 nei diversi compartimenti sistemici e mucosali nei Rhesus macaques non infetti.

L'infezione con il virus patogenico SIV<sub>mac251</sub> altera l'equilibrio dei subsets di linfociti T CD4+ effector a livello delle mucose. Abbiamo osservato che nel corso dell'infezione con SIV sia acuta che cronica il numero di linfociti Th17 e Th1 è ridotto nel sangue e nei linfonodi. Allo stesso modo, abbiamo notato che a livello delle mucose solo la frequenza dei linfociti Th17 è diminuita durante l'infezione primaria. Per di più è importante sottolineare che il numero di linfociti Th17 non viene recuperato ad un livello normale nelle fasi croniche dell'infezione, fatta eccezione per gli animali che presentano la capacità di controllare la replicazione virale.

Il meccanismo che determina l'apparente perdita dei linfociti Th17 rimane poco chiaro. Sembra plausibile che i linfociti Th17 siano cellule altamente attivate a livello dell'apparato gastro-intestinale, a causa della continua esposizione agli antigeni batterici e quindi essere un facile obiettivo per il virus. La perdita dei linfociti Th17 potrebbe generare un circolo vizioso nel corso dell'infezione SIV/HIV: la riduzione delle difese dell'ospite nei confronti dei batteri potrebbe favorire la formazione delle brecce a livello della barriera gastro-intestinale e risultare in un ulteriore incremento della

Immuno-attivazione locale ed una esacerbazione della replicazione virale nell'apparato gastrointestinale.



**Fig 2. Alterazione dell'equilibrio dei linfociti T CD4+ che producono IL-17 ed IFN $\gamma$  nel corso dell'infezione primaria con SIV<sub>mac251</sub>.**

*a) Replicazione virale plasmatica dopo infezione intrarettale con SIV<sub>mac251</sub>.*

*b e c) Frequenza media e numero assoluto di linfociti CD4+ che producono IL-17 e IFN $\gamma$  nei PBMC dei rhesus macaques non infetti e infetti dopo 2 settimane dall'inoculo.*

*d-g) Frequenza media dei linfociti CD4+ che producono IL-17 e IFN $\gamma$  a livello dei linfonodi, digiuno, colon e retto dei rhesus macaques non infetti e infetti dopo 2 settimane dall'inoculo.*

Successivamente è stato dimostrato che anche nell'uomo si assiste ad una preferenziale riduzione dei linfociti Th17 rispetto ai Th1 a livello dell'apparato gastrointestinale, probabilmente come conseguenza della massiva deplezione dei linfociti T CD4+ nel corso dell'infezione acuta. Questa preferenziale e sostenuta perdita dei linfociti Th17 a livello dell'apparato gastro-intestinale anche nei pazienti HIV+ potrebbe perciò avere degli effetti deleteri nel mantenimento della barriera mucosale, sia da un punto strutturale che immunologico, con ridotto controllo dei microbi presenti a questo livello rendendo questi soggetti particolarmente suscettibili al fenomeno della traslocazione batterica.

La prima descrizione del ruolo dei linfociti Th17 nel corso dell'infezione da HIV e' stata riportata da Maek-anantawat et al. nel 2007. Nel loro lavoro, gli Autori stimolarono le cellule mononucleate ottenute dal sangue periferico (PBMC) con PMA e ionomicina e trovarono che i soggetti HIV-1 positivi in Thailandia presentavano un aumento significativo delle cellule T CD4+ che producevano IL-17 quando comparati con soggetti sani. Tuttavia, il ruolo delle cellule Th17 a livello dei tessuti periferici nel corso dell'infezione da HIV rimane ancora poco chiaro. Infatti studi successivi hanno messo in evidenza risultati contrastanti. In particolare e' stato dimostrato che in soggetti che presentano una carica virale >50 copie/ml si assiste ad una riduzione delle Th17 e che esiste una correlazione negativa tra la frequenza dei linfociti Th17 e la carica virale plasmatica.

Diversi studi hanno dimostrato che l' Interleuchina 15 (IL-15) e' in grado di guidare la differenziazione dei linfociti T naive verso la produzione di IL-17. In particolare nei pazienti affetti da Artrite Reumatoide e' stato messo in luce il ruolo dell'IL-15 nella

polarizzazione dei linfociti T naive verso la produzione di IL-17. Inoltre in un recente articolo di El Hed e colleghi, l'IL-15 e' stata utilizzata per guidare la differenziazione dei linfociti T CD4+ verso la produzione di IL-17 e la successiva infezione con HIV-1 *in vitro*. L'IL-15 e' prodotta dalle cellule presentanti antigeni (APC) nelle fasi iniziali della risposta immune nel corso di infezioni, e riveste un ruolo importante nella regolazione della risposta immune innata ed adattativa. Il nostro gruppo ha inoltre dimostrato il ruolo dell'IL15 nell'interazione con le cellule Natural Killer (NK) in corso dell'infezione da HIV. In particolare le cellule NK derivate da pazienti HIV positivi erano in grado di secernere IFN-gamma e CC-chemochine dopo stimolazione *in vitro* con IL15 da sola o in combinazione con IL12.

In questo studio abbiamo quindi voluto valutare l'effetto della stimolazione IL15 *in vitro* sulla secrezione di IL-17 da parte delle cellule mononucleari CD4+ isolate da pazienti affetti da HIV-1 con distinte caratteristiche cliniche e virologiche. I nostri dati mostrano come IL-15 e' capace indurre la produzione di IL-17 dalle cellule CD4+ di pazienti affetti da HIV-1, che la persistente replicazione virale dell'HIV-1 può causare una perturbazione della produzione di IL-17. Infine abbiamo notato che la produzione di IL-17 nei pazienti affetti da HIV può essere recuperata attraverso l'inizio della terapia combinata antiretrovirale nelle prime fasi dell'infezione e la sostenuta soppressione della replicazione virale a livello periferico.

## MATERIALI E METODI

### Popolazione in studio

Hanno partecipato allo studio un totale di 15 pazienti affetti da HIV-1 e 5 controlli sani seguiti presso il Dipartimento di Malattie Infettive e Igiene della Università "Sapienza" di Roma. I pazienti HIV+ sono stati successivamente suddivisi in base alle caratteristiche cliniche e virologiche in 3 gruppi (tab. 1):

- A) Cinque pazienti affetti da HIV erano *naïve* per i farmaci antiretrovirali e presentavano una mediana di linfociti T CD4 + di 689 cellule/mm<sup>3</sup> (range 501-1076 cellule/mm<sup>3</sup>) e mediana della carica virale (VL) di 3514 copie di HIV RNA/ml (range 52-17000 cp / ml);
- B) Cinque pazienti affetti da HIV in trattamento con cART presentavano una sostenuta soppressione virale (<50 copie / ml) e mediana delle cellule CD4+ di 700 cellule/mm<sup>3</sup> (range 314-1164 cellule/mm<sup>3</sup>) al momento del prelievo del sangue.
- C) Cinque pazienti affetti da HIV considerati insuccessi cART, presentavano una mediana di linfociti CD4+ di 325 cellule/mm<sup>3</sup> (range 179-654 cellule/mm<sup>3</sup>) e mediana della carica virale plasmatica di 3000 copie di HIV RNA/ml (range 189-4159 cp/ml).

Tutti i pazienti in trattamento cART hanno ricevuto una combinazione di farmaci inibitori della proteasi o un inibitore non nucleosidico della trascrittasi inversa (NNRTI) con due nucleosidici o nucleotidici della trascrittasi inversa (NRTI) per 48-184 settimane. Nessuna evidenza di infezioni opportunistiche è stata evidenziata al momento del prelievo del campione di sangue. Tutti i partecipanti hanno firmato un consenso informato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Roma "Sapienza", Roma, Italia.

### **Trattamento dei campioni di sangue e isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico.**

Cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di soggetti non infetti da HIV e dei soggetti con infezione da HIV sono stati preparati utilizzando Hypaque-Ficoll e centrifugazione densità (Accuprep, Norvegia). Le cellule mononucleari CD4+ sono state isolate dal resto dei PBMC utilizzando lo staining con anticorpo monoclonale biotinitato anti-CD8, seguito da aggiunta delle sfere magnetiche rivestite con avidina e purificazione attraverso il passaggio in una colonna MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), seguendo le istruzioni del produttore. La purezza delle cellule CD4+ è stata > 95%, misurata mediante citometria di flusso.



## **Stimolazione delle cellule ed ELISA.**

Le cellule mononucleari CD4<sup>+</sup> ( $5 \times 10^5$ /ml) isolate sono stati coltivate in piastre da 24 pozzetti in RPMI 1640 integrato con 2 mM L-glutammina, 10% FCS (Seromed, Berlino, Germania), 100 U / ml di penicillina, 100 mcg / ml streptomicina, e 1 HEPES mM a 37 ° C in una atmosfera del 95% di aria e 5% di CO<sub>2</sub>.

Le cellule sono state stimolate per 72 ore in presenza o in assenza di una miscela di PMA (1 nM) e ionomicina (3 mg / ml) o citochine: IL-15 (0, 1-100 ng / ml; Immunex). Per studiare l'effetto di neutralizzazione di un anticorpo monoclonale anti-IL-15 (anti-IL-15 mAb) sulla produzione di IL-17 indotta da IL-15, i linfociti T CD4<sup>+</sup> sono stati incubati inoltre con IL-15 (100 ng/ml) ricombinante umana con o senza anti-IL-15 mAb (M111, 3 mg) per 30 minuti a 37 ° C . Dopo l'incubazione, i sovranatanti sono stati raccolti e chiariti per centrifugazione a 400 xg per 10 minuti e le concentrazioni di IL-17 sono stati determinati utilizzando umano IL17 kit ELISA (R & S del sistema, Minneapolis, MN).

## **Analisi statistica**

I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. Le coppie di campioni sono stati analizzati mediante appaiati a due code t-test. Correlazione tra IL-17 e IL-15 livelli è stata valutata con coefficiente di correlazione di Pearson. Valori di probabilità <0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

**Tab 1. Caratteristiche epidemiologiche e cliniche dei pazienti partecipanti allo studio.**

	<b>Sesso</b>	<b>Eta'</b>	<b>CD4+ Nadir</b>	<b>HIV-RNA</b>	<b>CD4+ at experiments</b>	<b>Years on cART</b>	<b>cART</b>
<b>Naïve</b>	M	28	600	49	689	0	NA
<b>Naïve</b>	F	33	455	718	1076	0	NA
<b>Naïve</b>	M	38	511	17000	651	0	NA
<b>Naïve</b>	M	37	433	5439	726	0	NA
<b>Naïve</b>	M	41	501	350	501	0	NA
<b>cART success</b>	M	42	289	< 50	314	5	EFV + 3TC- TDF
<b>cART success</b>	M	49	377	< 50	1004	5	EFV + 3TC- TDF
<b>cART success</b>	F	46	362	< 50	700	6	EFV + 3TC- TDF
<b>cART success</b>	F	39	298	< 50	1164	7	ATV/r + 3TC-TDF
<b>cART success</b>	M	29	287	< 50	300	2	ATV/r + 3TC-TDF
<b>cART failure</b>	M	37	89	150	654	7	EFV + 3TC-TDF
<b>cART failure</b>	F	45	116	220	500	8	EFV + 3TC-TDF
<b>cART failure</b>	M	39	155	4159	325	8	LPV/r + 3TC-TDF
<b>cART failure</b>	M	34	134	3996	179	6	LPV/r + 3TC-TDF
<b>cART failure</b>	F	41	75	3000	265	8	ATV/r + 3TC-TDF

## RISULTATI

**IL-15 aumenta in maniera dose dipendente la produzione di IL-17 da parte delle cellule CD4+ dei soggetti sani.**

Abbiamo stimolato le cellule mononucleate CD4+ dei soggetti sani partecipanti allo studio con diverse concentrazioni di IL-15 (10 ng/ml; 50 ng/ml; 100 ng/ml) per studiare l'effetto sulla produzione di IL-17. Abbiamo osservato che la stimolazione *in vitro* con differenti concentrazioni di IL15 induceva un significativo aumento della produzione di IL-17 da parte delle cellule mononucleate CD4+. La secrezione di IL-17 aumentava in maniera dose dipendente a seconda delle diverse concentrazioni di IL-15. Inoltre l'aggiunta alla coltura di un anticorpo monoclonale anti-IL-15 riduceva significativamente la secrezione di IL-17 da parte dei linfociti T CD4+ dei soggetti sani ( $P:0.02$ ). Possiamo quindi affermare alla luce dei risultati di questi primi esperimenti che IL-15 e' in grado di indurre la produzione e la secrezione di IL-17 nelle nostre colture cellulari. (fig.1a)

**IL15 induce la produzione di IL17 da parte delle cellule mononucleate CD4+ dei pazienti HIV+ con soppressione della replicazione virale.**

Abbiamo notato la presenza di una differenza significativa nella secrezione *in vitro* di IL-17 da parte delle cellule mononucleate CD4+ stimolati con IL-15 (50 ng/mL) isolate dai pazienti che presentavano una replicazione virale misurabile nel plasma (VL > 50 copie/ml) quando comparati con le cellule mononucleate CD4+ dei pazienti che presentavano una soppressione della replicazione virale (VL < 50 copie/ml) ( $P: 0.01$ ) e i soggetti sani ( $P: 0.001$ ) rispettivamente (fig. 1b)

Successivamente, abbiamo separato i pazienti HIV+ in base alle caratteristiche cliniche e virologiche. Abbiamo dimostrato la presenza di un significativo aumento della secrezione di IL-17 delle cellule mononucleate CD4+ dei pazienti HIV+ trattati con successo con cART quando comparati con la secrezione da parte delle cellule mononucleate CD4+ dei pazienti in cART ma in fallimento virologico ( $P:0.02$ ). Interessante, le cellule CD4+ stimolate con IL-15 dai pazienti naive presentavano una differenza significativa nella secrezione di IL-17 quando comparate con le cellule dei pazienti in cART in fallimento virologico ( $P: 0.02$ ) ma solo un trend quando comparati alla secrezione delle cellule mononucleate CD4+ dei pazienti in trattamento cART con soppressione della carica virale ( $P: 0.07$ ) (fig.2)

## DISCUSSIONE

Lo scopo di questo studio era di valutare l'effetto della stimolazione con IL-15 *in vitro* sulla produzione di IL-17 dalle cellule mononucleate CD4+ di pazienti affetti da HIV-1. Abbiamo dimostrato che IL-15 presenta un effetto dose-dipendente sulla produzione di IL-17 da parte delle cellule mononucleate CD4+ ottenute da donatori sani. E' noto che l'IL-15 e' in grado di aumentare la proliferazione delle cellule T e di regolare l'omeostasi dei linfociti T attraverso una serie di eventi intracellulari che coinvolgono l'attivazione di molecole di segnalazione intracellulare come JAK3 e trasduttore di segnale e come STAT5 e STAT3 attivatore. Quest'ultimo fattore di trascrizione nucleare è anche fondamentale per la differenziazione delle cellule Th17 indotta da IL-6 e TGF- $\beta$ . Possiamo quindi speculare che IL-15 induca la produzione di IL17 in maniera dose-dipendente da parte dei linfociti T CD4+ usando lo stesso pattern di segnali intracellulari.

Sebbene esista una ampia evidenza del ruolo sia protettivo che nocivo dei linfociti Th17 durante le risposte immuni, la loro funzione nel corso dell'infezione da HIV non e' stata ancora completamente chiarita. Tuttavia la perdita di cellule Th17 in soggetti con infezione da HIV potrebbe avere conseguenze indirette come ad esempio rendendoli più inclini ad infezioni batteriche opportunistiche e fungine. La concentrazione di cellule Th17 a livello dei tessuti della mucosa e la loro perdita selettiva in queste regioni durante l'infezione da HIV-1 potrebbero anche facilitare la

translocazione microbica attraverso la mucosa stessa e a sua volta potrebbe coadiuvare il processo di attivazione sistemica del sistema immunitario che contribuisce alla patogenesi dell'HIV.

A nostro parere, la secrezione di IL-17 dai parte delle cellule CD4 + nel sangue periferico può essere parzialmente restaurato attraverso l'inizio di un trattamento antiretrovirale efficace nelle fasi iniziali dell'infezione da HIV-1. Anche se le caratteristiche cliniche della nostra popolazione selezionata può aver influenzato la risposta alla stimolazione IL-15 *in vitro*, abbiamo notato che la IL-17 secrezione dalle cellule CD4 + dei pazienti con fallimento virologico è risultata significativamente inferiore rispetto a pazienti affetti da HIV trattati con successo e controlli sani. Non è stata osservata alcuna differenza significativa nella secrezione di IL-17 da parte dei linfociti T CD4 + dei donatori sani e pazienti affetti da HIV con carica virale non rilevabile, anche se la produzione IL-17 è stata inferiore nel secondo gruppo di pazienti in studio.

L'HIV-1 può causare una alterazione multiforme delle cellule Th17 e della loro funzione. Sia direttamente attraverso l'infezione di cellule T CD4 + attivate che co-esprimono i recettori CCR5 e CCR6, che rappresentano una grande percentuale di cellule che producono IL-17 e la successiva deplezione di questa classe di linfociti. Sia attraverso il processo di attivazione del sistema immunitario indotta dall'infezione da HIV-1 stessa il

quale indirettamente crea uno squilibrio immunologico che si traduce in polarizzazione verso altri sottoinsiemi T helper.

Studi recenti sostengono la nostra ipotesi. È stato dimostrato che la soppressione completa della viremia in bambini affetti da HIV-1 ha indotto un aumento della produzione IL-17. Nello stesso studio gli autori hanno messo in evidenza la presenza di una notevole riduzione nelle cellule Th17 nei soggetti infetti da HIV-1 quando comparati con i bambini non infetti, mostrando una correlazione positiva tra la carica virale superiore alle 50 copie/ml e la riduzione dei linfociti Th17. Gli autori hanno ipotizzato che le cellule Th17 non sono direttamente infettate e deplete da HIV, ma piuttosto che la loro differenziazione non è sostenuta *in vivo* nei pazienti HIV-1 positivi con un'alta carica virale. Inoltre a seguito di un trattamento anti-retrovirale a lungo termine è stato messo in evidenza un ripopolamento parziale ma significativo di cellule che producono IL-17 nella mucosa del colon sigmoide di pazienti affetti da HIV-1. Più recentemente uno studio di 33 pazienti HIV seguiti per 12 mesi dopo l'inizio della terapia antiretrovirale ha messo in evidenza una normalizzazione dell'equilibrio tra le cellule Th17 e Treg, dimostrando l'aumento della frequenza di cellule che producono IL-17 dopo 6 e 12 mesi di terapia antiretrovirale.

È interessante notare una differenza significativa nella secrezione di IL-17 è stata trovata tra i linfociti T CD4+ dei pazienti affetti da HIV naive per il trattamento anti-retrovirale con una carica virale plasmatica rilevabile rispetto ai pazienti affetti da HIV con viremia rilevabile in fallimento virologico nel corso della terapia anti-retrovirale. Sebbene i pazienti naive per il trattamento anti-retrovirale presentavano un maggior

numero di linfociti T CD4 +, a nostro parere i linfociti T CD4 + dei questi soggetti in studio presentavano una conservata funzionalità e plasticità che ha permesso una adeguata risposta alla stimolazione *in vitro* con IL-15. Questo risultato è in linea con i dati recentemente pubblicati mostrano la persistenza di una popolazione Th17 a Long-Term-non-Progressors pazienti affetti da HIV nel sangue periferico e nella mucosa intestinale. La conservazione di questo sottogruppo di linfociti T effettori soprattutto a livello delle mucose potrebbe aiutare al mantenimento di una efficace risposta immunitaria e di una forte barriera contro la traslocazione microbica. Di conseguenza, questo potrebbe spiegare il più basso livello di attivazione immunitaria e la lenta progressione della malattia in questa popolazione di pazienti affetti da HIV.

Ci sono alcune limiti nel nostro studio, che devono essere prese in considerazione. In primo luogo i nostri risultati devono essere confermati in studi di coorte di grandi dimensioni, dato il piccolo campione della popolazione studiata. Inoltre non abbiamo valutato l'effetto della stimolazione con IL-15 *in vitro* su i linfociti Th17 ottenuti dalla mucosa intestinale, i linfociti T CD4+ e le cellule NK isolate dal sangue. E' noto che l'HIV-1 induce la deplezione delle Th17 nell'intestino durante le fasi iniziali di replicazione e che la conservazione di linfociti T che producono IL-17 nella mucosa intestinale è associata ad una più lenta progressione della malattia. Sarebbe quindi interessante studiare l'effetto della terapia anti-retrovirali a livello di diversi ambiente immunologici come appunto la mucosa intestinale nei pazienti affetti da HIV-1.

In conclusione, abbiamo dimostrato che IL-15 può indurre la secrezione di IL-17 da



parte dei linfociti T CD4+ dei soggetti sani e dei pazienti affetti da HIV-1. Inoltre abbiamo messo in evidenza la presenza di una correlazione inversa tra la carica virale plasmatica di HIV-1 e la secrezione di IL-17 da parte dei linfociti T CD4+. Questi risultati supportano l'ipotesi che una soppressione della replicazione virale dell'HIV-1 al di sotto del livello rilevabile permette un ripristino parziale del Th17. Ulteriori studi sono necessari al fine di capire il ruolo dei linfociti Th17 nella patogenesi dell'HIV-1 e il ripristino della loro funzionalità nei diversi ambienti immunologici a seguito della terapia anti-retrovirale.

Fig.1a

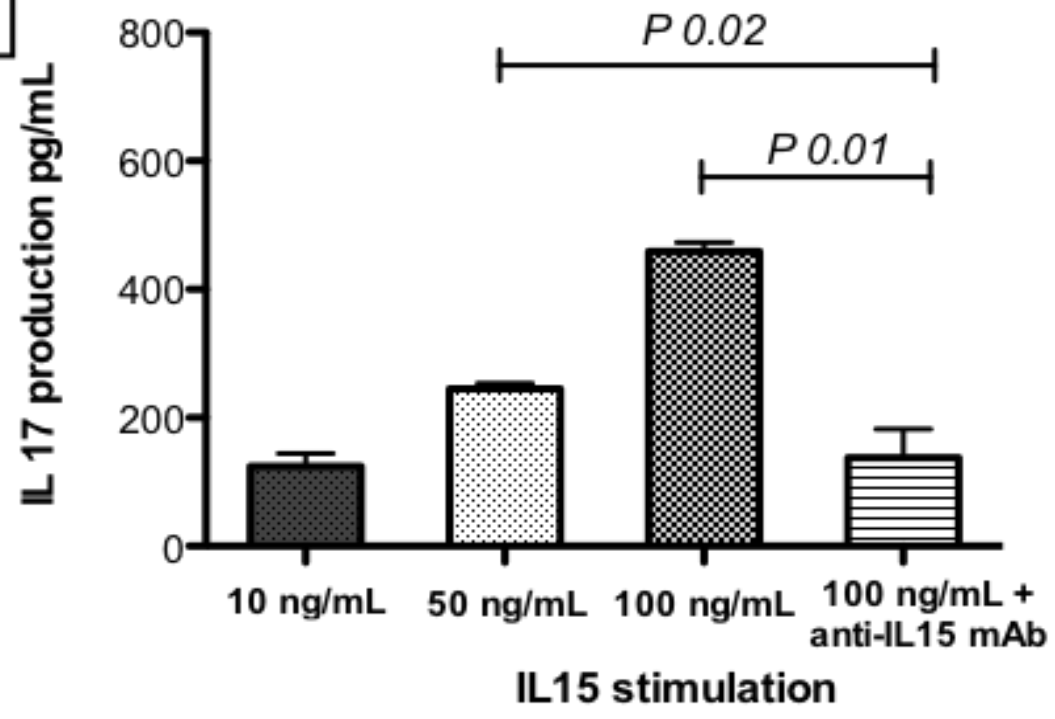
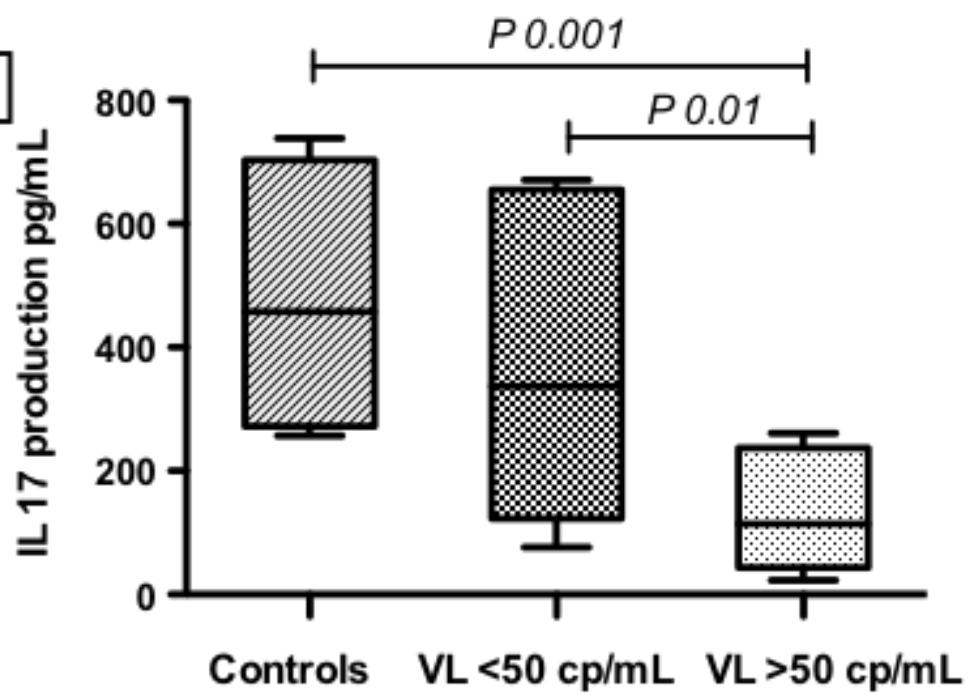
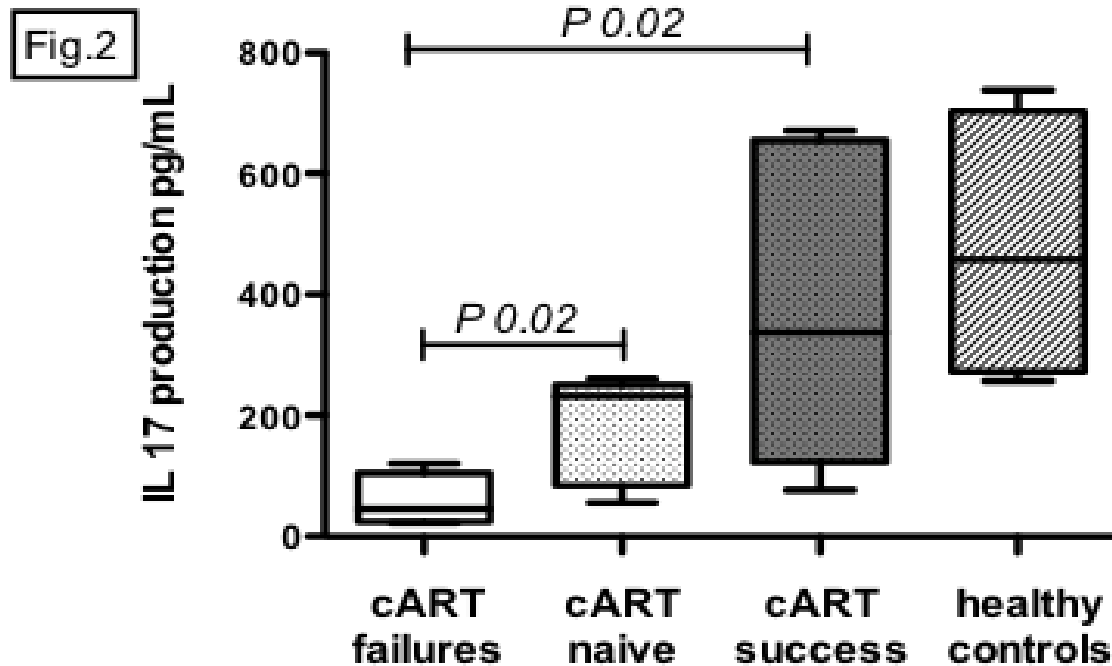


Fig. 1b



**Fig.1a,b: La stimolazione con IL-15 induce la produzione IL-17 da parte delle cellule T CD4 + isolate da PBMC umani ed è influenzato dalla viremia HIV.**

- a) *La stimolazione con quantità crescenti di IL-15 (10 ng/ml, 50 ng/mL e 100 ng/mL) induce in maniera dose-dipendente la produzione di IL-17 da parte delle cellule T CD4+ dei controlli sani (n = 5). L'aggiunta di anticorpo monoclonale anti-IL15 riduce significativamente la produzione di IL-17 da parte dei linfociti T CD4+ quando stimolati con IL15 (50 ng / mL e 100 ng / mL).*
- b) *Elevata produzione IL-17 in seguito alla stimolazione con IL-15 da parte dei linfociti T CD4 + di pazienti affetti da HIV con carica virale inferiore a 50 copie / ml (n = 5) rispetto alla produzione delle cellule T CD4 + di pazienti affetti da HIV con VL superiore a 50 copie/mL (n = 10, pazienti in fallimento virologico e naive alla terapia cART). Nessuna differenza significativa è stata osservata nella produzione di IL-17 da parte dei linfociti T CD4+ dei controlli sani (n = 5) e soggetti con infezione da HIV che presentano carica plasmatica virale inferiore alle 50 cp / mL.*



**Fig.2 Livello di produzione di IL-17 da parte dei linfociti T CD4 + di pazienti affetti da HIV.**

*Livelli di produzione di IL-17 sono stati confrontati tra i pazienti HIV-positivi con fallimento virologico durante la terapia cART ( 5 pazienti, failures cART) , i pazienti naive ai farmaci anti-retrovirali (5 pazienti,cART naive), i pazienti con carica virale non rilevabile durante la terapia CART ( 5 pazienti, cART success) e i controlli sani (5 individui, healthy controls). Significa differenza nella produzione di IL-17 da parte delle cellule mononucleate CD4+ dopo stimolazione con IL-15 dei pazienti in successo terapeutico rispetto ai pazienti con fallimento*

virologico ( $p: 0,02$ ), e dei pazienti viremici ma naive alla terapia cART in confronto dei pazienti in fallimento virologico ( $p:0,02$ ).

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "SAPIENZA"**



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dipartimento di Sanita' Pubblica e Malattie Infettive

Dottorato di ricerca in Scienze Infettivologiche e Terapie Immunologiche

**The effect of cART on IL-17 production in patients with HIV-1  
Infection.**

Relatori:

- Prof. Vincenzo VULLO
- Dott.ssa Gabriella D'ETTORE

Candidato: Lorenzo ZAFFIRI

## INTRODUCTION

Combination antiretroviral therapy (cART) can induce persistent suppression of viral replication of Human Immunodeficiency Virus (HIV) leading to a substantial reduction of mortality in HIV-1 positive. However, despite the significant benefits gained from treatment, people with HIV continue to present a series of immunological phenomena arising from a state of chronic systemic immune activation. HIV-1 infection is characterized by a progressive loss of CD4 + T cells and a severe deregulation of the immune system, which determines the development of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The pathogenesis of HIV infection is particularly complex and begins its course during the acute phase of infection with a robust viral replication and depletion of CD4 + lymphocytes in mucosal. The main receptor for HIV-1 entry are considered the CD4 + and CCR5+ receptors that are widely expressed by memory T cells. These memory cells are particularly numerous in the tissue associated with mucosal lymphocytes, while in the peripheral blood and lymph nodes are primarily CD4 + but CCR5 -, thus they are spared during the acute phase of infection.

It is well known that naïve CD4+ T cells differentiate into Effector T cells following stimulation by antigen-presenting cells (APC) and the interaction between the T cell receptor (TRC) and the MHC expressed by APC. The CD4 + T cells can differentiate into different subsets depending on the type of antigen presented, the interaction with cells of the APC and cytokine milieu present locally. The

heterogeneity of these cells ensures activation of different types of response by the immune system. In fact, the activation of different subpopulations of CD4 + T cells results in the production of distinct patterns of cytokines, which in turn signal the presence of antigen and induce the response of different cells of the immune system. The T-helper lymphocytes have been traditionally classified according to the profile of cytokines produced in two major subpopulations: Th1 and Th2 lymphocytes.

The Th1 lymphocytes, which are considered the mediators of the cellular immune response, characterized by the production and secretion of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and interleukin 2 (IL-2). While Th2 lymphocytes are considered the mediators of the humoral immune response and to this end produce a particular group of cytokines: interleukin 4 (IL-4), interleukin 5 (IL-5) and interleukin 13 (IL-13).

Recently, new subpopulations of helper T cells have been identified, which expands the Th1/Th2 paradigm. Among these we must remember: the follicular T-helper lymphocytes (TFH), T-helper lymphocytes that produce interleukin 9 (Th9), regulatory T lymphocytes (Treg), which can be identified based on the expression of CD25 and factor FoxP3 transcription. Following the identification of the main cytokines and essential transcription factors to the production of interleukin 17, the Th17 lymphocytes were finally considered as a new and separate group of helper T lymphocytes.

Before the identification of cytokines for Th17 differentiation, the CD4+ T lymphocytes that produced IL-17 were considered part of the



subpopulation of Th1 lymphocytes. The relationship between these two distinct lines of helper T lymphocytes is not still entirely clear. Initially, some studies have suggested the possibility that the CD4+ T cells that produce IL-17 were distinct from Th1, but a line that originates from the same precursor cell. To date following numerous studies, the Th17 lymphocytes are defined by the secretion of interleukin 17 (IL-17) and the expression of the transcription factor ROR  $\gamma$ t, required for their differentiation. The Th17 cells in humans all express the CCR6 receptor, which directs the process of homing of these cells to the skin and mucosal sites. In addition, a part of Th17 lymphocytes express the CCR5 receptor and the  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 receptor for migration to the intestine, which are co-receptors for HIV entry. Most of Th17 cells are thought to express the receptor for interleukin 23 (IL23R), which acts as a pro-inflammatory cytokine necessary for expansion and persistence of this class of lymphocytes. Through the expression of these receptors and the massive presence of these lymphocytes in the lamina propria of the intestinal tract would indicate the fundamental role of these cells in mucosal defense. Th17 lymphocytes from the immunological point of view represent a subset of effector T cells that promote the process of inflammation by stimulating the release of cytokines, the expression of chemokines and recruitment of neutrophils at the site of inflammation. Th17 lymphocytes are involved in the protective inflammatory responses to a variety of bacteria and fungi, particularly at mucosal sites and skin. However, they were also involved in inflammatory processes underlying the autoimmune diseases.

From a functional standpoint, the Th17 cells are involved in the processes of defense against extracellular bacteria such as *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* and fungi such as *Candida albicans*. Also recently, it has been demonstrated the critical role at the clinical level of this class of lymphocytes. In fact patients with hyper-IgE syndrome and which is a syndrome characterized by recurrent staphylococcal infections and candida, have an alteration in the development of Th17 cells.

Initially through a collaboration study on the pathogenesis of infection with Simian Immunodeficiency Virus (SIV) in animal models conducted at the laboratories of the National Institutes of Health (NIH, Bethesda, Maryland, USA) and it was possible to identify and characterize this new population of CD4 + Th17 in the animal model. Since it has been hypothesized that Th17 cells play an important role in the antibacterial immune defense, especially in mucous membranes, we wanted to study and characterize this population in the animal model in the peripheral blood, lymph nodes, the alveolar tract (BAL) and the gastrointestinal tract. We have shown that it is possible to identify animals in the uninfected population of Th17 lymphocytes capable of producing on 17 after stimulation with PMA and ionomycin. This class of Th17 cells is quite distinct from Th1 cells capable of secreting IFN- $\gamma$ . We then studied the mucosal and systemic distribution of these two different subsets of lymphocytes. It was possible to note that the frequency of CD4 + T cells that produce IL-17 in the blood, spleen and lymph nodes was lower than the frequency found at mucosal sites. We observed that there is a significant difference in

the distribution of Th17 lymphocytes in systemic and mucosal compartments in rhesus macaques not infected.

Infection with the pathogenic virus SIVmac251 alters the balance of subsets of effector CD4 + T cells in the mucous membranes. It is possible to observe that in the course of acute and chronic infection the number of both Th1 and Th17 subsets of lymphocytes is reduced in the blood and lymph nodes. At the same time we observed that only the mucosal frequency of Th17 lymphocytes decreased during primary infection. Moreover it is important to emphasize that the number of Th17 cells is not recovered to a normal level in the chronic phase of infection, except for animals that have the ability to control viral replication. The mechanism that determines the apparent loss of Th17 cells remains unclear. It seems plausible that Th17 cells are highly activated cells in the gastro-intestinal tract, due to continuous exposure to bacterial antigens and thus be an easy target for the virus. The loss of Th17 cells could generate a vicious cycle of infection during SIV / HIV: reduce host defenses against bacteria may promote the formation of gaps in the gastro-intestinal barrier and result in a further increase in immune-local activation and an exacerbation of viral replication in the gastrointestinal system.

It was subsequently demonstrated that in humans there is a preferential reduction in Th17 compare to Th1 cells in the gastrointestinal tract, probably as a result

of massive depletion of CD4 + T cells during acute infection. This preferential and sustained loss of Th17 cells in the gastro-intestinal tract in HIV + patients may therefore have deleterious effects in the maintenance of mucosal barrier, from both a structural and immunological, with reduced control of microbes at this level, making these patients particularly susceptible to the phenomenon of bacterial translocation. The first description of the role of Th17 lymphocytes in the course of HIV infection was reported by Maek-anantawat and colleagues in 2007. In their work, the Authors stimulated mononuclear cells obtained from peripheral blood (PBMCs) with PMA and ionomycin and found that HIV-positive in Thailand showed a significant increase in CD4 + T cells producing IL-17 when compared with healthy subjects. However, the role of Th17 cells in peripheral tissues in the course of HIV infection remains unclear. In fact, subsequent studies have shown conflicting results, in particular, it has been shown that in individuals with a viral load > 50 copies / ml there is a reduction of the Th17 and more interestingly a negative correlation between the frequency of Th17 cells and plasma viral load.

Several studies have shown that the Interleukin 15 (IL-15) is able to drive the differentiation of naive T lymphocytes to the production of IL-17. Particularly in patients with rheumatoid arthritis (RA) it was highlighted the role of IL-15 in the polarization of naive T lymphocytes to the production of IL-17. Also in a recent article by El Hed and colleagues, IL-15 was used to guide the differentiation of CD4 + T cells towards the production of IL-17 and subsequent infection with HIV-1 in vitro. The IL-15 is produced by antigen-presenting cells (APC) in the early stages of the

immune response during infection and plays an important role in the regulation of innate and adaptive immune response. Our group has also demonstrated the role of IL-15 interaction with APC and natural killer (NK) in the course of HIV infection. In particular, NK cells derived from HIV-positive patients were able to secrete IFN-gamma and CC- chemokines after *in vitro* stimulation with IL-15 alone or in combination with IL-12.

In this study we therefore wanted to evaluate the effect of IL-15 *in vitro* stimulation on the secretion of IL-17 by CD4 + T cells isolated from HIV-infected patients with distinct clinical and virological characteristics. Our data show that IL-15 is able to induce the production of IL-17 by CD4 + T cells of HIV-infected patients. Moreover we demonstrated that the persistent viral replication of HIV-1 can cause a disruption of the production of IL-17. Finally we noticed that the production of IL-17 in patients with HIV can be recovered by the start of antiretroviral combination therapy in the early stages of infection and sustained suppression of viral replication in the periphery.

## **METHODS**

### **Study population**

Study participants included a total of 15 HIV-infected patients and 5 healthy controls from the Department of Infectious Diseases and Igiene of Sapienza University of Rome. Five HIV-infected patients were naive for antiretroviral drugs and presented median CD4+ cell-counts of 689 cells/mm<sup>3</sup> (range 501-1076 cells/mm<sup>3</sup>) and median Viral Load (VL) of 3514 HIV RNA copies/ml (range 52-17000 cp/ml); Five HIV-infected patients treated with combined Anti-Retroviral Therapy (cART) presenting sustained viral suppression (< 50 copies/ml) and median CD4+ cells-count of 700 cells/mm<sup>3</sup> (range, 314-1164 cells/mm<sup>3</sup>) at the moment of the blood draw (cART success). Five HIV-infected patients considered cART failures, presented a median CD4+ count of 325 cells/mm<sup>3</sup> (range, 179-654 cells/mm<sup>3</sup>) and median plasma VL of 3000 HIV RNA copies/ml (range 189- 4159 cp/ml). All the patients had received combination of a Protease Inhibitors or Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI) with two Nucleoside or Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) for 48-184 weeks. No evidence of active opportunistic infections was found at the time of blood sample handling. All individuals signed informed consents approved by the Institutional Review Board of University of Rome “ Sapienza”, Rome, Italy.

### ***Processing of Blood Samples and Cell Isolation.***

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from blood of HIV-uninfected and HIV-infected subjects were prepared using Hypaque-Ficoll density centrifugation (Accuprep, Norway). CD4+ T-cells were isolated staining PBMC with biotinylated anti-CD8 followed

by avidin-coated magnetic beads and purified over a MACS column (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), following the manufacturer's instructions. Cell purity was > 95%+, as measured by flow cytometry.

### ***Cell stimulation and ELISA.***

Freshly isolated CD4+ T-Cells ( $5 \times 10^5$ /ml) were cultured in 24-well plates in RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% FCS (Seromed, Berlin, Germany), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 1 mM HEPES at 37°C in an atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were stimulated for 72 h in the presence or absence of a mixture of PMA (1 nM) and ionomycin (3 µg/ml), or cytokine: IL-15 (0, 1–100 ng/ml; Immunex). To study the effect of neutralizing anti-IL-15 mAb on IL-15-induced production of IL-17, recombinant human IL-15 (100 ng) was incubated with or without anti-IL-15 mAb (M111, 3 µg) or normal mouse mAb (3 µg) for 30 min at 37°C before addition to cell cultures. After incubation, culture supernatants were collected and clarified by centrifugation at 400 x g for 10 min and concentrations of IL 17 were determined using human IL17 ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN).

### ***Statistical analysis.***

Data are expressed as mean ± SEM. The paired samples were analyzed by paired two-

tailed t-test. Correlation between IL-17 and IL-15 levels was assessed with Pearson's correlation coefficient. Probability values  $<0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

We stimulated the CD4<sup>+</sup> mononuclear cells from healthy subjects with increasing concentration of IL15 in order to detect the production IL17 *in vitro*. The stimulation *in vitro* with increasing amount of IL15 induced a statically significant and dose-dependent rise in the production of IL17 by the CD4<sup>+</sup> mononuclear cells. The addition of monoclonal anti-IL15 antibody significantly reduced the secretion of IL17 from the CD4<sup>+</sup> mononuclear cells isolated from the healthy donors when stimulated with IL15 50 ng/mL and 100 ng/mL ( $P: 0.02$  and  $0.01$ , respectively). (Fig.1a)

Subsequently we decided to evaluate the effect of *in vitro* stimulation with IL15 on the secretion of IL17 from CD4<sup>+</sup> mononuclear cells of HIV-infected patients. We observed a significant difference in the secretion *in vitro* of IL17 from IL15 stimulated- CD4<sup>+</sup> mononuclear cells of HIV-infected patients with detectable viral load (VL) when compared to IL15-stimulated- CD4<sup>+</sup> mononuclear cells of HIV-infected subjects with undetectable VL ( $P 0.01$ ) and healthy controls ( $P 0.001$ ) respectively. (Fig.1b)

In order to study the effect of HIV infection on the IL17 production, we separated the HIV-infected patients on the basis of their immunological and virological characteristics. We noticed a statistically significant increased production of IL17 from the CD4<sup>+</sup>



mononuclear cells of HIV-infected patients with undetectable VL during cART when compared to HIV-infected patients presenting a virological failure in cART (p: 0.02). Interestingly the IL15 stimulated- CD4+ mononuclear cells of the HIV-infected patients naïve to anti-retroviral treatment demonstrated a significant difference in the IL17 secretion when compared to CD4+ mononuclear cells from the patients with virological failure (p: 0.02) but only a trend with CD4+ mononuclear cells from successfully treated HIV+ patients (p: 0.07). (Fig.2)

## **DISCUSSION**

The aim of this study was to investigate the potential effect of IL15 stimulation in vitro on the production of IL17 by CD4+ mononuclear cells of HIV-infected patients. We demonstrated that IL15 presents a dose-dependent effect on the production of IL17 from CD4+ mononuclear cells of healthy donors. IL15 is known to enhance T cell proliferation and homeostasis through a variety of intracellular events involving the activation of intracellular signaling molecules as JAK3 and signal transducer and activator such as STAT5 and STAT3. The latter nuclear transcription factor is also critical for IL6- and TGF- $\beta$ -induced differentiation of Th17 cells. Thus it is likely that IL15 induce a dose-dependent IL17 production from human CD4+ T-cells using the same intracellular pathway.

In our opinion, the IL17 secretion from CD4+ mononuclear cells in the peripheral blood can be partially restored beginning a successful antiretroviral treatment in the early phases of the HIV-1 infection. Although the clinical characteristics of our selected population may

have influenced the response to the IL15 stimulation *in vitro*, we noticed that IL17 secretion from the CD4<sup>+</sup> mononuclear cells of patients with virological failure was significantly lower than in HIV-infected patients successfully treated and healthy donors. We did not observe any significant difference in the IL17 secretion from the CD4<sup>+</sup> T-cells of the healthy donors and the HIV-infected patients with undetectable VL, although the IL 17 production was lower in the latter. The HIV-1 infection can cause a multifaceted alteration of Th17 cells directly through the infection of activated CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> and CCR6<sup>+</sup> T cells, which represent a large percentage of IL17-producing T cells. In addition, the HIV-induced systemic immune activation indirectly creates an immunological unbalance which results in polarization toward other T helper subsets. Recent studies support our hypothesis as the complete suppression of HIV viremia in HIV-infected children induced an increased IL17 production. Moreover partial but significant repopulation of IL17 producing cells in the sigmoid mucosa of HIV-infected patients has been showed following a long term anti-retroviral treatment.

Interestingly a significant difference in IL17 secretion was found between CD4<sup>+</sup> mononuclear cells of HIV-infected patients cART-naïve with detectable VL when compared to HIV- infected patients with detectable HIV viremia failing the cART. The HIV-infected patients naïve to cART presented a highest number of CD4<sup>+</sup> T-cells. In our opinion the preserved functionality and plasticity of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of the naïve subjects prompted an adequate response to the *in vitro* stimulation with IL15. This finding is in line with recently published data showing the persistence of a Th17 population in Long-Term-Non-Progressors HIV-infected patients in the peripheral blood and in the gut mucosa. The

preservation of this subset of effector T lymphocytes may reflect the lower level of immune activation and disease progression in this population of HIV-infected patients.

There are some limitations in our study, which need to be considered. Firstly our findings need to be confirmed in large cohort studies, given the small sample of the population studied. In addition we did not evaluate the effect of the in vitro IL15 stimulation on Th17 from the gut mucosa. It is known that the HIV-1 infection induces the depletion of Th17 in the gut and in the peripheral blood. Moreover the preservation of IL17-producing T lymphocytes in the gut mucosa is associated with a slower progression of the disease. It would be therefore interesting studying the effect of successful anti-retroviral treatment in different immunological environment in the HIV-infected patients.

## BIBLIOGRAFIA

- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, et al.. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 2007 Sep;8(9):942-9.
- Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* 2008, 214: 231-241.
- Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Th17 and mucosal host defense. *Semin Immunol* 2007, 19:377-382.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006 May 11;441(7090):235-8.
- Brenchley Jm, Paiardini M, Knox KS, et al. Differential Th17 CD4T cell depletion in pathogenic and non pathogenic lentiviral infections. *Blood*, 2008, 112: 2826-2835.

- Brüstle A, Heink S, Huber M, et al. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol.* 2007 Sep;8(9):958-66.
- Cecchinato V, Trindade CJ, Laurence A, et al. Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Mucosal Immunol.* 2008 Jul;1(4):279-88.
- Chen Z, O'Shea JJ. Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine.* 2008 Feb;41(2):71-8.
- Chege D, Sheth PM, Kain T, et al. Sigmoid Th17 populations, the HIV latent reservoir, and microbial translocation in men on long-term antiretroviral therapy. *AIDS,* 2011 Mar 27;25(6):741-9.
- Ciccone EJ, Greenwald JH, Lee PI, et al. CD4+ T Cells, Including Th17 and Cycling Subsets, Are Intact in the Gut Mucosa of HIV-1-Infected Long-Term Nonprogressors. *J Virol.* 2011 Jun;85(12):5880-8.
-

- d'Ettorre G, Forcina G, Andreotti M, et al. Interleukin-15 production by monocyte-derived dendritic cells and T cell proliferation in HIV-infected patients with discordant response to highly active antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol*. 2004 Feb;135(2):280-5.
- d'Ettorre G, Forcina G, Lichtner M, et al. Interleukin-15 in HIV infection: immunological and virological interactions in antiretroviral-naive and -treated patients. *AIDS*, 2002 Jan 25;16(2):181-8.
- Elhed A, Unutmaz D. Th17 cells and HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*, 2010 Mar;5(2):146-50.
- Giron-Michel J, Caignard A, Fogli M, Brouty-Boyé D, Briard D, van Dijk M, et al. Differential STAT3, STAT5, and NF-kappaB activation in human hematopoietic progenitors by endogenous interleukin-15: implications in the expression of functional molecules. *Blood*, 2003 Jul 1;102(1):109-17.
- Johnston JA, Bacon CM, Riedy MC, et al. Signaling by IL-2 and related cytokines: JAKs, STATs, and relationship to immunodeficiency. *J Leukoc Biol*. 1996 Oct;60(4):441-52.

- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov; 6(11):1123-32.
- He Y, Li J, Zheng Y, Luo Y, et al. A Randomized Case-Control Study of Dynamic Changes in Peripheral Blood Th17/Treg Cell Balance and Interleukin-17 Levels in Highly Active Antiretroviral-Treated HIV Type 1/AIDS Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011.
- Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, et al. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med*. 2007 Oct 18;357(16):1608-19.
- Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis*. 2004 Aug 1;190(3):624-31.
- Hunt PW. Th17, gut, and HIV: therapeutic implications. *Curr Opin HIV AIDS*, 2010 Mar;5(2):189-93.

- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL17+ T cells. *Cell* 2006, 126:1121-1133.
- Klatt NR, Brenchley JM. Th17 cell dynamics in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*, 2010 Mar;5(2):135-40
- Liang SC, Tan XY, Luxemberg DP, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobials peptides. *J Exp Med*, 2006,203: 2271-2279.
- Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*. 2006 Oct 1;177(7):4662-9.
- Ma A, Boone DL, Lodolce JP. The pleiotropic functions of interleukin 15: not so interleukin 2-like after all. *J Exp Med*. 2000 Mar 6;191(5):753-6.
- Macal M, Sankaran S, Chun TW, et al. Effective CD4+ T-cell restoration in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced



Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses. *Mucosal Immunol.* 2008 Nov;1(6):475-88.

- Maek-A-Nantawat W, Buranapraditkun S, Klaewsongkram J, Ruxrungtham K  
Increased interleukin-17 production both in helper T cell subset Th17 and CD4-negative T cells in human immunodeficiency virus infection. *Viral Immunol*, 2007 Spring;20(1):66-75.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006;441:231–234.
- Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, et al. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):4901-7.
- Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, et al. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*, 2008, 452:773-776.

- Milner JD, Sandler NG, Douek DC. Th17 cells, Job's syndrome and HIV: opportunities for bacterial and fungal infections. *Curr Opin HIV AIDS*, 2010 Mar;5(2):179-83.
- Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, et al. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*, 2007, 448: 1058-1062.
- Mueller YM, Do DH, Altork SR, et. al. IL-15 treatment during acute simian immunodeficiency virus (SIV) infection increases viral set point and accelerates disease progression despite the induction of stronger SIV-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol*. 2008 Jan 1;180(1):350-60.
- Ndhlovu LC, Chapman JM, Jha AR, Snyder-Cappione JE, Pagán M, Leal FE, et al. Suppression of HIV-1 plasma viral load below detection preserves IL-17 producing T cells in HIV-1 infection. *AIDS*. 2008 May 11;22(8):990-2.
- Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):454-67.

- Paiardini M, Frank I, Pandrea C, et al. Mucosal immune dysfunction in AIDS pathogenesis. *AIDS review*, 2008: 10 36-46.
- Prendergast A, Prado JG, Kang YH, Chen F, Riddell LA, Luzzi G, et al. HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. *AIDS*, 2010 Feb 20;24(4):491-502.
- Rudner XL, Happel KI, Young EA, Shellito JE. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun*. 2007 Jun;75(6):3055-61.
- Salgado M, Rallón NI, Rodés B, López M, Soriano V, Benito JM. Long-term non-progressors display a greater number of Th17 cells than HIV-infected typical progressors. *Clin Immunol*. 2011 May;139(2):110-4.
- Shin HC, Benbernou N, Esnault S, et al. Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. *Cytokine*, 1999 Apr;11(4):257-66.

- van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*, 2007 Oct;27(4):660-9.
- Volpe E, Servant N, Zollinger R, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*. 2008 Jun;9(6):650-7.
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):950-7.
- Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*, 2008 Jan;28(1):29-39.
- Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, et al. High Levels of IL-17 in Rheumatoid Arthritis Patients: IL-15 Triggers In Vitro IL-17 Production Via Cyclosporin A-Sensitive Mechanism. *J Immunol*, 2000, 164: 2832-2838.

