

Universitatea de Medicina si Farmacie "Iuliu Hatieganu"
Cluj-Napoca

**Aspecte ale rãspunsului imun antiviral în celulele
epiteliale respiratorii**

Mihnea Zdrenghea

-rezumat-

Coordonator Stiintific: Prof. Dr. Doru Dejica

Cuprins:

Cuvânt înainte	5
I. Stadiul actual al cunoașterii	
VIRUSURILE RESPIRATORII IN PATOLOGIA PULMONARA	
1. Introducere	7
2. Astmul bronșic- cauză majoră de morbiditate respiratorie	9
3. Bronhopneumopatia Obstructivă Cronică- o altă boală respiratorie în care infecțiile virale joacă un rol important	13
4. Virusuri implicate în exacerbările astmului și ale BPOC	16
5. Raspunsul imun antiviral	21
6. Modele de studiu ale exacerbărilor induse de virusuri	22
7. Concluzii	24
INTERLEUKINA-15 SI ROLUL EI IN IMUNITATEA ANTIVIRALA	
1. Introducere	25
2. Interleukina-15 de la genă la proteină	26
3. Receptorul Interleukinei-15	29
4. Căi ale transducerii semnalului Interleukinei-15	30
5. Roluri biologice ale Interleukinei-15	32
6. Rolul Interleukinei-15 în imunitatea antivirală	35
VITAMINA D SI ROLUL EI IN IMUNITATEA ANTIVIRALA	
1. Introducere	36
2. Rolul Calcitriolului în imunitatea antivirală	37
3. Vitamina D și infecțiile respiratorii virale	38

II. Contribuții personale :

1,- IPOTEZA DE LUCRU GENERALA	41
2,- REZULTATE	
Modularea producerii de IL-15 în celulele epiteliale respiratorii de către infecțiile virale	44
Mecanismele inducției IL-15 de către virusul respirator sincițial în celulele epiteliale respiratorii	64
Modularea inducției virale a IL-15 în celule epiteliale respiratorii de către citokine de tip 2	85
Studiu <i>in vitro</i> al efectelor calcitriolului asupra unor funcții ale celulelor epiteliale respiratorii și a susceptibilității acestora la infecțiile cu rinovirus-16	97
3,- CONCLUZII	106
4,- BIBLIOGRAFIE	108

Cuvinte- cheie: Interleukina-15, virusul respirator sincițial, rinovirusuri, calcitriol, exacerbari astmatice, exacerbari BPOC

Introducere si ipoteza lucrării:

Infecțiile virale respiratorii sunt cauza unei patologii de foarte mare impact medicosocial, cu costuri enorme. Pe de o parte, este vorba de bolile infecțioase virale clasice, care sunt responsabile de peste jumătate din totalul episoadelor infecțioase acute la om și îmbracă forme clinice ca guturaiul, rinita, faringita, bronșitele sau pneumoniile, cu o incidență medie la populația nord-americană de peste 2 episoade pe an. În afara acestei patologii, infecțiile virale respiratorii au fost asociate, în ultima perioadă, cu astmul și cu bronhopneumopatia obstructivă cronică (BPOC), fiind recunoscute ca și cauze majore de exacerbări în ambele boli.

Au fost descrise peste 200 de varietăți serologice virale cauzatoare de infecții respiratorii la om, lista fiind în creștere, datorită evoluțiilor tehnicilor de detecție. Incidența infecțiilor virale respiratorii are o importantă componentă sezonieră: virusurile cu înveliș, cum ar fi virusul gripal, virusul respirator sincițial (VRS) sau coronavirusurile, infectează mai frecvent în timpul iernii, spre deosebire de rinovirusuri (RV), fără înveliș, care sunt mai prevalente din primăvară până în toamnă. În cazul astmului, exacerbările au fost asociate cu infecții virale în până la 85%, iar în BPOC în 40-60% din cazuri, în ambele instanțe cel mai frecvent izolate fiind rinovirusurile, urmate de VRS și coronavirusuri.

Terapiile actuale pentru infecțiile virale respiratorii și pentru exacerbările astmului și ale BPOC cauzate de virusuri sunt nesatisfăcătoare. De asemenea, de imunoterapia infecțiilor virale respiratorii se leagă eșecul răsunător al vaccinului împotriva virusului respirator sincițial, care a generat multă reticență la noi abordări ale acestei probleme. Înțelegerea mecanismelor patogenetice ale infecțiilor virale respiratorii e de importanța fundamentală pentru dezvoltarea de noi terapii în patologia infecțioasă virală respiratorie clasică, precum și în prevenția și tratamentul exacerbărilor astmului și ale BPOC.

Interleukina-15 (IL-15) este o citokină descoperită relativ recent, cu rol fundamental în dezvoltarea și homeostazia celulelor natural killer și a limfocitelor T CD8+ cu memorie. De asemenea, este considerată a fi unul dintre regulatorii cheie ai imunității antivirale. Este o citokină proinflamatoare, dereglarea mecanismelor homeostaziei ei fiind implicată

într-o serie de boli inflamatorii și autoimune, fiind considerată o citokină inductoare de răspuns imun de tip 1. Există, în continuare, un mare număr de neclarități legate de unele funcții, precum și de reglarea expresiei acestei citokine. O particularitate importantă a IL-15 este legată de transducția semnalului acesteia: pe de o parte s-a descoperit existența unei fracțiuni libere, circulante, a subunității α ale receptorului, subunitatea care îi dă acestuia specificitate, și, pe de altă parte, s-a demonstrat că în cazul celulelor dendritice și al macrofagelor, IL-15 poate fi prezentată la suprafața celulară, împreună cu subunitatea specifică, α , a receptorului, *in trans*, celulelor învecinate care nu prezintă pe suprafață decât celelalte două fracțiuni ale receptorului, responsabile de transducerea semnalului, astfel punându-se în evidență un mod particular de interacțiune citokina-receptor, în care un component al receptorului, împreună cu citokina, reprezintă ligandul pentru restul componentelor receptorului, aflate pe celulele țintă.

Epiteliul respirator reprezintă o suprafață imensă ce are rol de barieră complexă împotriva agresiunilor fizico-chimice sau microbiologice, inclusiv infecțiile virale. În afară de rolul de barieră fizică, în prezent se atribuie celulelor epiteliale respiratorii un rol important în inițierea și întreținerea unor răspunsuri de apărare ale gazdei. Celulele epiteliale respiratorii, ca primă linie de expunere la mulți patogeni, sunt implicate atât în imunitatea înăscută, cât și în cea adaptivă, prin producerea de citokine și prin interacțiunea directă cu celulele sistemului imunitar. Celulele epiteliale respiratorii produc, pe de o parte, ele însele, molecule antimicrobiene și antivirale, și, pe de altă parte, inițiază căi de răspuns ale imunității naturale și adaptive. Celulele epiteliale respiratorii joacă un rol crucial în apararea antivirală, și, astfel, în patogeneza imună a exacerbărilor astmatice sau ale BPCO.

Ipoteza lucrării mele este că un rol important în imunitatea antivirală îl joacă celulele epiteliale respiratorii, prin eliberarea unor citokine cu rol în răspunsul imun antiviral. În particular, am presupus, pentru partea de început a lucrării, că infecțiile virale stimulează producerea IL-15 la nivelul celulelor epiteliale respiratorii. Pentru a investiga această ipoteză, am studiat inducerea IL-15 de către virusuri respiratorii implicate în patogeneza astmului și a BPOC, întâi *in vitro*, în linii celulare epiteliale bronșice și alveolare, apoi în celule epiteliale bronșice primare umane, precum și *in vivo*,

la șoareci. A urmat investigarea mecanismelor de inducere a IL-15 de către infecția virală în celulele epiteliale respiratorii. **Ipoteza secțiunii a 2-a a lucrării a fost că infecția cu virus respirator sincițial a celulelor epiteliale respiratorii induce IL-15 printr-un mecanism pretranscripțional, și că această inducere este mediată cel puțin în parte de NF-kB.** În a treia secțiune a studiului, am pornit de la teoria conform căreia în astm, boală în ale cărei exacerbări sunt implicate etiologic rinovirusurile și VRS, există o predominanță a unor răspunsuri imune adaptive de tip Th2. Am presupus că **într-un mediu bogat în citokine asociate răspunsurilor imune de tip 2, sinteza indusă de virusuri a citokinelor de tip 1 este mai scăzută, și această scădere poate fi responsabilă de răspunsul imun antiviral deficitar și persistența virală asociate cu astmul.** Concret, am investigat influența IL-4 și a IL-13, ambele citokine de tip 2, asupra producției de IL-15, citokină de tip 1, ca răspuns la infecția virală a celulelor epiteliale respiratorii. În sfârșit, într-un studiu colateral, am plecat de la rolul tot mai bine conturat al calcitriolului (vitamina D) în imunitatea antiinfecțioasă. Celulele epiteliale respiratorii dispun de echipamentul necesar atât pentru a produce, cât și pentru a răspunde la calcitriol. De asemenea, date recente arată că unele activități legate de imunitatea înnașcută ale IL-15 ar putea fi mediate prin calcitriol. **Ipoteza părții a 4-a a fost că vitamina D joacă un rol în imunitatea antivirală a celulelor epiteliale respiratorii,** scopul fiind investigarea *in vitro* a efectului calcitriolului pe maturarea și diferențierea celulelor epiteliale respiratorii, și, implicit, pe susceptibilitatea la infecția virală, efectul pe replicarea rinovirusului în celule epiteliale și, în sfârșit, influența asupra producerii de citokine de către celulele epiteliale ca răspuns la infecția cu rinovirus.

Material și metodă:

Pentru marea majoritate a experimentelor am utilizat linia celulară umană A549, o linie pulmonară alveolară de tip II, immortalizată neoplazică, linia epitelială bronșică BEAS-2B, linie immortalizată prin infecție virală, și, pentru câteva, linia carcinomatoasă mucoepidermoidă H292. Pentru experimente confirmatorii, am folosit celule primare epiteliale bronșice umane. De asemenea, unele experimente de infecție virală au fost refăcute și *in vivo*, la șoareci. Virusurile utilizate au fost un rinovirus de grup major (care

folosește ICAM-1 ca și moleculă de adeziune), RV16, și un virus respirator sincițial tip A2. Pentru cuantificarea IL-15 ca proteină am folosit ELISA, iar pentru mesajul ARN, RT-PCR in timp real (TaqMan®). Pentru studiile de inducție a promoterului IL-15 am folosit deleții progresive ale acestuia, cuplate cu o genă reporter, a cărei activitate a fost apoi cuantificată cu un kit disponibil comercial. Am mai folosit construcții reporter cu un sit de legare NF-kB cu mutație provocată, pentru inactivare, precum și un inhibitor farmacologic al NF-kB. Pentru cunatificarea proliferării celulare în prezența vitaminei D am utilizat un colorant supravital a cărui intensitate a fost apoi măsurată prin citometrie de flux pentru estimarea numărului de diviziuni celulare.

Rezultate:

Modularea producerii de IL-15 în celulele epiteliale respiratorii de către infecțiile virale: Am constatat că celulele utilizate produc în mod constitutiv IL-15. VRS a indus IL-15 în supernatantele celulelor A549 de o maniera dependentă de timp (inducție semnificativă de la t=6 ore și până la 72 ore post-infecție) și de doză (inducție mai puternică pentru o multiplicitate a infecției de 1 unitate formatoare de plăci virală față de 0,1 și, respectiv, 0,01. De asemenea, VRS a indus secreția IL-15 în liniile celulare BEAS-2B și H292, însă mai modest decât în A549, și fără semnificație statistică. Si RV16 a indus o secreție timp- și doză dependentă a IL-15 la celulele A549, însă, și aici, nivelul inducției a fost mai modest. Văzând inducția mai mică, de către RV16 față de VRS, a IL-15 în celulele A549, și având concentrațiile de virus măsurate în mod diferit pentru cele două virusuri, am dorit să facem o estimare comparativă a eficienței infecției, măsurând producția unei alte citokine proinflamatorii, RANTES, în celulele A549; am constatat o inducție mult mai puternică a acesteia de către VRS față de RV16. Ca urmare, am ales modelul A549/ VRS pentru studiile ulterioare ale mecanismelor inducției IL-15 de către virus.

În scop confirmatoriu am utilizat, pe lângă linii celulare, și celule epiteliale bronșice umane primare, confirmând inducția semnificativă a secreției IL-15 de către infecția cu VRS, iar prin infecția experimentală a șoarecilor cu VRS am demonstrat, *in vivo*, inducția IL-15 la nivel de mARN.

În sfârșit, investigând efectul IL-15 asupra replicării virale, am constatat o concentrație de 5 ori mai mică a genei L a VRS în celulele bronșice primare pre-tratate cu IL-15 față de control, la 24 ore post infecție, sugerând un efect antiviral al IL-15.

Mecanismele inducției IL-15 de către VRS în celulele epiteliale respiratorii: Pentru a arăta că inducția constatată a secreției IL-15 de către virus este realizată prin creșterea expresiei genei și nu prin eliberare de citokină preformată, am investigat efectul VRS asupra mRNA și al promoterului IL-15. Am constatat inducția mRNA al IL-15 în celulele A549 de către infecția cu VRS. Această inducție a fost confirmată în celule primare bronșice și, după cum am arătat anterior, *in vivo*, la șoareci. În celulele primare bronșice, VRS a indus și fracțiunea α a receptorului IL-15, subunitate care dă specificitatea acestui receptor.

Utilizând construcții reporter formate din promoterul IL-15 cuplat cu o genă cu produs cuantificabil, am arătat, prin studii de transfecție temporară, inducția promoterului IL-15 de către infecția cu VRS în celule A549. Inactivarea VRS din inocul prin trei metode (temperatură, filtru molecular, radiație UV) a abolit inducția IL-15, arătând astfel că aceasta este dependentă de replicarea virală. Aceste experimente arată că stimularea IL-15 de către infecția cu virus este realizată printr-un mecanism pretranscripțional.

Prin utilizarea un inhibitor farmacologic al NF- κ B (inhibitor de IKK₂), am constatat scăderea, de către acesta, a secreției IL-15 stimulate de către VRS în celule A549, proporțional cu concentrația inhibitorului. Scăderea a fost confirmată și în celulele primare. De asemenea, utilizând construcții reporter cu promoterul IL-15, am constatat, prin studii de transfecție temporară a celulelor A549, că mutația sitului NF- κ B scade inducția de către VRS a promoterului la un nivel comparabil cu inducția construcției -15 (adică în care promoterul aproape lipsește). Aceste date susțin un rol important al factorului de transcripție NF- κ B în inducerea virală a IL-15.

Modularea inducției virale a IL-15 în celule epiteliale respiratorii de către citokine de tip 2 a fost investigată prin adăugarea, în mediul de cultură, de IL-4 și, respectiv IL-13, în cursul experimentelor de infecție virală *in vitro*. Contrar așteptărilor, IL-4 nu a scăzut, ci a crescut producția de IL-15 a celulelor A549, atât pe cea constituțională, cât și pe cea indusă de VRS, rezultate similare fiind obținute cu IL-13 pe post de citokină de tip

2. Si în cazul RV16, inducția a fost stimulată de prezența IL-4. In celulele BEAS-2B nu au fost observate diferențe sistematice în inducție, prin adăugarea IL-4 în experimente de infecție cu VRS. In sfârșit, utilizând celule primare bronșice umane infectate cu VRS, nu am constatat diferențe semnificative în inducția IL-15 în prezența IL-4 sau a IL-13 în mediu, aceasta infirmând ipoteza experimentală.

Studiu in vitro al efectelor calcitriolului asupra unor funcții ale celulelor epiteliale respiratorii și a susceptibilității acestora la infecțiile cu rinovirus-16: Măsurarea intensității medii a fluorescenței (MFI) celulelor BEAS-2B și A549 colorate cu colorantul supravital CFSE nu a găsit diferențe între celulele cultivate în prezența sau absența calcitriolului în mediu, arătând că acesta din urmă nu a influențat rata diviziunilor celulare/ diferențierea celulară. Calcitriolul din mediu a scăzut titrul RV16 în supernatantii culturilor celulelor BEAS-2B infectate în prealabil, scăzând deci replicarea virală în aceste celule. Prezența calcitriolului nu a influențat inducția IL-8 de către RV16 în celulele BEAS-2B, însă producția de RANTES indusă de virus a scăzut semnificativ în prezența calcitriolului. Aceste date susțin un rol al calcitriolului în reglarea mediului citokinic la nivel epitelial respirator, alături de un potențial rol antiviral, care merită investigat în continuare.

Concluzii:

Rezultatele obținute arată că, *in vitro*, celulele epiteliale respiratorii produc, constituțional, IL-15, și că virusurile respiratorii cresc producția de IL-15 la nivelul epiteliului respirator, crescând, în același timp, și expresia subunității α , specifică, a receptorului IL-15, subunitate care, foarte recent, s-a arătat a fi important implicată în trans-prezentarea IL-15 către celulele T citotoxice. Am arătat, de asemenea, *in vivo*, pe șoareci, inducția IL-15 de către infecția cu VRS. Ramâne ca, în viitor, evaluarea producției de IL-15 sa fie continuată *in vivo*, pe modele murine de astm indus de virus sau, ideal, în studii pe modele umane care să compare persoane sănatoase cu bolnavi cu boli respiratorii de tip 2 (astm) sau de tip 1 (BPOC).

Am arătat că stimularea producției de IL-15 se face printr-un mecanism pretranscripțional și este dependentă de replicarea virală, și am găsit unele căi moleculare implicate în

producerea IL-15 în celulele epiteliale infectate viral, legate de factorul de transcripție NF- κ B, cu potențial de a fi utilizate ca și țintă terapeutică viitoare.

De asemenea, am evaluat efectul pe care un mediu bogat în citokinele IL-4 sau IL-13 îl are asupra sintezei induse de virus a IL-15, fără a constata efecte semnificative ale acestor citokine.

Studiul efectului vitaminei D3 pe celule respiratorii epiteliale infectate cu virus a sugerat un efect antiviral al acesteia, și un potențial pentru ca această vitamină să fie utilizată cel puțin în profilaxia infecțiilor virale, dacă nu și ca tratament local, posibil în combinație cu IL-15, în unele infecții acute ale tractului respirator.

Curriculum Vitae

Nume: Mihnea Tudor ZDRENGHEA

Data nasterii: 22 ianuarie 1973

Adresa/ Contact: Clinica de Hematologie, IOCN
Bdul 22 decembrie nr 73
400124 Cluj-Napoca
email m.zdreghea@yahoo.com

Calificari 1997 medic MG, UMF Cluj-Napoca
2004 specialist hematologie
2009 primariat hematologie

Pozitia in prezent: asistent universitar, catedra de hematologie, UMF Cluj-Napoca
medic hematolog, IOCN Cluj

Pregatirea profesionala:

1998-1999: stagiar, Cluj-Napoca,
1999-2004: rezident de hematologie-hemobiologie
2001-2002: Attestation de Formation Specialisee –Universite
Louis Pasteur, Strasbourg, France –stagiul de pregatire in
hematologie, sectie de terapie intensiva hematologica si greft

2001: The Wellcome Trust short term travel award, Imperial
College London, 6 luni

2003: academic visitor, Imperial College London, in parte sustinut de un UCB Extended Scholarship Award

2005-2006: European Respiratory Society Fellowship, Imperial College London – 1 an

- Altele:** Doctorand al UMF Iuliu Hatieganu, Cluj-Napoca, Romania.
Membru al European Hematology Association
- Limbi straine:** Engleza (IELTS 8 din 9), Franceza, Germana
- Awarduri:** Roche Young Investigator Award in conjunction with the Vth International Symposium on Respiratory Viral Infections, Casa de Campo, Dominican Republic, December 2002, pentru prezentarea orala "Regulation of epithelial cell IL-15 production by RSV and IL-4"
- Alte activitati:** din 2000, fondatorul si directorul "Fundatiei pentru Ajutor si Medicina"

“Iuliu Hatieganu” University of Medicine and Pharmacy
Cluj-Napoca

**Facets Of The Antiviral Immune Response In
Respiratory Epithelial Cells**

Mihnea Zdrenghea

-abstract-

Supervisor: Prof. Dr. Doru Dejica

Table of contents:

Foreword

5

I. Theoretical Considerations

VIRUSES IN LUNG PATHOLOGY

1. Introduction	7
2. Asthma as a major cause of respiratory illness	9
3. Chronic Obstructive Pulmonary Disease- another respiratory illness with virus-associated pathology	13
4. Viruses associated with asthma and COPD exacerbations	16
5. The antiviral immune response	21
6. Models of virus-induced exacerbations	22
7. Conclusion	24

INTERLEUKIN-15

1. Introduction	25
2. Interleukin-15 from gene to proteină	26
3. The Interleukin-15 Receptor	29
4. Pathways of Interleukin-15 signal transduction	30
5. Biological roles of Interleukin-15	32
6. Interleukin-15 in antiviral immunity	35

VITAMIN D AND ITS PLACE IN ANTIVIRAL IMMUNITY

1. Introduction	36
2. Calcitriol in antiviral immunity	37
3. Vitamin D and respiratory viral infections	38

II. Personal Contributions:

1,-GENERAL HYPOTHESIS	41
2,- RESULTS	
Modulation of IL-15 production in respiratory epithelial cells by respiratory viral infections	44
Mechanisms of IL-15 induction by Respiratory Syncytial Virus in respiratory epithelial cells	64
Modulation of virus-induced epithelial cell IL-15 production by type 2 Cytokines	85
<i>In vitro</i> study of calcitriol effects on epithelial respiratory cell functions and on their susceptibility to rhinovirus infection	97
3,- CONCLUSIONS	106
4,- REFERENCES	108

Keywords: Interleukin-15, Respiratory Syncytial Virus, Rhinovirus, calcitriol, asthma exacerbations, COPD exacerbations

Introduction and hypothesis:

Respiratory viral infections are the cause of a vast array of diseases of important medical and social impact and generating very significant costs. First, there are the classical viral infectious diseases, responsible for more than half of all acute infection in humans, including diseases like the common cold, rhinitis, pharyngitis, bronchitis and pneumonia, with an incidence of more than two episodes per year in North American population. Besides this “classic” infectious pathology, respiratory viral infections were recently associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and asthma, now being recognized as a major cause of exacerbation in both diseases.

Over 200 serological subtypes of viruses causing respiratory infections in humans were described, even more being discovered as detection techniques are evolving. The incidence of respiratory viral infections has a strong seasonal pattern: enveloped viruses like influenza, respiratory syncytial virus (RSV) and coronaviruses are more prevalent during the cold season, while non-enveloped viruses like the rhinoviruses (RV) are prevalent from spring through autumn. Asthmatic exacerbations have been associated with respiratory viral infection in a proportion that goes up to 85% of episodes, while in COPD the percent varies between 40% and 60%, in both the most frequently identified viruses being RV, followed by RSV and coronaviruses.

Currently available treatment options for respiratory viral infection and asthma and COPD exacerbations are inefficient. Also, a significant negative history relates to the immune therapy of respiratory viral infection, by the failure of a RSV vaccine, which tends to generate even today very much caution in the approach towards the development of new vaccines for this virus. Understanding of the pathogenesis of respiratory viral infections is crucial to the development of new therapies both for the classical viral infectious pathology, and for the exacerbations of asthma and COPD.

Interleukin-15 (IL-15) is a rather recently described cytokine, of crucial importance for the development and homeostasis of natural killer and CD8⁺ memory cells. It is also regarded as one of the key regulators of antiviral immunity. It is a pro-inflammatory cytokine with a role in the pathogenesis of many inflammatory and autoimmune diseases, and it is regarded as a type 1 inducing cytokine. There are still nowadays many controversies and uncertainty regarding some of the functions of IL-15 and the regulation of this cytokine's expression. An important particularity of IL-15 is related to the cytokine signal transduction: a circulating fraction of the cytokine's specific receptor subunit, the IL-15R α chain, has been demonstrated. It was also shown that in APC's like macrophages and dendritic cells, IL-15 can be expressed at the cell surface together with this receptor subunit and presented *in trans* to neighboring cells that do not harbor the high specificity IL-15R α chain, but only the β and γ chains of the receptor, which are responsible for the signal transduction., thus showing a particular way of cytokine-receptor interaction, with a subunit of the receptor together with the cytokine acting as the ligand for the other subunits of the receptor, located on the target cell.

The respiratory epithelium is an extremely large surface acting as a complex barrier against physical, chemical and microbiological aggression, including viral infection. But more than being a passive physical barrier, respiratory epithelial cells are presently credited with initiating and maintaining crucial and complex host defense mechanisms. As a first line of exposure to pathogens, respiratory epithelial cells are involved both in innate and adaptive immunity, through the production of cytokines and by direct interaction with cells of the immune system. Respiratory epithelial cells both produce antimicrobial and antiviral molecules and, on the other hand, initiate pathways of innate and adaptive immunity. Respiratory epithelial cells play a crucial role in antiviral defense and, thus, in the immune pathogenesis of COPD and asthma exacerbations.

The **HYPOTHESIS** of my project is that **respiratory epithelial cells have an important role in antiviral immunity, through the release of cytokines involved in the antiviral immune response.** In particular, I assumed that respiratory **viral infection induces IL-15 production by respiratory epithelial cells**, dealing with this hypothesis in the **first part of the presented work.** To researched this, I investigate IL-15 induction by respiratory viruses involved in asthma and COPD exacerbations, first *in vitro*, in

bronchial and alveolar epithelial cell lines, then confirming the results in primary human bronchial epithelial cells and finally *in vivo*, in mice. This was followed by the investigation of the mechanisms of virus-induced epithelial cell IL-15 production. **The hypothesis of the second section presented was that RSV infection of respiratory epithelial cells induces IL-15 through a pre-transcriptional mechanism, and this induction is mediated by NF- κ B.** In the third part, I started with the assumption that in asthma there is an immunological environment where Th2 responses are predominant, and hypothesized that in an environment rich in type 2-associated cytokines, type 1-cytokine induction by virus infection is down-regulated, and this down-regulation could be responsible of the defective antiviral responses and virus persistence associated with asthma. In particular, I investigated the effect of the presence of IL-4 and IL-13, both regarded as type 2 cytokines, on virus-induced production of IL-15, as a type 1 cytokine, in respiratory epithelial cells. Finally, in an accessory study, I started with the recent (re-)involvement of calcitriol (vitamin D) in anti-infectious immunity. Respiratory epithelial cells have the equipment to both synthesize and respond to calcitriol. Also, recent data shows that certain innate immunity-associated actions of IL-15 could be mediated by calcitriol. **The hypothesis of the 4th part was that vitamin D is involved in respiratory epithelial cell antiviral immunity,** with the aim of investigating *in vitro* calcitriol effect on maturation and differentiation of respiratory epithelial cells, and, thus, on the susceptibility to viral infection, the effect on RV replication in epithelial cells, and, finally, modulation by calcitriol of cytokines produced by epithelial cells in response to RV infection.

Materials and methods:

For the bulk of the experiments, I used the A549 cells, a type II alveolar cell line, BEAS-2B cells, a bronchial epithelial cell line, immortalized by a viral infection, and, for some of the experiments, the mucoepidermoid carcinomatous cell line H292. For confirmatory experiments I used primary human epithelial bronchial cells. Also, some of the virus infection experiments were done *in vivo*, on mice. Viruses used were a major group rhinovirus, RV16, and an A2 type RSV. For IL-15 quantification in supernatants I used

ELISA, and for mRNA, real-time quantitative RT-PCR (TaqMan ®). For the IL-15 promoter studies, I used reporter constructs containing serial deletions of the IL-15 promoter, as well as a NF- κ B mutated promoter, coupled with a reporter gene (secreted alkaline phosphatase, seAP).

Results:

Modulation of respiratory epithelial cell IL-15 production by virus infection:

I found that the epithelial cells used all produce IL-15 constitutively. RSV induced IL-15 production in A549 cell in a time- (statistically significant IL-15 production augmentation noted at all time points, from 6 to 72 h postinfection) and dose-dependent manner (induction more significant for a multiplicity of infection of 1 plaque forming unit per cell vs. 0.1 and 0.01, respectively). RSV also induced IL-15 production of H292 and BEAS-2B cells, but induction was lower than the one noted in A549 cells, and with no statistical significance.

RV16 also induced IL-15 in a time- and dose-dependent manner in A549 cells, but less than RSV. Seeing the different induction generated by the two viruses, and knowing that virus titrations were made using different methods for each virus, I wanted to compare infection efficiency for the viruses used, measuring the production of another proinflammatory cytokine, RANTES, in A549 cells. I measured a much higher induction of RANTES by RSV vs. RV16. This is why I chose the RSV- A549 combination for the bulk of subsequent induction experiments.

For confirmatory purposes, I repeated the experiments on primary human bronchial epithelial cells, reproducing significant induction of IL-15 by RSV infection, and by experimentally infecting mice with RSV, I demonstrated *in vivo* IL-15 mRNA induction. Finally, to estimate IL-15 effect on virus replication, I experimentally infected primary bronchial epithelial cells with RSV; measuring RSV L-gene mRNA in cell lysates, I

noted a 5-fold decrease in then number of L-gene mRNA copies in cells pre-treated with IL-15, thus suggesting an antiviral effect of this cytokine.

Mechanisms of IL-15 induction by RSV in respiratory epithelial cells:

To show that IL-15 induction in cell culture supernatants by virus infection was the consequence of increased IL-15 gene expression, rather than being obtained through the release of pre-formed protein from the infected cells, I investigated the effects of virus infection on IL-15 mRNA expression and on the IL-15 promoter. I demonstrated the induction of IL-15 mRNA by RSV infection of A549 cells. This induction was confirmed in primary human bronchial epithelial cells and, as previously stated, in mice. In primary cells, RSV also induced mRNA of the alpha subunit of the IL-15 receptor, the one responsible of ligand specificity.

Using reporter constructs of serial deletions of the IL-15 promoter, coupled with the seAP gene, whose expression can be easily measured in cell cultures, I showed, in transient transfection studies, induction of the IL-15 promoter by RSV in A549 cells.

Inactivation of RSV by three different methods (UV irradiation, molecular filter and exposure to high temperature) abolished IL-15 induction by RSV, thus showing that viral replication is essential for the induction.

These experiments show that IL-15 induction by RSV is done through a pre-transcriptional mechanism.

Using a pharmacological inhibitor of NF- κ B, I noted a decrease in IL-15 induction by RSV in A549 cells, proportional to the inhibitor concentration. This decrease was confirmed in primary cells. Also, using reporter constructs containing a mutation that inactivates an NF- κ B site in the IL-15 promoter, I found that the mutation decreases promoter induction by virus, to a level similar to that seen in the -15-seAP construct, where the promoter has been almost entirely deleted. This data show an important role of NF- κ B in IL-15 induction by RSV.

Modulation of RSV- induced IL-15 production of respiratory epithelial cells by type 2 cytokines was investigated by performing *in vitro* viral infection experiments, in the presence and absence from the cell culture medium of IL-4 or IL-13, both prototypic type 2 cytokines. Unexpectedly, IL-4 did not decrease, but increased IL-15 production of A549 cells, both constitutive and RSV-induced, similar results being obtained with IL-13. Repeating the experiments with RV16 instead of RSV yielded the same results. In BEAS-2B cells, there were no systematic differences in IL-15 induction by RSV in the presence or absence of IL-4. Finally, using primary human bronchial epithelial cells, I did not see any significant difference between the RSV induced IL-15 in the presence or absence of IL-4 or IL-13. Thus, my experimental hypothesis for this part of the study was thus cancelled.

In vitro study of the effects of calcitriol on certain functions of respiratory epithelial cells and on their susceptibility to infection with Rhinovirus 16

Measurement of mean fluorescence intensity of BEAS-2B and A549 cells stained with the supravital stain CFSE did not show any differences between cells grown in the presence or absence of calcitriol in the growth medium, thus failing to show an effect of calcitriol on cell proliferation or division rate. Adding calcitriol to the growth medium decreased RV16 titers in the supernatants of virus-infected BEAS-2B cells, thus showing an effect on viral replication in these cells. The presence of calcitriol did not alter IL-8 induction by RV16, but significantly decreased RANTES induction by RV16 infection in BEAS-2B cells, suggesting a role for calcitriol in the regulation of the cytokine milieu at respiratory epithelial cell level.

Conclusions:

The results shown above demonstrate *in vitro* that respiratory epithelial cells produce IL-15 constitutively, and that this production is increased by respiratory viral infection, which also increases the expression of the specific alpha subunit of the heterotrimeric IL-15 receptor, implicated recently in trans-presentation of IL-15 to cytotoxic T cells. IL-15 induction by RSV was also demonstrated *in vivo*, in mice. Future studies should investigate IL-15 production in murine models of asthma exacerbations, and, ideally, the role of IL-15 should be assessed in studies on human models that compare normals with type 2 (asthma) or type 1- predominant (COPD) respiratory disease.

I showed that IL-15 induction by virus is pre-transcriptional and that it is dependent on viral replication, and found some molecular pathways implicated in viral induction of IL-15, namely a role for NF- κ B, thus suggesting a potential therapeutic target.

Also, I investigated the effect of type 2 cytokines IL-4 and IL-13 on virus-induced IL-15 production, but failed to confirm the hypothesis, and could not demonstrate significant effects of those cytokines on IL-15 production.

Investigating the effect of vitamin D3 (calcitriol) on virus-infected respiratory epithelial cells, my results suggested an antiviral effect, and thus a potential for this substance to be used not only in the prophylaxis of viral infection, but also as a local treatment, possibly in combination with IL-15, in some respiratory tract infections.

Curriculum Vitae

Name: **Mihnea Tudor ZDRENGHEA**

DOB: 22 January, 1973

Work Address: Department of Hematology, IOCN
73, 22nd december 1989 street
400124 Cluj-Napoca, Romania
e-mail: m.zdrengha@yahoo.com

Qualifications: 1997 MD- UMF Iuliu Hatieganu, Cluj-Napoca, Romania
2004- specialist degree in hematology

Present Position: Assistant professor of Hematology, UMF Iuliu Hatieganu, Cluj-Napoca, Romania

Career history: 1998-1999: intern in medicine, Cluj-Napoca, Romania
1999-2004: residency in hematology-hemobiology
2001-2002: 1yr AFS (Attestation de Formation Specialisee) – specialist training in Hematology, Universite Louis Pasteur, Strasbourg, France

2001: 6 mth The Wellcome Trust short term travel award, Imperial College London
2003: academic visitor, Imperial College London, partly supported by an UCB Extended Scholarship Award

2005-2006: 1yr European Respiratory Society Fellowship,
Imperial College London

Other: PhD Student at UMF Iuliu Hatieganu, Cluj-Napoca, Romania.
European Hematology Association member

Foreign languages: English (IELTS band 8 out of 9) French, German

Awards: Roche Young Investigator Award in conjunction with the Vth
International Symposium on Respiratory Viral Infections, Casa de
Campo, Dominican Republic, December 2002, for the oral
presentation: "Regulation of epithelial cell IL-15 production by
RSV and IL-4"

Other: Since 2000: founder and director of the "*Foundation for Help and
Medicine*"