



L'Adenosina Desaminasa i les α -Defensines com a moduladors de respostes immunitàries front al VIH

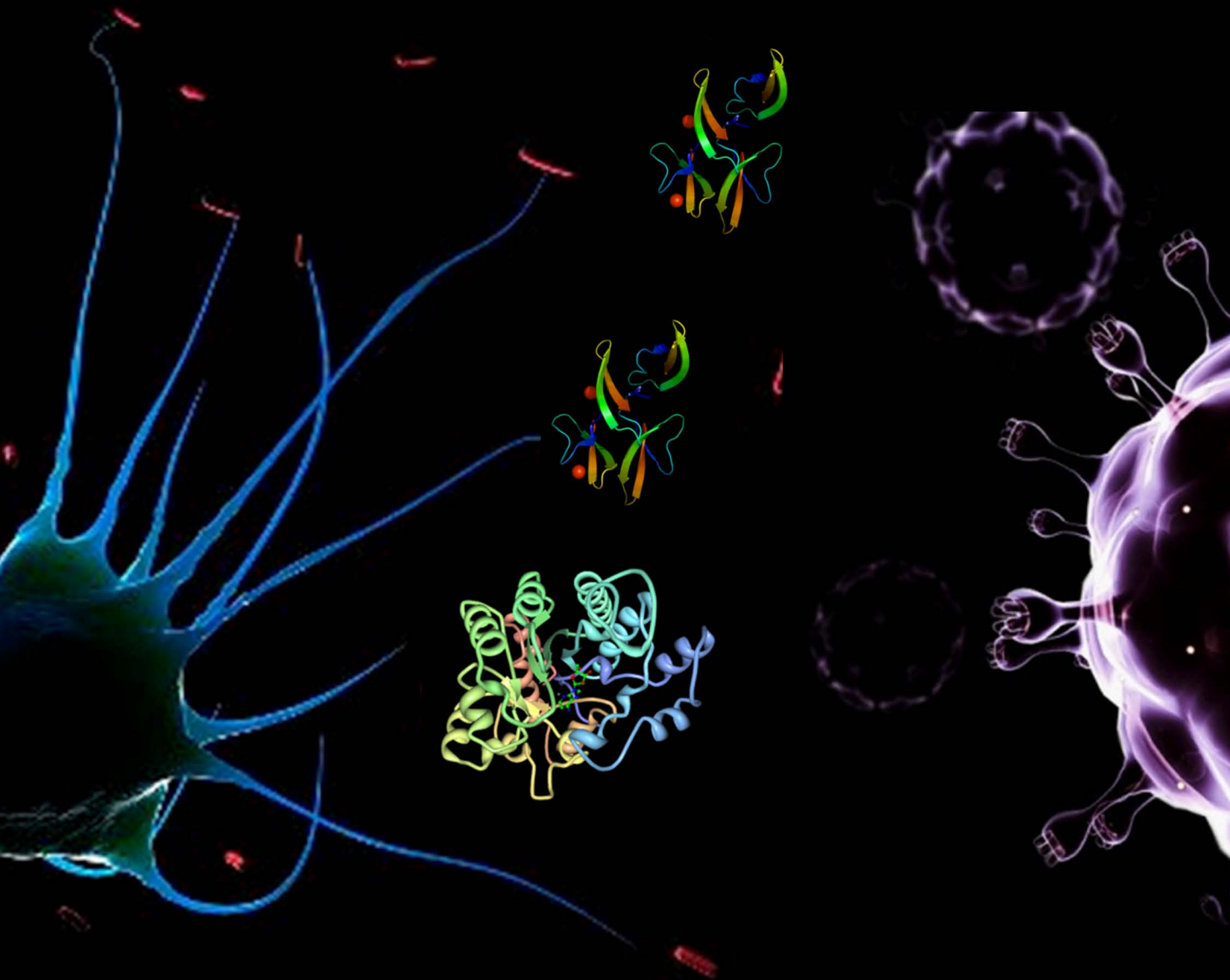
Víctor Casanova Güell

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

*L'Adenosina Desaminasa i les α -Defensines
com a moduladors de respostes
immunitàries front al VIH*



L'Adenosina Desaminasa i les α -Defensines com a moduladors de respostes immunitàries front al VIH

PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA

**Memòria presentada per Víctor Casanova Güell per optar al títol de
Doctor en Biologia per la Universitat de Barcelona**

Aquesta Tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Rafael Franco Fernández i el Dr. Enric I Canela Campos del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Novembre 2012

Dr. Rafael Franco Fernández

Dr. Enric I Canela Campos

Víctor Casanova Güell

Índex

ÍNDEX

1. Introducció	1
<u>1.1 Cèl·lules Dendrítiques</u>	3
1.1.1 Programa de maduració de la cèl·lula dendrítica	3
1.1.2 Cèl·lula dendrítica madura. Presentació antigènica i senyals coestimuladores.	6
1.1.3 Activació de la cèl·lula T i polarització de la resposta Immunitària.	8
1.1.4 Cèl·lules T reguladores (Tregs)	10
1.1.5 Subpoblacions de cèl·lules dendrítiques	11
1.1.5.1 Subtipus de dendrítiques en sang	11
1.1.5.2 Cèl·lules dendrítiques residents en òrgans limfoides i pell	12
1.1.5.3 Cèl·lules dendrítiques derivades de monòcit (CDDM) com a model de dendrítica mioide	12
<u>1.2 Infecció per VIH</u>	13
1.2.1 Estructura del VIH	14
1.2.2 Immunopatologia de la infecció per VIH	15
1.2.3 Interacció del VIH amb les cèl·lules dendrítiques.	18
1.2.4 Mecanismes d'evasió viral. Dificultats per al disseny d'una vacuna preventiva.	17
1.2.5 Paper de la resposta immunitària en la defensa davant el VIH. Individus exposats no infectats (EU) i controladors de la infecció viral.	19
1.2.5.1 Factors genètics	20
1.2.5.2 Factors de la immunitat innata	22
1.2.5.3 Factors cel·lulars de restricció viral	23
1.2.5.4 Factors de la immunitat adaptativa:	23

Immunitat cel·lular CD8 i CD4	
1.2.5.5 Immunitat humoral	24
<u>1.3. CD26. Estructura i funció</u>	25
1.3.1 Estructura Molecular	25
1.3.2 Expressió i funció	27
1.3.2.1 Expressió de CD26	27
1.3.2.2 Activitat dipeptidil peptidasa del CD26	28
1.3.2.3 Activitat no enzimàtica del CD26.	30
CD26 com a molècula coestimuladora	
<u>1.4. L'adenosina i els seus receptors</u>	31
1.4.1 Producció d'adenosina	31
1.4.2 Receptors d'adenosina	32
1.4.3 Efectes de l'adenosina en el sistema immunitari	33
1.4.4 Adenosina i infecció per VIH	35
<u>1.5. Adenosina Desaminasa</u>	35
1.5.1 Activitat enzimàtica, estructura i expressió de l'enzim	35
1.5.2 ADA citosòlica i SCID	37
1.5.3 Ecto-Adenosina Desaminasa	38
1.5.3.1 ADA extracel·lular, funció com a ecto-enzim	39
1.5.3.2 Proteïnes d'unió d'ADA a la membrana:	38
CD26 i receptors d'adenosina	
1.5.4 Paper de l'ecto-adenosina desaminasa en el sistema	43
Immunitari	
1.5.4.1 ADA com a molècula co-estimuladora de	43
l'activació limfocitària	
1.5.5 Interacció CD26-ADA i infecció pel VIH	45
<u>1.6. α-Defensines</u>	46
1.6.1 Classificació i Estructura	47

1.6.2 Estructura gènica	48
1.6.3 Síntesi, expressió i distribució de les α -defensines.	49
1.6.4 Variabilitat inter-espècie en l'expressió de defensines	50
1.6.5 Les α -defensines com a molècules efectores de la immunitat innata	51
1.6.5.1 Activitat antimicrobiana directe.	51
1.6.5.2 Mecanismes antimicrobians directes de les α -defensines	52
1.6.5.3 Activitat quimiotàctica	53
1.6.5.4 Efectes indirectes sobre diferents poblacions Immunològiques	53
1.6.6 Efectes antivirals de les α -defensines, infecció per VIH.	54
1.6.6.1 Mecanismes anti-VIH de les α -defensines	55
1.6.6.2 α -defensines i protecció davant del VIH. Individus exposats no infectats.	56
2. Objectius	59
3. Resultats	63
3.1: L'adenosina desaminasa incrementa la immunogenicitat de les cèl·lules dendrítiques d'individus sans i infectats per VIH <i>Acceptat a Plos One</i>	66
3.2: L'adenosina desaminasa potencia la generació de cèl·lules T CD4+ efectores, reguladores i memòria <i>J Leukoc Biol. 2011 Jan;89(1):127-36. Epub 2010 Oct 19</i>	109
3.3. La major producció d' α -Defensines 1-3 per les cèl·lules dendrítiques d'individus infectats pel VIH s'associa a una menor progressió de la malaltia <i>PLoS One. 2010 Feb 25;5(2):e9436</i>	121
3.4. Un elevat nombre de còpies del gen DEFA1A3 i una elevada secreció d' α -Defensines 1-3 s'associa amb protecció davant la infecció per VIH	133

3.5 Informe dels Directors sobre la contribució i factor d'impacte dels articles presentats en aquesta Tesi Doctoral	159
4. Resum de Resultats i Discussió	161
4.1 Rellevància de l'ecto-ADA per a la funció de les cèl·lules dendrítiques humanes	163
4.2 Implicació dels efectes de l'ADA sobre les iDC per a la patogènia del VIH.	167
4.3 Caracterització de l'efecte de l'ADA sobre l'activació i proliferació de limfòcits T Naïve	169
4.4 Paper de l'ADA en la generació de cèl·lules T Reguladores	172
4.5 Implicacions del paper de l'ADA en l'activació limfocitària per a la patogènia del VIH	173
4.6 Les α -defensines 1-3 com a factor de resistència natural a la infecció per VIH.	174
4.7 Paper de la secreció d' α -defensines per part de les iDCs com a factor implicat en una menor progressió de la infecció	174
4.8 Paper de diferents nombre de còpies del gen DEFAF1A3 en la protecció davant la infecció per VIH.	177
4.9 L'ADA i les α -defensines 1-3 com a moduladors de la immunitat front al VIH. Visió de conjunt	181
5. Conclusions	185
6. Bibliografia	189

Introducció

1 INTRODUCCIÓ

1.1 Cèl·lules Dendrítiques.

Tot i haver-se observat per primera vegada a la pell com a cèl·lules de Langerhans fa més de 140 anys, el descobriment real de les cèl·lules dendrítiques es va produir com a conseqüència de la recerca al voltant del concepte d'immunogenicitat; és a dir, la capacitat d'un antigen de generar una resposta immunitària. Un fet cabdal en aquesta recerca va ser la primera generació *in vitro* d'anticossos, front eritròcits de diverses espècies usant una suspensió de cèl·lules de mesa de ratolí (Mishell y Dutton, 1966). Ben aviat es va observar que per a generar la resposta immunitària es requerien "cèl·lules accessòries", gran part de les quals eren macròfags (Mosier, 1967). Va ser un anàlisi més exhaustiu d'aquestes cèl·lules el que va posar de manifest l'existència d'una població cel·lular de forma estrellada, amb característiques de moviment úniques, expandint i contraient les seves dendrites de forma constant. Aquesta nova població es va demostrar diferent de limfòcits o macròfags, batejant-se com a cèl·lules dendrítiques (Steinman y Cohn, 1973, 1974), del grec *dendron*, és a dir amb forma d'arbre (Steinman, 2007). En la època discutida la seva rellevància degut a la seva poca presència en comparació amb altres poblacions, les cèl·lules dendrítiques es varen mostrar de 100 a 1000 vegades més potents que cèl·lules totals de melsa per iniciar respostes immunitàries (Steinman y Witmer, 1978). Aquest fet, conjuntament amb la observació que les cèl·lules dendrítiques eren capaces tant d'iniciar respostes citotòxiques com la producció d'anticossos (Nussenzweig et al., 1980; Inaba et al., 1983), va confirmar que la funció d'aquesta població cel·lular era la presentació antigènica, en una potència i qualitat no igualables per altres tipus cel·lulars.

1.1.1 Programa de maduració de la cèl·lula dendrítica

La funció de les cèl·lules dendrítiques requereix una distribució tissular molt concreta. Així, les cèl·lules dendrítiques es situen estratègicament en llocs anatòmics d'alta exposició antigènica, com ara la dermis, les diferents mucoses de l'organisme o la melsa (Villadangos y Heath, 2005). La raó d'aquesta distribució és l'establiment

d'una eficient xarxa de filtratge de qualsevol antigen possible que pugui entrar a l'organisme. Ja als anys 80 es va observar que les cèl·lules dendrítiques podien presentar dos estats, amb diferències molt marcades en la seva capacitat immunoestimuladora (Schuler y Steinman, 1985; Inaba et al., 1986). Actualment aquests dos estats es coneixen com a cèl·lula dendrítica immadura i madura, respectivament.

Les cèl·lules dendrítiques immadures són cèl·lules especialitzades en detectar i capturar antigen. Amb aquesta finalitat, contínuament fagociten antígens, propis o externs i mostren processos constitutius de macropinocitosi (Guermónprez et al., 2002; Norbury, 2006), arribant a processar fins al 40% del seu volum en líquid extracel·lular cada hora (Norbury, 2006). Aquesta capacitat de fagocitosi és cabdal per a processar i carregar pèptids als complexos majors d'histocompatibilitat o MHC, molècules encarregades d'exposar i presentar mostres dels antígens processats. Aquest procés de captura d'antigen comporta l'inici d'un programa de maduració, mitjançant el qual s'incrementa gradualment l'expressió de molècules MHC-II, i molècules co-estimuladores com ara CD80 o CD86, crítiques per a permetre l'activació de les cèl·lules T (Reis e Sousa, 2006).

Donat que la captura d'antigen no és selectiva, és a dir no pot distingir entre antígens propis o externs, la cèl·lula dendrítica expressa un seguit de receptors capaços de detectar estructures moleculars associades a patògens (PAMPS). Aquests inclouen els *Toll-like Receptors* (TLR), *Nod-like Receptors* (NLR) i receptors de tipus lectina-C (CLR) entre d'altres (van Vliet et al., 2007). Globalment, aquests receptors reconeixen lipopolisacàrids bacterians (LPS), àcids nucleics virals, àcids lipoteicoics, i carbohidrats entre d'altres, estructures únicament presents en bacteris, fongs o virus. La interacció de PAMPS amb aquests receptors, resultarà en l'activació de la cèl·lula dendrítica immadura i la secreció de citocines pro-inflamatòries com ara IL-1 β , TNF- α o IL-6. Aquestes citocines poden actuar de forma tant paracrina com autocrina, amplificant el procés de maduració de la cèl·lula dendrítica immadura o iniciant la maduració de cèl·lules dendrítiques veïnes. És de destacar que la presència de PAMPS és indispensable per activar certs aspectes del programa maduratiu de les cèl·lules

dendrítiques, com ara la secreció de IL-12, citocina de polarització cap a Th1 (veure més endavant) (Macagno et al., 2007). A més, els gens per a diferents citocines s'expressen de forma transitòria i amb una cinètica molt determinada, indicant la necessitat d'una correcta integració i coordinació de diferents tipus de senyals. Així per exemple, l'expressió i secreció de TNF- α s'assoleix en 3 hores, mentre que la d'IL-6, IL-10 o IL-12 pot tardar entre 6 i 18h després de l'estímul (Langenkamp et al., 2000).

Per altre banda, no només les estructures associades a patògens activen la maduració de les cèl·lules dendrítiques; fenòmens endògens associats a dany tissular o cel·lular també són sensats per les DCs. Així, processos de necrosi cel·lular alliberen proteïnes i àcids nucleics normalment no exposats al medi extracel·lular que seran detectats per la cèl·lula dendrítica com a senyals de perill o "alarmines" (Bianchi, 2007). Exemples d'alarmines poden ser la proteïna HMGB1 (Yang et al., 2012), proteïnes de xoc tèrmic (HSPs) o lactoferrina (Spadaro et al., 2008; de la Rosa et al., 2008). Per altre banda, àcids nucleics com l'àcid úric i l'ATP són també pro-inflamatòries i actuen atraient cèl·lules del sistema immunitari (Elliott et al., 2009).

Una vegada ja iniciat el programa de maduració de la cèl·lula dendrítica, aquesta inicia la seva migració cap a ganglis limfàtics, zona on es donarà la presentació antigènica a limfòcits naïve. Aquest procés es troba guiat per gradients de quimiocines com CCL19 i CCL21, que actuaran a través del receptor CCR7 (Förster et al., 1999, 2008). La iDC, per tant iniciarà l'expressió d'aquest receptor, sent aquesta expressió característica de la maduració de la cèl·lula dendrítica e indicativa de la seva capacitat de migració. A més, cèl·lules immunitàries activades tant innates (cèl·lules NK) com adaptatives (limfòcits T o B) reclutades als llocs de captura antigènica poden reforçar la maduració de la cèl·lula dendrítica, per exemple mitjançant interaccions entre el CD40 (en dendrítica) i el seu lligand CD40L en limfòcits (Elgueta et al., 2009).

Per tant, les iDCs a més de la captura d'antigen són plataformes d'integració de diferents tipus de senyals (veure figura 1), que modularan el programa de maduració, una forma d'aportar informació sobre el tipus d'antigen i les condicions del teixit en el que es troba aquest antigen (Macagno et al., 2007). Aquesta informació és vital per

generar una resposta immunitària coordinada, específica i adequada a cada patògen en el moment que aquest apareix.

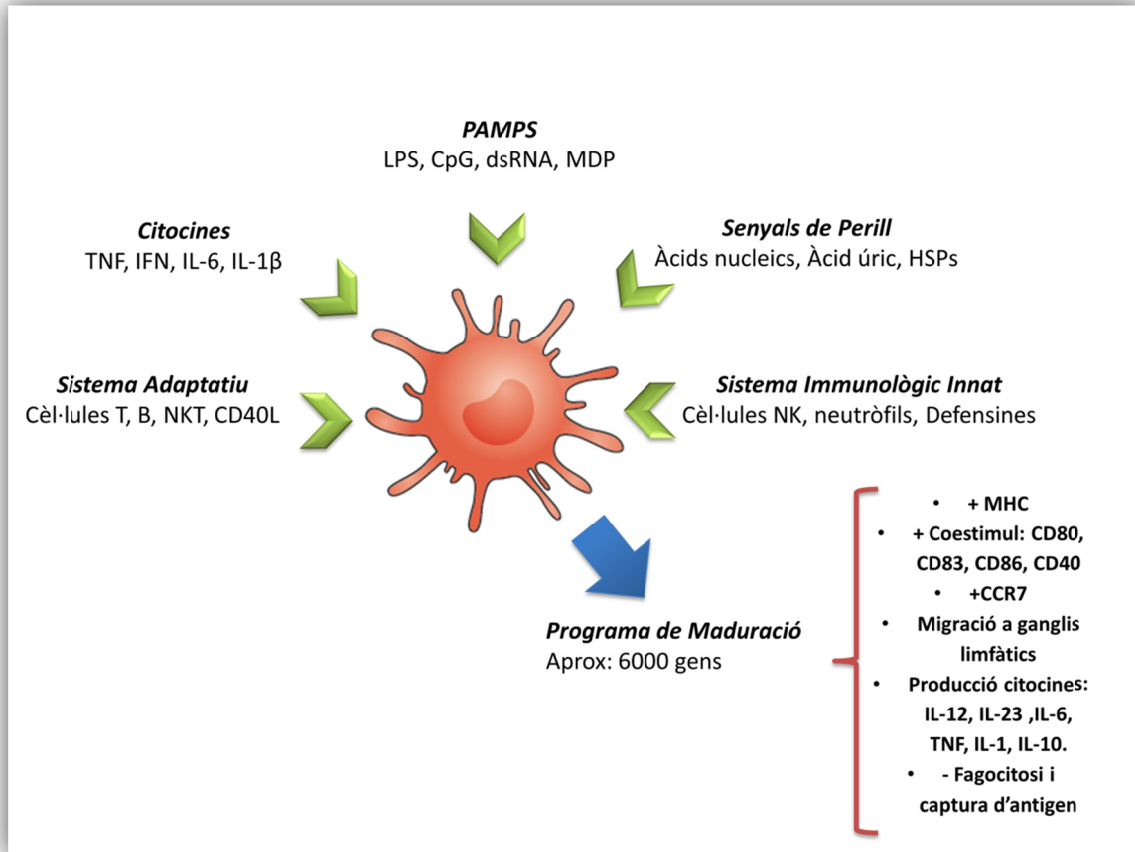


Figura 1: Integració de diferents senyals i maduració de la dendrítica

Modificat de (Macagno et al., 2007)

1.1.2 Cèl·lula dendrítica madura. Presentació antigènica i senyals coestimuladores.

La migració de la cèl·lula dendrítica a ganglis limfàtics és clau, ja que possibilita la presentació d'antígens perifèrics a limfòcits T Naïve. Clàssicament les molècules del MHC de classe II són usades per a la presentació d'antígens extracel·lulars als limfòcits T CD4⁺, mentre que les molècules del MHC de classe I carreguen pèptids provinents del citoplasma cel·lular presentant-los a limfòcits T CD8⁺. No obstant, en els darrers anys s'ha anat coneixent que antígens extracel·lulars també poden ésser carregats a molècules del MHC tipus I, obtenint així respostes CD8⁺. Aquest fenomen es coneix

com a presentació creuada (Shen y Rock, 2006; Basta y Alatery, 2007). També s'ha evidenciat la possibilitat de que cèl·lules dendrítiques capturin complexos MHC-pèptid sencers presents en la membrana d'una tercera cèl·lula, amb la capacitat d'usar-los per a una posterior presentació antigènica (Wakim y Bevan, 2011). Aquests processos confereixen nivells addicionals en la qualitat de la resposta immunitària.

Per a activar les cèl·lules T naïve, es requereixen un mínim de dos estímuls per part de la cèl·lula dendrítica: el complex MHC-pèptid i una senya co-estimuladora (Fujii et al., 2004). Aquest és un mecanisme de protecció davant la eventualitat de que una presentació d'un antigen propi trobi un limfòcit T autorreactiu que hagi escapat els mecanismes de tolerància central al tim. Així, normalment la presentació d'antígens propis es fa en absència de senyals co-estimuladores per part de la dendrítica, com a resultat d'una captura antigènica en absència de senyals de perill. Aquesta cèl·lula dendrítica esdevindrà tolerogènica (Hawiger et al., 2001; Steinman et al., 2003), proporcionant al limfòcit T senyals d'apoptosi, d'anergia o estimulants la generació de cèl·lules T Reguladores (Treg). Aquest procés forma part del mecanisme de tolerància perifèrica, en el qual la cèl·lula dendrítica juga un paper clau per a evitar respostes autoimmunitàries.

De la mateixa manera, per a la correcta activació de limfòcits T davant antígens externs la cèl·lula dendrítica necessita expressar un mínim de senyals coestimuladores que reforcin la presentació antigènica. Un exemple de molècules coestimuladores és la família B7/CD28 (Greenwald et al., 2005). Membres d'aquesta família com ara CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) expressats en la cèl·lula dendrítica poden interactuar amb CD28 o CTLA-4 en la superfície del limfòcit, donant lloc a senyals positives o negatives per a la activació limfocitària, respectivament (Sharpe y Freeman, 2002). Altres membres destacats d'aquesta família són PD-1, i els seus lligands PD-L1 i PD-L2. L'expressió dels quals és força àmplia i no sembla restringida al sistema immunitari. Les interaccions de PD-1 amb els seus lligands resulten inhibidores per a l'activació limfocitària, contribuint per tant a l'homeòstasi del sistema (Keir et al., 2008), resultant beneficioses per evitar situacions d'autoimmunitat i alhora perjudicials per a la resolució de certes infeccions cròniques (Sharpe et al., 2007). Una altra gran família de

receptors coestimuladors és la representada pels membres de la família del TNF/TNFR (Watts, 2005). La interacció entre els membres d'aquesta família és capaç de reclutar la proteïna adaptadora TRAF i conseqüentment la via d'NF-KB. Entre els membres més destacats d'aquesta família es troben el CD40/CD40L, OX40/OX40L, o CD27/CD70, interaccions positives per a l'activació de la resposta immunitària. Tal i com passa amb la família B7/CD28, certes interaccions de la família TNF/TNFR resulten inhibidores per a l'activació immunitària, com ara les generades pels receptors GITR/GITRL. Globalment, les interaccions coestimuladores confereixen una regulació molt fina de l'activació limfocitària, integrant múltiples senyals tant activadores com inhibidores de forma seqüencial al llarg de la resposta immunitària (Macagno et al., 2007; Zhu et al., 2011). Aquest procés és clau per tant, en la magnitud relativa de cèl·lules efectores, memòria (Boesteanu y Katsikis, 2009) i reguladores (Hinterberger et al., 2011) que es generaran davant un antigen concret.

1.1.3 Activació de la cèl·lula T i polarització de la resposta immunitària

A més de l'antigen i el global de senyals coestimuladores, la tercera senyal indispensable per a una activació immunitària adequada al patògen que l'ha generat és una correcta secreció de citocines per part de la cèl·lula presentadora d'antigen. Aquest fet és clau, ja que diferents citocines promouran habilitats efectores diferents en les cèl·lules recentment activades. Actualment es diferencien 3 grans tipus de respostes efectores diferents per als limfòcits T CD4⁺; Th-1, Th-2 i Th-17, conjuntament amb una de reguladora (Zhu y Paul, 2008) (veure figura 2). Clàssicament, s'han considerat els antígens citosòlics (virus i patògens intracel·lulars) com a inductors de respostes Th-1. Així certes senyals (TLR concrets, CD40L o presència d'IFN- α o IFN- γ) estimula la producció d'IL-12 per part de la cèl·lula dendrítica. La IL-12 així produïda induirà la secreció d'IFN- γ per part de macròfags i cèl·lules NK. Les cèl·lules CD4⁺ activades en presència d'IL-12 i IFN- γ , incrementaran l'expressió del factor de transcripció *T-bet* (Szabo et al., 2000) clau per a la secreció d'IFN- γ per part de les pròpies cèl·lules T i a per a desenvolupar una resposta Th-1 (Zhu y Paul, 2008). Aquest tipus de resposta és especialment efectiva davant virus o micobactèries per exemple,

activant el canvi de classe en cèl·lules B cap a la producció d'IgG i afavorint respostes CD8 citotòxiques.

Patògens extracel·lulars, especialment paràsits, inicien majoritàriament respostes de tipus Th-2. Per a la polarització de limfòcits CD4⁺ naive cap a aquest tipus de resposta són necessàries les accions de les citocines IL-4 i IL-2. Aquestes citocines, mitjançant l'acció dels factors de transcripció *Stat6* i *Stat5*, respectivament consolidaran l'expressió de *GATA-3*, principal regulador de la polarització a Th-2. Cèl·lules CD4 així polaritzades produiran IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 i IL-13 entre d'altres, afavorint la producció d'IgE, i activant basòfils eosinòfils i mastòcits. Aquest tipus de resposta capacita l'organisme per rebutjar infeccions parasitàries (Zhu y Paul, 2008; Pulendran et al., 2010).

Per altra banda, un nou tipus de resposta immunitària s'ha observat davant estímuls provinents de fongs o bacteris extracel·lulars. Aquest tipus de resposta s'anomena Th-17, ja que es caracteritza per la secreció d'aquesta citocina. Recentment s'ha vist que el factor de transcripció *RORγ* és indispensable per a la diferenciació de cèl·lules Th-17 (Ivanov et al., 2006). Tot i certes divergències sobre el paper relatiu de TGF-β i IL-1β (Acosta-Rodriguez et al., 2007; O'Garra et al., 2008), aquestes dues citocines en concert amb IL-6 o IL-21 (totes dues activen *Stat3*) són claus per a la diferenciació cap a Th-17. A més la citocina IL-23, és necessària per a amplificar o mantenir aquesta polarització. Aquesta resposta sembla important per a la immunitat en mucoses (Kolls y Khader, 2010), induint canvis de classe a IgA (Jaffar et al., 2009).

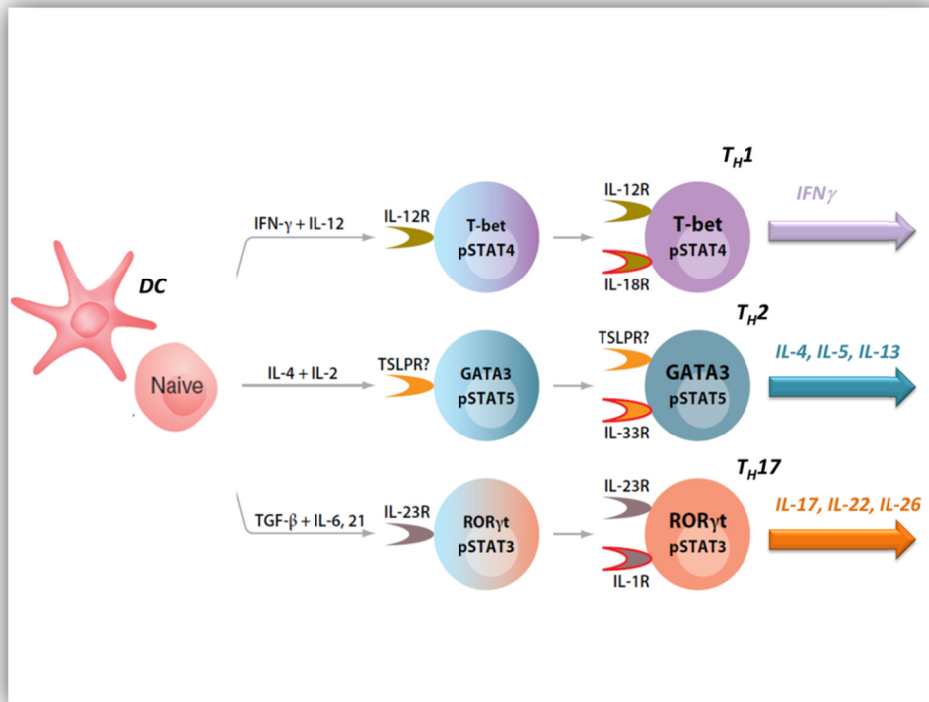


Figura 2: Polarització de la resposta immunitària

Modificat de (Laurence y O'Shea, 2007; Zhu et al., 2010)

1.1.4 Cèl·lules T reguladores (Tregs)

Tot i que fa temps que es va descriure la capacitat de certes cèl·lules T per a suprimir respostes immunitàries involucrades en fenòmens d'autoimmunitat (Sakaguchi et al., 1985, 1995), no ha estat fins l'última dècada que s'ha caracteritzat i reconegut aquesta població. Així s'ha descrit que un factor de transcripció necessari i suficient per a la funció supressora és *FoxP3* (Hori et al., 2003; Fontenot et al., 2003). Les cèl·lules reguladores són capaces d'inhibir les respostes immunitàries mitjançant diversos mecanismes. El primer grup de mecanismes és contacte dependent, i inclou l'expressió de receptors immunosupressors com CTLA-4 o LAG3 o la inducció d'apoptosi en les cèl·lules diana mitjançant l'expressió de CD95 o granzima B (Sakaguchi et al., 2010). L'altre grup de mecanismes inclou la secreció de factors solubles com citocines supressores (IL-10, TGF- β) o la depleció d'IL-2 del medi (Sakaguchi et al., 2010). Els diversos mecanismes immunosupressors poden anar dirigits tant a cèl·lules T efectores, dendrítiques (Onishi et al., 2008) o d'altres cèl·lules efectores com ara les NK. Finalment, cal destacar que es distingeixen dos grans grups

de cèl·lules reguladores. Les “naturals” s’originen en el tim com a una subpoblació més de limfòcits T madurs, però amb una funció tolerogènica molt concreta (Sakaguchi, 2004; Hsieh et al., 2012). Per altre banda, davant la presentació d’antígens externs per part de la cèl·lula dendrítica i la posterior activació de limfòcits T específics també es genera una petita població de limfòcits T reguladors (Walker et al., 2003). Aquests Tregs “induïts” contribuiran a l’homeostasi del sistema immunitari un cop l’antigen o el patògen hagi estat eliminat, minimitzant els riscos d’una resposta immunitària excessiva. Certes condicions i senyals durant la presentació antigènica, com ara el TGF- β , una estimulació subòptima del TCR i certes senyals co-estimuladores s’han vist capaces de promoure la inducció d’aquesta població (Bilate y Lafaille, 2012). El correcte balanç entre una resposta efectora i una reguladora esdevindrà cabdal per a resoldre adequadament processos d’infecció, ja que respostes amb una component efectora o reguladora excessiva poden resultar en autoimmunitat o la no resolució de la infecció, respectivament (Mills, 2004).

1.1.5 Subpoblacions de cèl·lules dendrítiques

Les cèl·lules dendrítiques conformen un grup molt heterogeni de cèl·lules amb diferent expressió de receptors de membrana, diferent localització tissular i presentació antigènica (veure taula 1). Existeixen a més, diferències importants entre el model animal més estudiat (el ratolí) i l’ésser humà en quan subtipus de cèl·lules dendrítiques (Mestas y Hughes, 2004).

1.1.5.1 Subtipus de dendrítiques en sang.

Podem distingir 2 grans grups de dendrítiques circulants: les d’origen mieloide (anomenades també convencionals o cDC) i les plasmacitoides (pDC) (Palucka et al., 2010; Belz y Nutt, 2012). És un grup cel·lular escàs, representant com a molt un 2% del total de cèl·lules en sang perifèrica. Així, les cDC es caracteritzen per la expressió o bé de CD1c (BDCA-1) o de CD141 (BCDA-3) (Dzionek et al., 2000). Aquestes cèl·lules són potents en la seva capacitat de presentació creuada, tenen una elevada capacitat migratòria i generen bones respostes CD8⁺. En general deriven de precursors en els mateixos teixits perifèrics, on constantment busquen antigen i circulen a través dels

afereents limfàtics fins als ganglis. Per altre banda, les pDCs expressen CD303 (BDCA-2) i grans quantitats del receptor d'IL-3 (CD123) (Cao et al., 2006) i excel·leixen en respostes antivirals via TLR-7 i 9, produint elevades quantitats de IFN de tipus I. Es postula que en absència d'estímuls poden ser grans inductores de tolerància. Finalment també són claus en l'activació de cèl·lules B per a la producció d'anticossos (Jego et al., 2003).

1.1.5.2 Cèl·lules dendrítiques residents en òrgans limfoides i pell.

Certes subpoblacions de dendrítiques no s'ajusten al model clàssic de captura d'antígens en perifèria i migració a ganglis. Així, existeixen dendrítiques d'origen limfoide, residents únicament en òrgans limfoides com ganglis, tim o melsa que actuen presentant els antígens que arriben a aquestes localitats. Finalment, les cèl·lules de Langerhans corresponen a dendrítiques d'origen mieloide que resideixen a la pell, però que migren a ganglis limfàtics davant la captura antigènica (Chorro y Geissmann, 2010; Hoeffel et al., 2012).

1.1.5.3 Cèl·lules dendrítiques derivades de monòcit (CDDM) com a model de dendrítica mieloide.

El cultiu de monòcits en presència de les citocines IL-4 i GM-CSF resulta en la diferenciació d'aquests monòcits cap a cèl·lules dendrítiques immadures. La dificultat d'obtenir dendrítiques directament de sang perifèrica i la senzillesa del model ha fet que aquest protocol s'hagi usat de forma massiva els últims anys. Recentment, a més, s'ha vist que aquest fenomen té lloc *in vivo*. En condicions inflamatòries certes poblacions de monòcits són reclutades a diferents teixits com a precursors de cèl·lules dendrítiques (Mildner et al., 2007; Cheong et al., 2010; Ginhoux et al., 2006). Aquest fet, però, podria restringir la validesa d'aquest model a situacions d'inflamació, no reproduint tant fidelment les funcions de la dendrítica en estats no inflamatoris.

Taula 1: Tipus de dendrítiques humanes

	<i>DCs Plasmacitoides</i>	<i>DCs Mieloides</i>	<i>Cels.</i>	<i>DCs Intersticials</i>	<i>CDDM</i>
	<i>Langerhans</i>				
Localització	Sang	Sang	Epidermis	Dermis/teixits	<i>In vitro</i>
Fenotip	CD11c ⁻ CD1a ⁺ CD1c ⁻ CD123 ^{hi} CD304 ⁺	CD11c ⁺ CD1a ⁺ CD1c ⁺ CD123 ^{low} CD304 ⁻	CD11c ⁺ CD1a ⁺ CD207 ⁺	CD11c ⁺ CD1a ⁻ CD68 ⁺	CD11c ⁺ CD1a ⁺ CD1c ⁺ CD123 ^{low}
Lectines C	BDCA2 / DCIR	DCIR, DC-SIGN i MR	CD207	DC-SIGN i MR	DCIR, DC-SIGN i MR
Activació CD4⁺ I CD8⁺	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Activació Cels B	Sí	Sí	Sí (baixa)	Sí	Sí
IFN-α	+++	+	+	+	+

Modificat de (Lambotin et al., 2010)

1.2. Infecció pel VIH.

Prop de 30 anys després del descobriment de l'agent etiològic del síndrome d'immunodeficiència adquirida o SIDA (Barré-Sinoussi et al., 1983) encara no s'ha arribat al control d'aquesta pandèmia, superant-se els 60 milions d'infectats (Deeks y Walker, 2007). Actualment, gràcies als fàrmacs antiretrovirals ha estat possible reduir la mortalitat associada a la SIDA, convertint la infecció per VIH en crònica (Gallo y Montagnier, 2003; Fauci, 2008). Desgraciadament, d'aquesta teràpia no és innòcua, i el seu cost la fa únicament accessible al primer món.

Es coneixen dos tipus de VIH, el VIH-1 i el VIH-2. Es responsabilitza al tipus 1 de la pandèmia global, mentre que el tipus 2 sembla endèmic de l'Àfrica oriental (Sharp et al., 2001), resultant a més, menys agressiu. Aquests dos virus només comparteixen un 40-50% d'homologia, però tots dos semblen provocar la mateixa simptomatologia clínica (Bock y Markovitz, 2001; Rowland-Jones y Whittle, 2007).

La transmissió del VIH és principalment per via sexual, però també es produeix a l'exposar mucoses o zones de pell lesionades a fluids infectats (sang, semen o secrecions vaginals). Els primers estadis d'infecció són semblants als d'una mononucleosi infecciosa, amb períodes de febre, faringitis i adenopaties seguit per una fase asimptomàtica, que pot variar en gran mesura, però pot durar uns 8-10 anys. Durant aquesta fase continua la replicació viral, dirigida a les cèl·lules T CD4⁺ provocant la caiguda gradual del seu nombre. En absència de tractament, s'arriba a un punt (fase de SIDA) en el qual el sistema immunitari no pot protegir al pacient d'infeccions oportunistes, que resulten letals.

1.2.1 Estructura del VIH

El VIH és un *Retrovirus* i per tant pertany a la família dels *Lentivirus*. Com a tal presenta dues còpies d'ARN⁺ de cadena única que hauran de patir un procés de retrotranscripció per a integrar-se en forma d'ADN en el genoma de l'hoste. Les partícules virals del VIH-1 tenen un diàmetre de 100nm i es troben recobertes per una membrana lipoproteica (Wilk y Fuller, 1999). Cada partícula viral conté 72 complexos glicoproteics integrats a la membrana. Cadascun d'aquest complexos està format per trímers d'una glicoproteïna externa, la gp120 i una transmembrana, la gp41 (McKeating y Willey, 1989). Donat que la unió entre gp120 i gp41 és dèbil es pot donar el fet que la gp120 s'alliberi de forma espontània. La membrana viral pot presentar diverses proteïnes provinents de la membrana de la cèl·lula hoste, com ara molècules del MHC o d'adhesió. La nucleocàpside o *core* p24 conté el genoma, que es troba formant un complex amb la nucleoproteïna p7 i la retrotranscriptasa inversa p66 (RT). S'ha de dir que les partícules virals contenen tota la maquinària enzimàtica necessària per a la seva replicació: la integrasa p32, la proteasa p11 i la RT (Frankel y Young, 1998) (veure figura 3).

Per altre banda el genoma viral codifica per altres proteïnes reguladores que ajuden al procés d'infecció (Seelamgari et al., 2004). Així, *Tat* és imprescindible per a la producció de nous virions (Hunt, 2007), *Rev* regula l'expressió de l'ARN viral, *Vif* incrementa la infectivitat i producció del genoma viral i *Vpu* facilita l'alliberament de virions en les cèl·lules infectades.

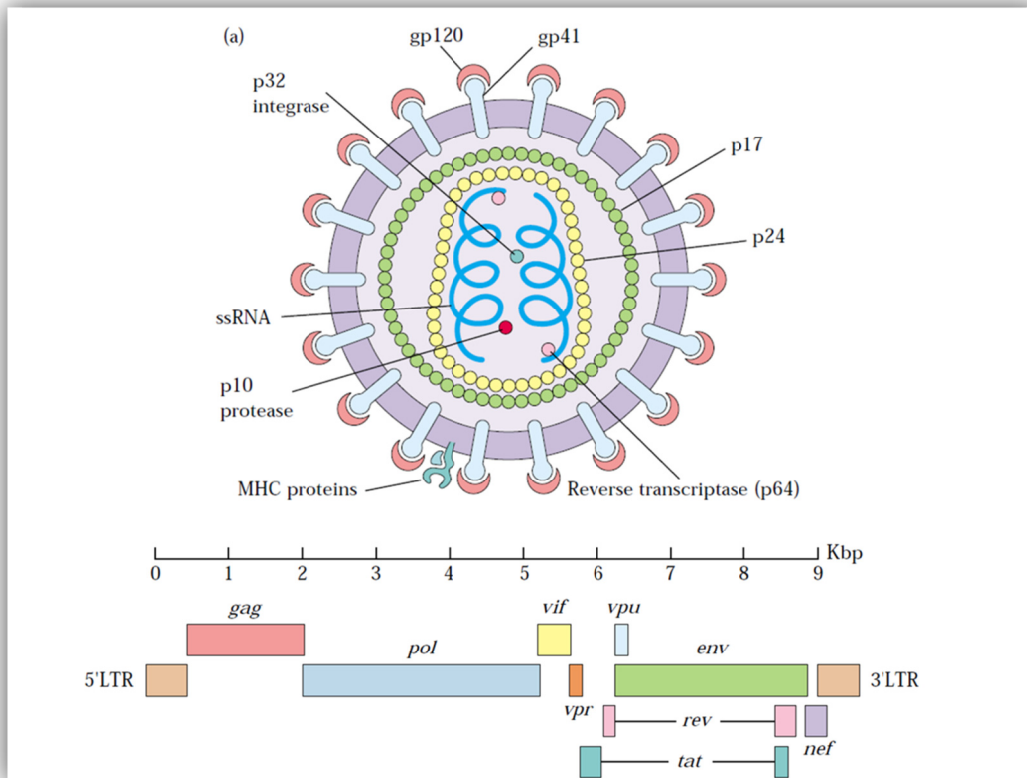


Figura 3: Estructura genòmica i del virió del VIH.

Modificat de Kuby, Immunology, 5th Edition

1.2.2 Immunopatologia de la infecció per VIH.

Les cèl·lules diana per excel·lència del VIH són els limfòcits CD4⁺, tot i que el ventall de cèl·lules susceptibles de ser infectades és ampli. La raó d'aquesta preferència és que el virus requereix l'expressió de CD4 per a que la proteïna gp120 pugui iniciar el procés de fusió en la cèl·lula diana (Dalgleish et al., 1984). A més del CD4 la infecció requereix d'un correceptor. Aquest pot ser tant el receptor de quimiocines CXCR4 o el CCR5 (Deng et al., 1996; Philpott, 2003). Així es poden distingir

entre soques R5, que infectaran preferiblement cèl·lules que expressin CCR5, com ara macròfags o dendrítiques, i soques X4 que solen aparèixer en estadis avançats de la infecció (Connor et al., 1997) i que actuen sobre limfòcits T CD4⁺. Un cop fusionat el virió amb la cèl·lula i alliberat el seu contingut s'inicia el procés de retrotranscripció a ADN. El genoma viral es susceptible llavors d'integrar-se, podent restar així durant llargs períodes de temps, generant el que s'anomena un reservori viral (Pierson et al., 2000). L'establiment d'aquests reservoris en múltiples tipus cel·lulars de llarga vida i difícil accés terapèutic (Carter et al., 2010) és en part responsable de la impossibilitat d'eradicar de forma completa la infecció.

Estudis recents basats en models de primat no humà, han determinat que la infecció per via vaginal produeix una petita infecció de cèl·lules CD4⁺, macròfags i dendrítiques residents en la làmina pròpia d'aquest teixit (Haase, 2005). Es creu que certs receptors del tipus lectina presents en dendrítiques i macròfags podrien unir el virus (Tsegaye y Pöhlmann, 2010) i possibilitar que aquest sigui transportat fins a òrgans limfoides locals, com ara ganglis limfàtics, on disposaria d'un elevat nombre de cèl·lules per infectar. Un cop les cèl·lules T infectades migren a altres òrgans limfoides o arriben a la sang, els virions es distribuïran fàcilment per la melsa, el teixit limfoide associat a l'intestí (GALT) i medul·la òssia, produint una infecció massiva, corresponent als primers símptomes clínics (veure figura 4). Posteriorment, aquesta elevada virèmia es veu reduïda per una creixent resposta T CD8⁺, acompanyada per la producció d'anticossos front el virus. Tot i que la teràpia actual redueix la virèmia a nivells indetectables, no sembla capaç de poder reconstituir el dany causat durant la infecció aguda a les poblacions T CD4⁺ en especial les residents en el GALT (Guadalupe et al., 2003; Zeng et al., 2012). Aquest fet compromet la capacitat del sistema immunitari de respondre de forma adequada i específica al virus, arribant-se així a la situació en la que la gradual manca d'una resposta immunitària efectiva permetrà la supervivència i propagació del virus (Plana et al., 1998; Douek et al., 2003). Per altre banda, la presència crònica d'antígens virals o inclús la disrupció de la integritat de la mucosa intestinal tot permetent l'accés de productes microbians (Hunt, 2007), produeix una activació general i sostinguda del sistema immunitari que pot actuar alimentant la replicació viral amb noves cèl·lules susceptibles d'infecció (Moanna et al., 2005).

Aquesta activació també provoca una acceleració dels processos de mort i regeneració de les poblacions limfocitàries, sota el risc d'exhaurir la capacitat de generar noves cèl·lules (Grossman et al., 2002).

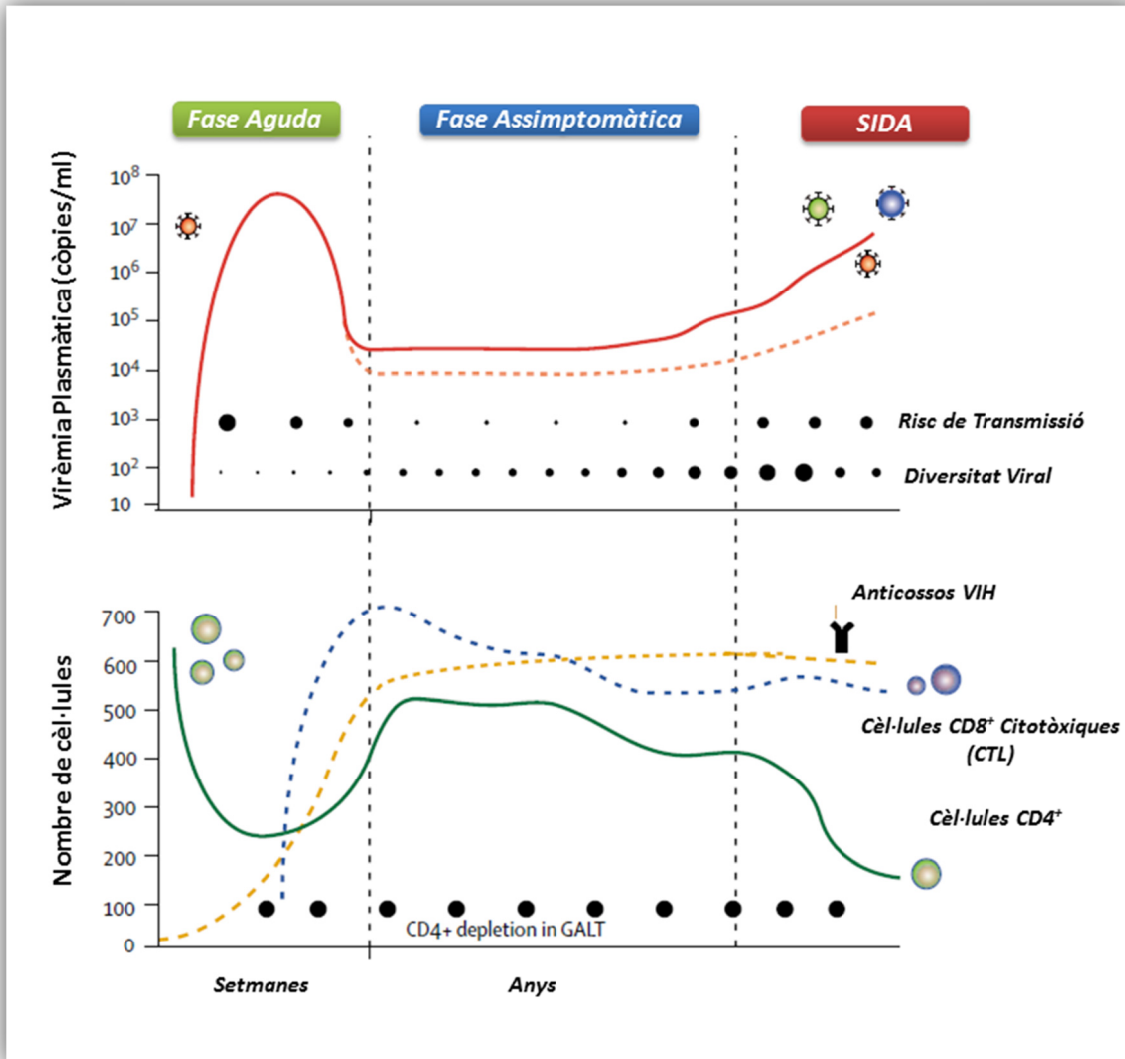


Figura 4: Progressió de la infecció per VIH.

Modificat de (Simon et al., 5)

1.2.3 Interacció del VIH amb les cèl·lules dendrítiques.

La interacció del VIH amb les cèl·lules dendrítiques resulta clau per a entendre la progressió de la malaltia. Així, ja fa temps que es coneix que les DCs són usades pel VIH per a transmetre la infecció a les cèl·lules T CD4⁺ (Cameron et al., 1992; Pope et al., 1994). Un dels mecanismes particulars que s'ha suggerit que poden intervenir en aquest procés és l'anomenada infecció *en trans*. Així DCs captarien virions intactes, i sense resultar elles mateixes infectades, posteriorment els traslladarien a la cèl·lula T durant la immunosinapsi (McDonald et al., 2003), o mitjançant exosomes (Wiley y Gummuluru, 2006).

Donada la seva localització en mucoses, les DCs es trobarien entre els primers tipus cel·lulars a interactuar amb el virus, sent aquestes interaccions decisives per al desenvolupament de la infecció (Granelli-Piperno et al., 1999; Hladik y McElrath, 2008). Tant DCs mieloides, plasmacitoides o de Langerhans són susceptibles d'ésser infectades pel VIH. Tots aquests subtipus de DCs expressen nivells baixos de CD4⁺ i els coreceptors CXCR4 i CCR5. Sembla però que les dendrítiques mieloides siguin més susceptibles a la infecció (Wu y KewalRamani, 2006). Un fet destacable és que la replicació del VIH en les DCs és molt menys productiva que en cèl·lules T CD4⁺, i comparativament, la freqüència d'infecció és fins a 100 vegades menor (Spira et al., 1996; McIlroy et al., 1995). Actualment es coneixen alguns mecanismes que podrien explicar aquestes observacions, com ara una menor expressió de coreceptors, o factors de la immunitat innata que podrien bloquejar la replicació viral, com ara APOBEC3G (Pion et al., 2006), APOBEC3A (Berger et al., 2011), SAMHD1 (Laguet et al., 2011) o pèptids antimicrobians com les alfa-defensines (veure més endavant).

1.2.4 Mecanismes d'evasió viral. Dificultats per al disseny d'una vacuna preventiva.

Existeixen nombrosos mecanismes mitjançant els quals el virus escapa al control immunitari. El més evident és segurament el fet d'infectar i eliminar progressivament les cèl·lules CD4⁺, en especial les activades i les memòria, necessàries per a desenvolupar respostes immunitàries adequades. Per altre banda, el VIH exhibeix

una taxa de replicació desorbitada, generant de l'ordre de 10^{10} partícules virals diàries (Ramratnam et al., 1999; Simon y Ho, 2003). A més, la manca d'activitat correctora d'errors de la retrotranscriptasa viral genera nombroses mutacions a cada ronda de replicació (Domingo et al., 1996), fet que genera milions de variants del virus en una sola persona infectada per dia (Perelson et al., 1996). Aquests fets fan que la variació antigènica sigui enorme, dificultant la resposta immunitària. Per altre banda, la pressió immunològica generada per anticossos específics o respostes $CD8^+$ contra antígens del virus a sovint provoca la selecció i posterior amplificació d'aquells virus viables amb mutacions en aquests antígens, fet que s'anomena escapada viral (Frost et al., 2005; Yang et al., 2003). Aquest fenomen també s'observa davant la pressió generada per la teràpia, fet que fa indispensable l'ús d'una combinació de fàrmacs.

Per altre banda, les proteïnes de l'embolcall del VIH es troben altament glicosilades, fet que redueix la seva immunogenicitat, i dificulta la generació d'anticossos neutralitzants (Sagar et al., 2006; Rusert et al., 2011). Recentment s'ha observat també que el virus pot disseminar-se mitjançant interaccions cèl·lula-cèl·lula, fet que l'emascararia tant de la resposta immunitària com del tractament antiretroviral (Sigal et al., 2011; Abela et al., 2012). Tots aquests mecanismes, són potser els principals problemes alhora de plantejar vacunes preventives per al VIH, que a més mostra una extraordinària adaptació a qualsevol mecanisme dissenyat per a eradicar-lo (Taylor et al., 2008; Bunnik et al., 2010).

1.2.5 Paper de la resposta immunitària en la defensa davant el VIH. Individus exposats no infectats (EU) i controladors de la infecció viral.

Actualment s'observa una gran variabilitat pel que fa a com la infecció pel VIH progressa en diferents individus, fet que resulta en classificacions clíniques més aviat arbitràries (Pereyra et al., 2008; Walker, 2007) (veure taula 2). Tot i això, s'evidencia que una molt petita part dels pacients infectats (1%) poden controlar la infecció sense necessitat de teràpia, mantenint càrregues virals plasmàtiques pràcticament indetectables, és a dir per sota de 50-75 còpies/ml (Hubert et al., 2000; Deeks y Walker, 2007). Aquest grup de pacients actualment és anomenat "elite controllers" i

l'estudi dels mecanismes que permeten aquest grau de control hauria d'ajudar en la recerca per combatre la infecció.

Per altre banda, s'ha demostrat també l'existència d'una cohort d'individus que romanen sans tot i múltiples exposicions al VIH (Rowland-Jones y McMichael, 1995) (Individus exposats no infectats o EU). Aquesta aparent resistència natural a la infecció no ve donada per la via de transmissió, donat que aquesta cohort conté homes i dones, exposats a la infecció per transmissió sexual o bé per transfusions o lesions amb material infectat (Restrepo et al., 2011). S'han proposat diferents mecanismes que podrien explicar un cert grau de protecció davant la infecció, però tot sembla indicar que seria la combinació de múltiples d'aquests factors el que resultaria en un control o una protecció davant el VIH.

Taula 2: Paràmetres clínics representatius de diferents grups de pacients VIH en absència de teràpia (HAART)

	<i>"Chronic Progressors"</i>	<i>"Viremic Controllers"</i>	<i>"Elite Controllers"</i>
HIV RNA ^a	5,18 (4,83-5,44)	2,89 (2,54-3,18)	No detectable
CD4⁺ cels/mm³	295 (203-455)	602 (451-786)	884 (641-1149)
Home / Dona (%)	80 / 20	78 / 22	64 / 36

^a Copies/ml (Log₁₀)

Modificat de (Pereyra et al., 2008)

1.2.5.1 Factors genètics

Part de les grans diferències observables entre diferents pacients en quan a la progressió de la malaltia es podrien deure a factors genètics de l'hoste. Així un d'aquests factors associats amb el control viral és la presència de certs al·lells concrets del MHC de classe I, en particular l'HLA-B (Kiepiela et al., 2004). Així, els al·lells HLA-B5701 i el HLA-B5703 es troben incrementats en cohorts de pacients que controlen la

infecció (Migueles et al., 2000; Bailey et al., 2006). Aquests al·lels per si sols, s'associarien a un control de la infecció un cop aquesta ja es troba establerta, però no a protecció davant la mateixa (Gao et al., 2010). En canvi s'ha demostrat que la coexpressió de l'al·lel HLA-B57 i el KIR3DL1 (relacionat amb una major funció de cèl·lules NK) sí pot resultar protector davant la exposició al VIH (Boulet et al., 2008).

Per altre banda, diferències genètiques tant en la expressió dels coreceptors CCR5 i CXCR4, o en la dels seus lligands es poden associar a diferents progressions o inclús a protecció davant la infecció. Així, la homozigositat per a una deleció de 32 parells de bases en la seqüència del receptor CCR5 (*CCR5 Δ32*) provoca la incapacitat del virus per a entrar i infectar la cèl·lula, resultant en protecció davant la infecció (Liu et al., 1996). Aquesta mateixa deleció, quan es presenta en heterozigosi proporciona una progressió molt més lenta de la infecció (Buseyne et al., 1998). Les quimiocines que actuen com a lligands naturals del CCR5 (CCL3, CCL4, CCL5 i CCL31L) i del CXCR4 (CXCL12/SDF-1 α), poden actuar com a antagonistes per a la unió del virus, reduint per tant, la seva infectivitat (Cocchi et al., 1995; Paxton et al., 1998; Oberlin et al., 1996; Scarlatti et al., 1997). Polimorfismes que incrementin l'expressió d'algun d'aquests lligands del CCR5 o del CXCR4 podrien, per tant, actuar dificultant la infecció (Reiche et al., 2007; Hu et al., 2012). Addicionalment, certs gens es poden heretar en un nombre de còpies variable, fet que influirà decisivament en la quantitat de proteïna expressada, contribuint a una gran variabilitat dins la població (Wain et al., 2009; Zhang et al., 2009). Així, per exemple, el gen codificant per a la quimiocina CCL31L s'hereta en un nombre variable de còpies, fet que afectarà decisivament a una elevada susceptibilitat a la infecció (nombre baix de còpies) o a una major resistència a la mateixa (nombre elevat de còpies) (Gonzalez et al., 2005; Colobran et al., 2010). No només el contingut genèc és important a l'hora de determinar la quantitat de producte proteic que s'expressarà. S'ha observat també l'existència de una elevada variabilitat en les seqüències reguladores de la regió codificant per a CCR5, influint la progressió de la infecció per VIH (Martin et al., 1998).

La demostració potser més espectacular del grau de protecció que poden oferir alguna d'aquestes variants genètiques és el cas d'un transplantament de moll d'ós d'un

individu sa homozigot per a la deleció *CCR5 Δ32* a un pacient que patia una leucèmia aguda tot estant infectat pel VIH. 20 mesos després del transplantament, el pacient receptor no mostrava replicació del VIH inclús en absència de tractament antiretroviral (Hütter et al., 2009). No només això, 3 anys i mig després, el mateix individu mostrava signes de recuperació de les poblacions CD4⁺ tant a nivell de mucoses com sistèmiques sense cap signe de replicació viral, fet que els autors tradueixen en la cura del VIH en aquest individu (Allers et al., 2011).

Els mecanismes mitjançant els quals aquestes particularitats genètiques assoleixen un control de la infecció son només parcialment coneguts i es suposen multifactorials, combinant una entrada viral restringida, una millor immunitat cel·lular i d'altres mecanismes (Dolan et al., 2007).

1.2.5.2 Factors de la immunitat innata

Donat que la gran replicació viral i pèrdua de CD4⁺ en mucoses durant la infecció aguda es produeix abans d'arribar a obtenir-se una resposta adaptativa, la resposta innata pot ser clau en aquests primers estadis de la infecció (Pichlmair y Reis e Sousa, 2007). Així tal i com s'ha descrit anteriorment al·lèls per al receptor KIR3DL1, relacionat amb la funcionalitat de cèl·lules NK, s'ha relacionat amb reducció de la progressió de la malaltia. Recentment a més, s'ha observat un nombre de còpies variable per al gen KIR3DH (receptor activador) que s'associa a un major control de la infecció en primats no humans (Hellmann et al., 2011). De forma encara més rellevant, s'ha observat una major funcionalitat NK (mesurada en capacitat de lisi i secreció de citocines, com ara IFN- γ) en varies cohorts d'individus exposats no infectats (Scott-Algara et al., 2003; Montoya et al., 2006; Ravet et al., 2007; Ghadially et al., 2012).

Un altre tipus cel·lular important en la resposta antiviral innata són les cèl·lules dendrítiques plasmacitoides, per la seva gran producció d'interferons de tipus I. La infecció per VIH produeix un marcat descens en el nombre d'aquestes cèl·lules (Schmidt et al., 2006). Així s'ha observat un major nombre de pDCs en individus que controlen la infecció comparat als que no la controlen. A més en individus exposats no infectats s'ha observat un major nombre de cèl·lules dendrítiques, macròfags i NK en

mucooses, suggerint que un major nombre d'aquestes cèl·lules en la localització precisa d'entrada de la infecció podria resultar protectora (Lehner et al., 2008).

Finalment, tant les α com les β -defensines són un mecanisme efector de la immunitat innata que s'han associat a protecció davant el VIH (veure més endavant).

1.2.5.3 Factors cel·lulars de restricció viral.

Estudis recents han evidenciat que cèl·lules de certs individus mostren poca permissivitat a la infecció per VIH *in vitro*. Aquesta resistència vindria donada per proteïnes intracel·lulars amb activitat antiviral innata. Aquestes proteïnes són enzims, que en general tenen com a substrats cadenes d'ARN o d'ADN, incloent el genoma viral quan aquest infecta la cèl·lula. Alguns d'aquests factors de restricció són APOBEC, AID, TRIM5 α o SAMHD1. APOBEC3G, per exemple, és una citidina desaminasa que actua sobre la cadena d'ADN viral un cop és retrotranscrita (Harris et al., 2003). La seva activitat genera canvis G \rightarrow A, provocant, per tant, mutacions letals o la inestabilitat de la nova cadena d'ADN, fet que disminuirà la productivitat de la replicació viral (Harris y Liddament, 2004; Martin et al., 2011). TRIM5 α , en canvi, interactua amb la càpsida viral provocant una infecció abortiva, fet que també s'ha mostrat protector davant la infecció viral (Sewram et al., 2009; Black y Aiken, 2010).

Finalment, SAMHD1 és un factor de restricció expressat en cèl·lules dendrítiques, i actua d'una forma totalment diferent, ja que no té cap estructura viral com a substrat. En canvi, mostra activitat trifosfohidrolasa, convertint deoxinucleòsids trifosfats en deoxinucleòsids i fòsfor inorgànic (Goldstone et al., 2011). Aquesta activitat per tant, redueix en gran mesura els nivells cel·lulars de dNTPs, necessaris per a la retrotranscripció viral (Lahouassa et al., 2012). És força interessant destacar que el VIH conté contramesures per tots aquests tipus de factors, fet indicatiu d'una llarga co-evolució. Així la proteïna viral *Vif*, actua marcant APOBEC3G per a la seva degradació al proteasoma, eliminant així aquest factor de restricció (Chiu y Greene, 2008; Jäger et al., 2012). Per altre banda, *Vpx* actua de forma similar amb SAMHD1 (Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011).

1.2.5.4 Factors de la immunitat adaptativa: Immunitat cel·lular CD8 i CD4

Immediatament després de la fase aguda de la infecció, quan hi ha el pic de virèmia, s'inicia una forta resposta CD8⁺, inicialment capaç de matar directament cèl·lules infectades pel VIH. Varis estudis demostren que la funcionalitat d'aquestes cèl·lules és major en individus que controlen la infecció. Així, s'ha vist una major proliferació CD8 antigen específica i secreció de perforina, així com de IFN- γ , CCL3, TNF- α o IL-2 tant en individus capaços de controlar la malaltia (Migueles et al., 2002; Betts et al., 2006; Hersperger et al., 2010) com en individus exposats però no infectats (Skurnick et al., 2002; Makedonas et al., 2005). Per altre banda, l'ajuda CD4⁺ és crítica per a mantenir una resposta CD8⁺ efectiva (Grakoui et al., 2003; Phares et al., 2012). Actualment es considera que la depleció de cèl·lules CD4⁺ VIH específiques durant la infecció aguda pot ser un dels mecanismes que evitaria el control del VIH en els humans (Douek et al., 2002). En un estudi recent realitzat en una cohort de controladors es va observar que la correlació més consistent amb el control del virus era una resposta CD4⁺ polifuncional (secreció d'IFN- γ i IL-2) (Hunt et al., 2008; Pereyra et al., 2008). De forma important, també s'han trobat respostes HIV específiques en cèl·lules CD4 d'individus exposats no infectats, correlacionant-se a més, amb els nivells de càrrega viral als quals s'ha estat exposat (Suy et al., 2007).

1.2.5.5 Immunitat humoral.

Entre les diferents immunoglobulines, les més rellevants per a la infecció per VIH són la IgA i la IgG. Mentre que la IgA és predominant en mucoses, la IgG ofereix protecció sistèmica al ser la més abundant en sèrum. Tot i que la contribució relativa dels anticossos en la protecció davant el VIH és encara controvertida ja que molts pacients controladors no presenten aquests anticossos (Doria-Rose et al., 2010; Mendoza et al., 2012), certs estudis han demostrat l'existència d'anticossos neutralitzants d'ampli espectre en alguns pacients capaços de controlar la infecció (Cao et al., 1995). Per altre banda, en cohorts d'exposats no infectats s'han observat anticossos neutralitzants IgA anti-gp41 i IgG anti CD4-gp120 (Lopalco et al., 2005; Tudor et al., 2009). De forma molt interessant, en els individus infectats per VIH s'observa l'aparició d'anticossos davant autoantígens, com ara el CD4, el CCR5 o el HLA (Callahan et al., 1992; Borghi et al., 1993). Curiosament, tot i no estar infectats, s'han

observat autoanticossos davant CD4, HLA o CCR5 en individus exposats no infectats (Burastero et al., 1996). Així mateix, una gran proporció dels anticossos neutralitzants d'ampli espectre per al VIH, s'han demostrat també autoreactius a molècules lipídiques, com ara la cardiolipina (Haynes et al., 2005). Aquesta observació podria suggerir que certs fenòmens de resistència a la infecció pel VIH es troben al llindar de la autoimmunitat, fet que podria fer discutible la idoneïtat de promoure aquests fenòmens en vacunes preventives (Lopalco y Burastero, 2008; Haynes et al., 2010).

1.3. CD26. Estructura i funció.

1.3.1 Estructura Molecular

La Dipeptidil Peptidasa IV (DPPIV, EC 3.4.14.5) es va descriure originalment al 1966, com a una glicoproteïna homodimèrica transmembrana de tipus II (extrem C-terminal a l'espai extracel·lular), amb una massa molecular de 220-240 kDa (Hopsu-Havu y Glenner, 1966). Posteriorment es va determinar que aquesta proteïna es corresponia amb el CD26, un antigen de superfície present en leucòcits (Tanaka et al., 1992; Fleischer, 1994). El gen del CD26 humà consta de 26 exons i es troba situat al cromosoma 2q24.2 (Abbott et al., 1994). Aquest gen codifica una proteïna d'un total de 766 aminoàcids dels quals 6 són intracel·lulars, 23 transmembrana i la resta (737) extracel·lulars (veure Fig x). El CD26/DPPIV forma part d'una família de serin-proteases anomenada S9b. A més del CD26, també són membres destacats d'aquesta família la prolil endopeptidasa (PEP), l'acilaminoacil peptidasa (ACPH), la proteïna activadora de fibroblast (FAP) i els DPP8-10 i DPPX (Frerker et al., 2007; Deacon y Holst, 2006). El domini extracel·lular del CD26 és el que posseeix activitat enzimàtica, reconeixent i tallant els dos últims enllaços peptídics de l'extrem N-terminal de polipèptids on una alanina o una prolina es troben en la penúltima posició (Tanaka et al., 1992; Fleischer, 1994).

El CD26 conté nou llocs potencials de glicosilació propers a l'extrem N-terminal, 7 dels quals estàn situats entre l'arg54 i l'asn497 d'un domini que es disposa en forma de full β (Aertgeerts et al., 2004). Entre aquests llocs potencials de glicosilació, l'Asp321 és important per a un correcte plegament i tràfic intracel·lular de la proteïna, però cap lloc de glicosilació es indispensable per a l'activitat enzimàtica, la dimerització o la interacció amb altres proteïnes (Aertgeerts et al., 2004). El domini catalític del CD26 conté 2 llocs de glicosilació i està situat proper a l'extrem C-terminal, concretament entre la gln508 i la pro766. Aquest domini adopta una estructura de plegament α/β (*hydrolase fold*) amb el centre catalític (Ser630-Asp708-His740) en una àmplia cavitat (o túnel central) entre el full β i el plegament α/β . Aquesta cavitat o túnel central conté una seqüència consens (Gly-X-Ser-X-Gly), present en altres membres de la família (David et al., 1993; Rasmussen et al., 2003). Gràcies a estudis emprant mutants puntuals es va poder determinar que els residus glu205 i glu206 són essencials per a l'activitat enzimàtica (Abbott et al., 1999), mentre que el residu His750 és clau per a la dimerització de la molècula (Chien et al., 2004). L'especificitat del CD26 per als seus substrats ve determinada pels aminoàcids situats a l'obertura del centre catalític (Fülöp et al., 1998), restringit a pèptids menors de 30 aminoàcids (Engel et al., 2003).

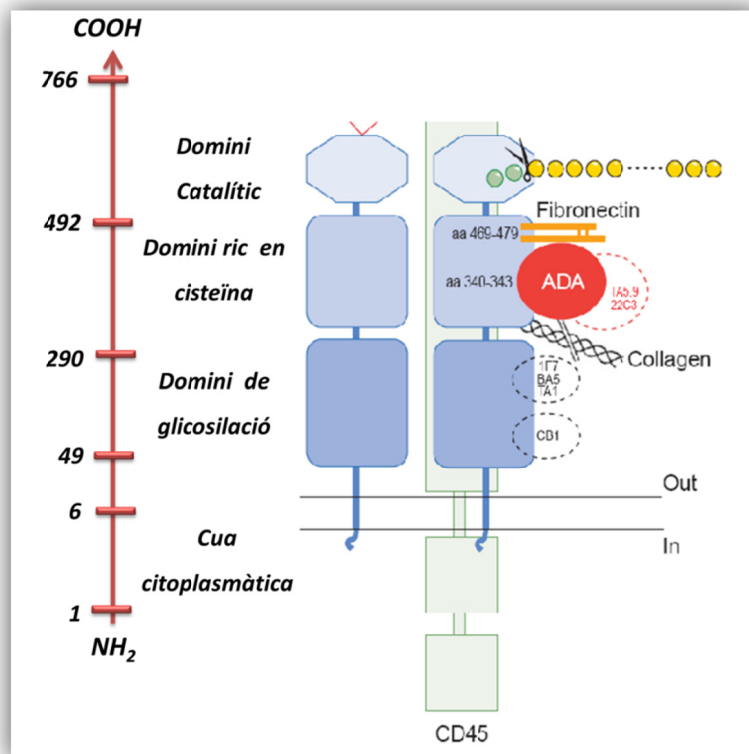


Figura 5. Esquema de l'estructura del CD26. Es senyalen els dominis d'interacció amb altres proteïnes i el domini amb activitat enzimàtica. *Modificat de* (De Meester et al., 1999)

1.3.2 Expressió i funció

1.3.2.1 Expressió de CD26

El CD26 es troba altament expressat en fetge i pulmó (Abbott et al., 1994). Altres òrgans on el CD26 és present són el cervell, el cor, l'intestí, els ronyons, el múscul esquelètic i la placenta (Abbott et al., 1994; Stange et al., 2000; Morrison et al., 1993; Vahl et al., 2003). És de destacar que el CD26 és present a l'endoteli de tots els òrgans humans estudiats (Dinjens et al., 1989). El CD26 s'expressa sobretot en cèl·lules del sistema immunològic, com ara limfòcits T (Morimoto et al., 1989), cèl·lules B (Bühling et al., 1995), monòcits (Stohlawetz et al., 1998) cèl·lules NK (Bühling et al., 1994; Yamabe et al., 1997) i dendrítiques (Gliddon y Howard, 2002; Pacheco et al., 2005). Com a antigen d'activació, l'expressió de CD26 és relativament baixa en limfòcits T o B *naive*, augmentant significativament per l'activació mitjançada per antigens o mitògens com el PHA o el PWN (Gorrell et al., 2001). En cèl·lules T CD4⁺, l'expressió del CD26 és afavorida per aquells estímuls que indueixen respostes de tipus Th-1 (Willheim et al., 1997), possiblement per un mecanisme dependent d'IL-12 (Cordero et al., 1997). Per altra banda s'ha vist que citocines supressores com el TGF- β , redueixen l'expressió de CD26 en la membrana cel·lular (Uematsu et al., 2004). Paral·lelament s'ha observat una elevada expressió de CD26 en cèl·lules memòria CD45RO⁺, tant CD4⁺ com CD8⁺ (Dong y Morimoto, 1996; Ibegbu et al., 2009). Aquestes cèl·lules memòria amb elevats nivells de CD26 serien les més capacitades per a migrar a través de l'endoteli (Brezinschek et al., 1995; Mizokami et al., 1996) i per a donar senyals als limfòcits B que els permetrien diferenciar-se a cèl·lules plasmàtiques productores d'IgG (Dang et al., 1990; Gruber et al., 1988).

Per altre banda, és coneguda l'existència d'una forma soluble de CD26 (SCD26), sense els dominis intracel·lulars ni el transmembrana. Degut a que en tots els tipus

cel·lulars investigats fins ara s'ha trobat un únic RNAm corresponent a CD26 (Bauvois et al., 2000), i que la proteïna es transporta al seu destí final ja unida a membrana, es creu que el SCD26 no és una proteïna secretada, sinó un producte de proteòlisi un cop s'ha expressat a la membrana (Gorrell et al., 2001). Aquesta forma de CD26 és present en elevades quantitats en el fluid seminal i en quantitats moderades en sèrum i líquid cefaloraquidi tot mantenint la seva activitat enzimàtica (De Meester et al., 1999; Durinx et al., 2000).

1.3.2.2 Activitat dipeptidil peptidasa del CD26

Els substrats del CD26 són neuropèptids, hormones, pèptids vasoactius i quimiocines (Taula 3). L'activitat DPPIV del CD26 afecta als diferents substrats provocant que les formes truncades siguin més o menys actives, modificant el reconeixement pels seus receptors o la seva estructura, permetent o impedit la posterior acció de diverses proteases. (Cordero et al., 2009). Donada l'àmplia varietat dels substrats, la funció enzimàtica del CD26 afecta àmbits tant diversos com la funció digestiva, els nivells de glucosa sanguinis (Drucker, 2007) o la mobilització de precursors hematopoiètics (Christopherson et al., 2004; Focosi et al., 2008). En quan al sistema immunològic, l'activitat enzimàtica del CD26 promou de forma global una major activació de la resposta T davant d'estímuls antigènics, però no davant mitògens com ara el PHA o anticossos α -CD3 (Tanaka et al., 1994). Per altra banda, l'acció enzimàtica del CD26 sobre les diverses quimiocines afavoriria una atracció preferent de cèl·lules Th-1, promovent una major infiltració de macròfags i neutròfils (Boonacker y Van Noorden, 2003; Cordero et al., 2009).

Donat l'ampli ventall de substrats afectats per l'activitat DPPIV, existeix un gran interès en la recerca sobre inhibidors d'aquesta activitat (Lambeir et al., 2003). Així s'han desenvolupat inhibidors que estan en fase clínica II/III (Val-boroPro) per al tractament de certs càncers (Narra et al., 2007), i dos ja estan aprovats per al tractament de diabetis tipus II (Drucker y Nauck, 2006; Cordero et al., 2009). En quan al sistema immunològic, l'ús d'inhibidors químics s'ha demostrat capaç de reduir l'activació i proliferació limfocitària, tot induint la secreció de citocines inhibidores, com ara el TGF- β (Reinhold et al., 1997, 2008). Aquests resultats contrasten però, amb

altres estudis on mutacions en el domini que inclou el centre catalític no inhibeixen la senyalització activadora d'aquesta molècula (Hühn et al., 2000; Gorrell et al., 2001). La relativa poca especificitat dels inhibidors i el fet que bona part de la família Sb9 de proteases comparteix activitat catalítica dificulten les conclusions d'aquests estudis i suggereixen que l'activitat enzimàtica pot no ser la única implicada en l'activació mitjançada pel CD26.

Taula 3. Efecte enzimàtic del CD26 sobre varies quimiocines

<i>Quimiocina</i>	<i>Efecte Biològic</i>	<i>Espècie</i>	<i>Referència</i>
<i>CCL3 (MIP-1α, LD788)</i>	Activitat incrementada	Humà	(Proost et al., 2000)
	Canvi preferència receptor		(Struyf et al., 2001)
<i>CCL4 (MIP-1β)</i>	Canvi preferència receptor	Humà	(Guan et al., 2004)
<i>CCL5 (RANTES)</i>	Canvi preferència receptor	Humà	(Oravec et al., 1997)
<i>CCL11 (Eotaxin)</i>	Inactivació	Humà, Rata	(Struyf et al., 1999)
<i>CCL22 (MDC)</i>	Canvi preferència receptor	Humà	(Proost et al., 1999)
<i>CXCL6 (CGP-2)</i>	sense canvis	Humà	(Oravec et al., 1997)
<i>CXCL9 (MIG)</i>	Inactivació	Humà	(Proost et al., 2001)
<i>CXCL10 (IP-10)</i>	Inactivació, Antagonista CXCR3	Humà	(Proost et al., 2001)
<i>CXCL11 (I-TAC)</i>	Inactivació, Antagonista CXCR3	Humà	(Proost et al., 2001)
<i>CXCL12 (SDF-α)</i>	Inactivació, Antagonista CXCR4	Humà	(Ohtsuki et al., 1998)

Modificat de (Cordero et al., 2009).

1.3.2.3 Activitat no enzimàtica del CD26. CD26 com a molècula coestimuladora.

Estudis previs han demostrat que amb l'ús d'anticossos monoclonals immobilitzats contra CD3 i CD26 és possible incrementar la proliferació, la secreció de citocines, l'expressió de marcadors d'activació i la funció efectora de limfòcits T (De Meester et al., 1999; Gorrell et al., 2001) i NK (Yamabe et al., 1997). Aquesta acció és independent de la activitat DPPIV del CD26 i posa de relleu que interaccions extracel·lulars amb el CD26 poden tenir com a resultat senyals co-estimuladores. Quan es va estudiar la via de senyalització intracel·lular implicada en la co-estimulació induïda per anticossos activants contra CD26, es va observar un increment en la fosforilació de les proteïnes participants en la senyalització via CD3; és a dir, p56lck, p59fyn, ZAP70, c-Clb, fosfolipasa C- γ i MAP quinases (Tanaka et al., 1992; Hegen et al., 1997). Donat que el CD26 té un domini citoplasmàtic de només 6 aminoàcids, sense cap estructura coneguda d'ancoratge o senyalització cel·lular es va postular que era necessària l'associació de CD26 a d'altres estructures de membrana per a mitjançar una senyal. En aquest sentit s'ha demostrat l'associació del CD26 amb el CD45, una tirosin fosfatasa expressada a la membrana de cèl·lules T (Torimoto et al., 1991). Posteriorment, es va veure que quan el CD26 s'associa a la isoforma CD45RO, característica de cèl·lules activades, ambdues proteïnes es localitzen en els dominis de caveolina (*lipid rafts*) tot promovent una senyal co-estimuladora (Ishii et al., 2001). En canvi, quan el CD26 s'associa amb la isoforma CD45RA, característica de cèl·lules inactives, ambdues molècules són excloses de les caveoles, fet que evitaria posteriors senyals co-estimuladores (Kobayashi et al., 2004). Alternativament, també s'ha descrit la possibilitat de co-estimulació a través de la unió de SCD26 a proteïnes de membrana com la caveolina-1 (Ohnuma et al., 2001, 2008).

A data d'avui s'han descrit diverses proteïnes capaces d'interactuar extracel·lularment amb el CD26, i per tant candidates a inductores de co-estimulació. Entre aquestes s'inclouen l'ADA (veure més endavant), components de matriu extracel·lular com el col·lagen i la fibronectina (Bauvois, 1988; Piazza et al., 1989) o altres proteïnes com el plasminogen (Gonzalez-Gronow et al., 2001). Aquestes

interaccions actuarien en general afavorint la migració cel·lular. Per exemple, l'anclatge del plasminògen a la superfície cel·lular afavoriria el seu pas a plasmina, fet que comportaria la degradació de components de la matriu extracel·lular i una major migració cel·lular, o en el cas de cèl·lules tumorals, major invasió o metàstasi (Cordero et al., 2009; Gonzalez-Gronow et al., 2004, 2005). De forma global, els rols tant enzimàtic com no enzimàtic del CD26, conjuntament amb les seves interaccions amb altres proteïnes tenen una important influència en la infecció per VIH (veure més endavant)

1.4. L'adenosina i els seus receptors.

1.4.1 Producció d'adenosina

L'adenosina és un nucleòsid de purina, que pot ésser sintetitzat *de novo* per alguns teixits com el fetge, però que majoritàriament es genera com a conseqüència de vies de degradació de nucleòtids com ara ATP, ADP o AMP. L'adenosina resulta clau com a precursora estructural de components de l'ADN, o de molècules implicades en processos de transferència energètica de la cèl·lula. A més, també es troba implicada en processos de senyalització, com a precursora de segons missatgers com ara l'AMP cíclic (AMPC) o a través de la seva pròpia interacció amb diferents receptors.

Els nivells d'adenosina intracel·lulars i extracel·lulars estan finament regulats, tant per vies metabòliques de producció i degradació com pel transport a través de la membrana cel·lular mitjançant per diferents transportadors de nucleòtids. Així cèl·lules metabòlicament més actives o situacions d'estrès cel·lular comporten una major generació d'adenosina, en general com a resultat d'una major degradació d'ATP (Haskó y Cronstein, 2004). Aquest acúmul d'adenosina intracel·lular es traduirà en un major transport d'aquest nucleòsid a l'espai extracel·lular mitjançant diversos transportadors (Molina-Arcas et al., 2008). A nivell extracel·lular s'ha descrit l'existència de la maquinària enzimàtica de producció i degradació d'adenosina en forma d'ectoenzims ancorats a la membrana plasmàtica. Així, per exemple, l'acció concertada del CD39 (o NTPD) i el CD73 (5'-ectonucleotidasa) resulta en la degradació d'ATP i la generació d'adenosina extracel·lular (Yegutkin, 2008). Això, conjuntament

amb l'existència de transportadors d'ATP, evidencia la complexitat i la interconnexió de diferents vies metabòliques de generació i degradació de nucleòtids en general i d'adenosina en particular (Junger, 2011). Aquesta complexitat comporta que el metabolisme purínic tingui un paper com a sistema de senyalització o comunicació cel·lular. Les concentracions plasmàtiques d'adenosina en un individu sa s'estimen menors d'1µM, mentre que en condicions associades amb inflamació i isquèmia arribarien als 4-10 µM (Martin et al., 2000). Aquestes concentracions probablement serien encara més elevades en processos inflamatoris a nivell de mucoses o teixits.

1.4.2 Receptors d'adenosina

L'adenosina és l'agonista natural de 4 receptors diferents, tots amb 7 dominis transmembrana i acoblats a proteïna G (GPCR), els receptors A₁, A_{2A}, A_{2B}, i A₃. En general, aquests receptors exposen el domini N-terminal a l'espai extracel·lular, mentre que el domini carboxi-terminal queda al citosol. L'adenosina, a través de la interacció amb els seus receptors, modula diverses accions en una gran varietat d'òrgans i teixits, actuant com a neurotransmissor (Stone et al., 2009), cardioprotector (Cohen y Downey, 2008) i molècula antiinflamatòria (Haskó et al., 2008), entre els efectes més estudiats. Pel que fa als seus receptors, n'hi ha d'alta afinitat com l'A₁ i l'A_{2A} i de baixa afinitat, com l'A_{2B}, i l'A₃. Donada l'elevadíssima varietat d'efectes de l'adenosina, és d'esperar diferències en l'expressió d'aquests i en la seva traducció de senyals. Així els receptors d'adenosina s'acoblen a diferents proteïnes G, iniciant vies de senyalització que poden diferir totalment (Taula 4). A més, evidències experimentals recents indiquen que existeix encara un nivell superior de regulació d'aquests receptors en forma de complexos (heteròmers) amb altres receptors d'adenosina o receptors d'altres hormones, amb propietats de senyalització úniques (Ferré et al., 2007; Ferre et al., 2008). També és interessant destacar l'existència d'antagonistes naturals d'aquests receptors com són la cafeïna o la teofil·lina (Müller y Jacobson, 2011)

Taula 4. Receptors d'Adenosina en cèl·lules del sistema immunitari

Expressió en cèl·lules del sistema immunitari

Prot G	Senyal	Neutròfils	Monòcits	DCs	T	B	NK
A₁	G _{i/o}	+/- AMPc	+	+	+	ND	ND
		+ PLC					
A_{2A}	G _s	↑ AMPc	+	+	+	+	+
A_{2B}	G _s	↑ AMPc	+	+	+	ND	+
A₃	G _{i/o}	↓ AMPc	+	+	+	ND	+
	G _{q/11}	↓ IP ₃					

Modificat de (Jacobson y Gao, 2006; Haskó et al., 2008; Junger, 2011)

1.4.3 Efectes de l'adenosina en el sistema immunitari

Com s'ha comentat en apartats anteriors, l'acció del sistema immunitari resulta clau per assegurar un correcte funcionament dels diversos teixits i òrgans existents, tot protegint-los de l'acció de patògens i encarregant-se d'eliminar cèl·lules pròpies mortes o programades per a morir (apoptosi). Per altre banda, una inflamació o activació immunològica exacerbada o prolongada en el temps pot resultar en dany tissular. S'ha postulat que l'acció de l'adenosina és capaç de generar potents respostes immunosupressores a diferents nivells i cèl·lules del sistema immunitari, amb l'objectiu final d'evitar un excés de resposta immunitària. En general, les accions de l'adenosina s'associen a una menor secreció de molècules pro-inflamatòries com IL-12, TNF- α , MIP1- α o òxid nítric, i a un increment en la secreció d'aquelles anti-inflamatòries com IL-10, en resposta a estímuls inflamatoris com LPS en cèl·lules presentadores d'antigen, tant macròfags murins (Haskó et al., 1996; Szabó et al., 1998; Haskó et al., 2000) com dendrítiques humanes (Panther et al., 2003; Schnurr et al., 2004). Les accions de l'adenosina també resulten en una menor secreció d'IL-2 per part de cèl·lules T (Erdmann et al., 2005), fet que reduiria la seva capacitat proliferativa. A més,

l'adenosina promou una menor expressió de molècules co-estimuladores com CD28 o CD40L en aquestes cèl·lules, tot incrementant l'expressió de molècules inhibidores com ara PD-1 o CTLA-4 (Butler et al., 2003; Sevigny et al., 2007).

Mitjançant l'ús d'agonistes i antagonistes per als diferents receptors d'adenosina, combinat amb l'ús de ratolins *knockout* per als receptors, s'ha determinat que el receptor A_{2A} seria el responsable de bona part de les accions de l'adenosina abans esmentades. No obstant, les conclusions d'aquests estudis depenen en últim terme d'una bona selectivitat dels agonistes/antagonistes per als seus respectius receptors, i de l'expressió dels receptors d'adenosina en les cèl·lules estudiades. El fet que aquests dos paràmetres variïn en gran mesura en diferents treballs i cèl·lules fan que no es pugui descartar una contribució dels altres receptors al global dels efectes de l'adenosina. En aquest sentit les cèl·lules dendrítiques (DC) són paradigmàtiques. En el seu estat immadur expressen els quatre receptors (Junger, 2011), en canvi, en la dendrítica madura l'expressió del receptor A_1 és pràcticament inexistent, tant a nivell d'RNAm com a nivell de proteïna (Pacheco et al., 2005). Un fet semblant s'observa amb el receptor A_3 , els nivells d'RNAm del qual es veuen reduïts durant la maduració (Panther et al., 2001; Hofer et al., 2003), mentre que els nivells d' A_{2A} i A_{2B} es mantenen o inclús augmenten. Així, mitjançant els receptors A_1 i A_3 , l'adenosina resulta quimiotàctica per a les DCs inmadures, tot augmentant a més la seva capacitat fagocítica (Panther et al., 2001, 2003; Hofer et al., 2003). En canvi, l'adenosina té una funció totalment diferent en les DCs madures, on principalment via A_{2A} i A_{2B} seria capaç de reduir la migració a ganglis limfàtics i la secreció de citocines Th-1, globalment disminuint la immunogenicitat d'aquestes cèl·lules (Schnurr et al., 2004; Panther et al., 2003). Aquesta dualitat funcional implicaria que l'adenosina actui en primera instància com a molècula senyalitzadora de dany o estrès tissular, per a reclutar cèl·lules immunitàries. Un cop iniciat el procés inflamatori l'adenosina actuaria per a reduir-ne l'extensió, amb una finalitat protectora envers els teixits.

Aquesta funció protectora i immunosupressora concorda amb el fet que cèl·lules T reguladores (Tregs) utilitzin la generació extracel·lular d'adenosina com a mecanisme de supressió de respostes immunitàries (Kobie et al., 2006; Deaglio et al.,

2007). Així, aquestes cèl·lules mostren una elevada expressió de CD39 i CD73 a la membrana, en comparació amb cèl·lules efectores. Aquesta maquinària enzimàtica capacita a les Tregs per generar elevats nivells d'adenosina extracel·lular, que a través del receptor A_{2A} podria suprimir les respostes immunitàries. Finalment, diversos mecanismes que involucren l'adenosina en la supressió de respostes immunitàries són també usats per diferents patògens com *Staphylococcus Aureus* o el VIH (veure més endavant) per a evadir les respostes immunitàries (Thammavongsa et al., 2009; Nikolova et al., 2011).

1.4.4 Adenosina i infecció per VIH

Tot i que fins fa relativament poc no s'han iniciat estudis centrats en els efectes de l'adenosina en la immunopatologia del VIH, fa força temps que es coneix de forma indirecta una certa relació. Així, nombrosos fàrmacs antiretrovirals són, de fet, anàlegs de l'adenosina, usats per a ésser reconeguts per la RT i bloquejar la retrotranscripció (Herman et al., 2012). Per altra banda, un cop coneguda la capacitat de les cèl·lules Treg per a generar adenosina extracel·lular com a mecanisme de supressió de les respostes immunitàries, s'ha començat a estudiar aquest procés en el context del VIH. Així, recentment s'ha descrit una correlació entre una major expressió de CD39 i acció de l'adenosina a través del receptor A_{2A} amb progressió a SIDA (Nikolova et al., 2011; Schulze Zur Wiesch et al., 2011). Finalment, s'ha proposat una co-modulació de receptors A_{2A} d'adenosina amb els coreceptors CXCR4 i CCR5 del VIH (By et al., 2010).

1.5. Adenosina Desaminasa.

1.5.1 Activitat enzimàtica, estructura i expressió de l'enzim

L'adenosina desaminasa (ADA; EC 3.5.4.4) és un enzim implicat en la ruta de degradació de les purines. Catalitza la desaminació hidrolítica d'adenosina o 2'deoxiadenosina a inosina o 2'deoxiinosina, amb la conseqüent producció d'amoní (Figura 6) (Cristalli et al., 2001).

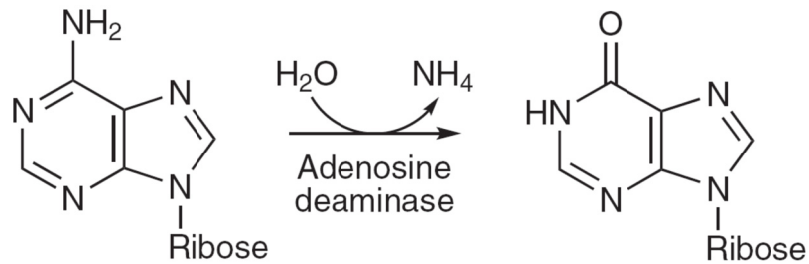


Figura 6. Reacció catalitzada per l'ADA. Modificat de (Khare et al., 2012)

El fet de que aquest enzim es trobi altament conservat en la filogènia, des de bacteries a humans implica que és un enzim clau del metabolisme purínic (Cristalli et al., 2001). El grau d'homologia entre les seqüències d'aminoàcids per a l'ADA entre diferents espècies de mamífers es elevat, sent l'ADA bovina la més similar a la humana (91% d'homologia) (Kelly et al., 1996). En canvi l'ADA murina mostra un 83% d'homologia amb l'ADA humana (Yeung et al., 1985). L'ADA és present en tots els teixits humans, però la major expressió es troba en el tim, nòduls limfàtics i melsa (Van der Weyden y Kelley, 1976; Chechik et al., 1981; Moriwaki et al., 1999).

El gen de l'ADA humana es troba en el cromosoma 20q (Petersen et al., 1987) i codifica una proteïna de 363aa i de 41kDa. Mitjançant tècniques de difracció de rajos X es va poder estudiar detalladament l'estructura de l'ADA murina, mostrant una estructura de barril β , amb 8 hèlixs α i 8 làmines β . El centre actiu està situat en una cavitat molt profunda en l'extrem c-terminal del barril β . A l'interior d'aquesta cavitat es disposa un ió Zn^{2+} , essencial per a la activitat catalítica de l'enzim (Wilson et al., 1991; Niu et al., 2010). Anàlogament al que s'ha observat en altres enzims i proteïnes, l'ADA mostra un canvi conformacional quan interacciona amb els seus substrats. Així en absència d'adenosina, el centre catalític de l'ADA mostra un conformació oberta, mentre que quan interacciona amb el substrat es tanca l'accés al centre catalític (Wilson et al., 1991; Kinoshita et al., 2008). Aquest fet explica el mecanisme d'acció de varis inhibidors de l'ADA, com ara la conformicina (CF) o la 2' deoxicoformicina (DCF o pentostatina). Aquests inhibidors, aïllats de *Nocardia interforma* o *Streptomyces kaniharaensis* (CF) i de *Streptomyces antibioticus* (DCF) actuen com anàlegs del

substrat, bloquejant l'enzim en la conformació tancada i impedit per tant, posteriors activitats catalítiques (Cristalli et al., 2001). És de destacar que aquests compostos són importants immunosupressors usats en el tractament de leucèmies (Grever, 2011).

1.5.2 ADA citosòlica i SCID

Les vies metabòliques de degradació i reciclatge de purines són clau per al correcte funcionament d'òrgans i teixits i són especialment importants en el constant desenvolupament i formació de noves cèl·lules del sistema immunitari. Així, la deficiència genètica d'ADA comporta una immunodeficiència severa combinada (SCID), on l'individu afectat no presenta cèl·lules T, B ni NK (Buckley et al., 1997), sent altament vulnerable a infeccions oportunistes. La deficiència genètica o mutacions puntuals que afecten l'activitat enzimàtica de l'ADA representen aproximadament un 20% dels casos d'SCID (Blackburn y Kellems, 2005). A més, el grau d'absència d'activitat ADA degut a les diferents mutacions o a l'absència total de l'enzim correlaciona bé amb la severitat dels símptomes de la malaltia (Hershfield, 2003). Cal indicar que només cal un 5% d'activitat adenosina desaminasa per a un desenvolupament immunitari normal (Blackburn y Kellems, 2005).

Els mecanismes pels quals s'origina la immunodeficiència són diversos. En primer lloc s'acumula el substrat 2'deoxiadenosina, de forma preferent en teixits limfoides (Aldrich et al., 2003), provocant un increment en els nivells de dATP, que alhora inhibeixen l'enzim ribonucleòtid reductasa implicat en la síntesi d'ADN (Cohen et al., 1978; Hirschhorn, 1995). A més alguns estudis també suggereixen que elevats nivells de dATP facilitarien l'apoptosi via APAF-1 (Leoni et al., 1998) o bé via l'alliberament de citocrom C (Yang y Cortopassi, 1998). Un altre mecanisme involucrat en la immunodeficiència podria ser la inhibició de reaccions de metilació que involucren la S-metilmetionina (S-met). L'acumul d'un dels productes d'aquestes reaccions, la S-adenosilhomocisteïna (AdoHcy) actuaria com a inhibidor competitiu de reaccions de metilació crítiques per a la cèl·lula (Hershfield et al., 1979; Blackburn et al., 1996). Finalment, un tercer mecanisme d'immunodeficiència seria un excés d'adenosina a l'espai extracel·lular, que mitjançant la unió al receptor A_{2A} , probablement provocant la *down-regulació* del receptor, evitaria una correcta

senyalització del receptor en cèl·lules T (Aposov et al., 2000, 2001; Cassani et al., 2008). Aquest fet implicaria que les poques cèl·lules T capaces de superar les dues alteracions anteriors i arribar a un estat madur, no serien capaces d'activar-se de forma normal (Figura 7).

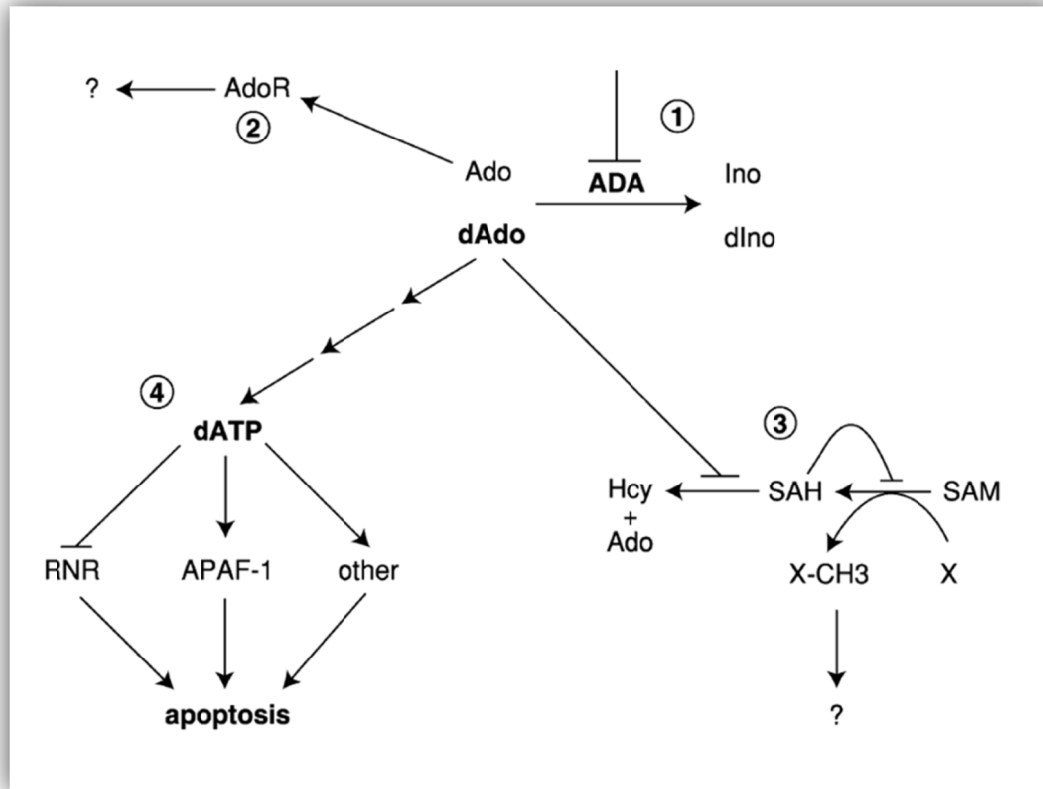


Figura 7: Mecanismes d'immunodeficiència per manca d'ADA. 1) Mutacions o la inhibició farmacològica de l'ADA comporta l'acúmul de 2'-deoxiadenosina (dAdo). 2) Nivells elevats de dAdo comporten una senyalització aberrant dels receptors d'adenosina (AdoR) que afecta la viabilitat i funció cel·lular. 3) Nivells elevats de dAdo inhibeixen l'enzim S-adenosilhomocisteïna (SAH) hidrolasa. L'acúmul de SAH produït a la vegada inhibeix reaccions de transmetilació que usen la S-adenosilmetionina (SAM) com a donadora de grups metil. Aquesta inhibició comporta l'activació de vies d'apoptosi o la disrupció de vies clau per a la diferenciació cel·lular. 4) La dAdo pot ésser fosforilada a dATP per varies quinases. Increments en dATP s'associen a fenòmens d'apoptosi per la inhibició de la ribonucleòtid reductasa (RNR), resultant en l'impediment de síntesi de novo del DNA, tot i que no es descarten altres mecanismes. *Modificat de* (Blackburn y Kellems, 2005)

1.5.3 Ecto-adenosina desaminasa

1.5.3.1 ADA extracel·lular, funció com a ecto-enzim.

Ja a la dècada dels 70 i 80 es va observar que l'ADA es localitzava en les mateixes fraccions subcel·lulars que altres enzims ancorats a la membrana, com ara el CD73 (Trams y Lauter, 1975; Franco et al., 1986). En les dues dècades posteriors aquestes observacions es varen fer extensives a cèl·lules d'origen hematopoètic (Bielat y Tritsch, 1989; Dinjens et al., 1989; Franco et al., 1990) i endotel·lials (Meghji et al., 1988). Donat que l'estructura de l'enzim no mostra cap domini d'integració a la membrana, es va concloure que podria actuar com a ecto-enzim localitzant-se a la membrana per interacció amb alguna proteïna integral de membrana. Quan es va aprofundir en la caracterització de l'ecto-ADA en cèl·lules del sistema immunitari, es va trobar que la majoria de monòcits i limfòcits B l'expressaven, mentre que l'ecto-enzim era present en una menor porció (10-20%) de la població T (Aran et al., 1991).

Finalment, observacions més recents del nostre grup de recerca indiquen la presència de l'ADA en la membrana de cèl·lules dendrítiques humanes, tant madures com immadures (Pacheco et al., 2005). El fet de que l'ADA no interaccioni covalentment amb les seves proteïnes d'unió a la membrana, i per tant pugui ser fàcilment solubilitzada, explica la presència de l'ADA en fluids com ara el sèrum (entre 6.58 i 11.84 U/l) (Beyazit et al., 2012; Cakal et al., 2010), o secrecions més localitzades com ara líquid cefaloraquídi, sinovial o pleural (Pérez-Rodríguez et al., 2012; Nakamachi et al., 2003; Garcia-Zamalloa y Taboada-Gomez, 2012). És interessant destacar que els nivells d'ADA en aquests fluids es veuen alterats en un gran nombre de patologies normalment relacionades amb processos inflamatoris o infecciosos, com ara tuberculosi, meningitis bacteriana, SIDA o hepatitis virals (Gakis, 1996; Cristalli et al., 2001). Tant és així que diversos estudis proposen l'ús dels nivells d'ADA com marcadors d'aquestes alteracions (Kaya et al., 2007; Segura et al., 1989).

1.5.3.2 Proteïnes d'unió d'ADA a la membrana: CD26 i receptors d'adenosina.

El fet que no s'hagin trobat diferències moleculars ni enzimàtiques entre l'ADA intracel·lular i extracel·lular, conjuntament amb l'existència d'un únic gen per a ADA, indicaria que l'ecto-ADA ha de provenir de l'interior cel·lular. El mecanisme mitjançant

el qual l'ADA s'exporta a l'espai extracel·lular és, però, desconegut. El fet que l'ADA no tingui cap seqüència senyal ni dominis transmembrana a la seva seqüència proteica descarta vies convencionals de secreció. Precisament per la manca de dominis transmembrana en la estructura de l'ADA, aquesta requereix d'altres proteïnes de membrana per a la seva localització a la superfície cel·lular. Actualment, es coneixen dos grups de proteïnes d'unió a ADA: el CD26 i els receptors d'adenosina.

Al 1993 es va caracteritzar el CD26 com la proteïna responsable d'ancorar ADA a la superfície de cèl·lules Jurkat (Kameoka et al., 1993). Posteriorment aquesta interacció s'ha detectat en diverses cèl·lules, però és interessant destacar que en ratolins o en rates no s'observa aquesta unió (Schrader et al., 1990) i de fet l'ADA murina tampoc és capaç d'unir-se al CD26 humà (Richard et al., 2002). Per altre banda, es va comprovar que en la interacció CD26-ADA no hi estaven implicades les activitats enzimàtiques dels respectius enzims (Dong et al., 1996). En aquest últim estudi també es va demostrar la co-localització de l'ADA amb el CD26 a la membrana plasmàtica, però no a l'interior de la cèl·lula, suggerint que el mecanisme pel qual l'ADA és secretada no involucra el CD26. Aquest punt es va confirmar realitzant co-cultius entre cèl·lules murines transfectades amb CD26 humà i cèl·lules humanes CD26⁻. En aquest experiment les cèl·lules murines, expressant CD26 humà, adoptaven ADA a la seva superfície que únicament podia provenir de les cèl·lules humanes, descartant la necessitat del CD26 per a la secreció d'ADA (Dong et al., 1996).

Mitjançant diferents deleccions, mutacions puntuals i anticossos monoclonals contra diferents epítops de CD26 es va determinar que els aminoàcids L₃₄₀, V₃₄₁, A₃₄₂ i R₃₄₃ eren claus per a la unió d'ADA (Dong et al., 1997, 1998). Posteriors estudis mitjançant l'ús de mutagènesi dirigida i mutants d'ADA amb seqüències murines i humanes, varen determinar que la regió d'ADA involucrada en la unió de CD26 estava situada a l'hèlix α , concretament els residus 126 al 143. Així, els aminoàcids d'ADA claus per a la interacció amb CD26 són l'Arg142, Glu139, i Asp143 (Richard et al., 2000, 2002). L'ADA murina mostra un canvi puntual en el residu 142, expressant Gln en comptes d'Arg, fet que explicaria la no interacció amb el CD26 (Richard et al., 2002). Posteriorment es va cristal·litzar el complex del CD26 humà i l'ADA bovina, mostrant

que un dímer de CD26 uneix 2 molècules d'ADA (veure Fig 8) (Ludwig et al., 2004; Weihofen et al., 2004).

La interacció de l'ADA amb el CD26 sembla modular les propietats catalítiques de l'ADA i del CD26. El pH òptim per a l'activitat enzimàtica del CD26 sembla ser més elevat del normal, per sobre la neutralitat (Sharoyan et al., 2006). Aquests nivells de pH difícilment tenen lloc a l'espai extracel·lular, i menys en condicions d'inflamació o infecció on el pH té tendència a baixar. Donat que la interacció molecular CD26/ADA no impedeix cap de les dues activitats enzimàtiques (De Meester et al., 1994; Fan et al., 2012), la generació local d'amoni per part de l'ADA com a conseqüència de la desaminació de l'adenosina podria incrementar el pH, incrementant així l'activitat enzimàtica del CD26.

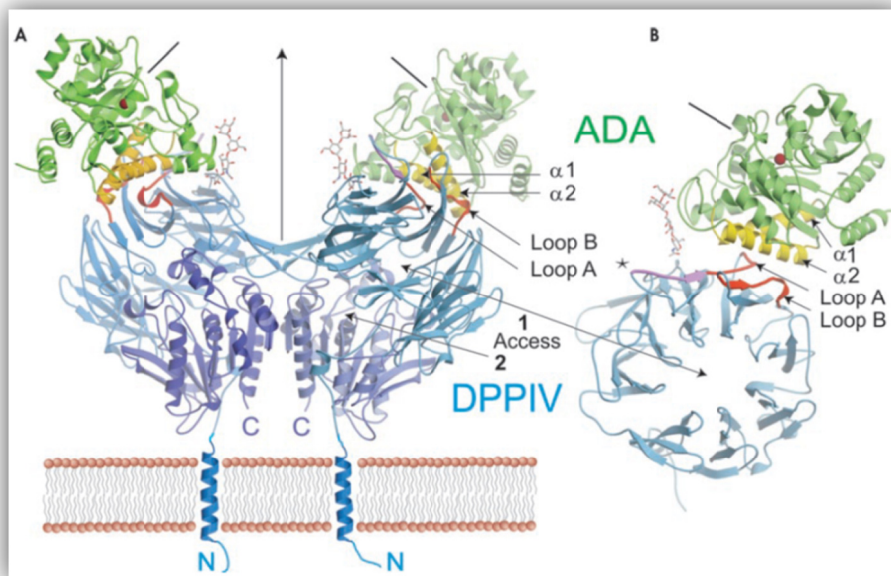


Figura 8: Interacció CD26-ADA Extret de (Weihofen et al., 2004)

El CD26 no és la única proteïna capaç d'unir ADA a la membrana. La primera evidència d'una interacció directa entre l'enzim i el receptor A_1 d'adenosina es va observar en la línia cel·lular DDT₁MF, que expressa de forma natural receptors d'adenosina i també CD26. A l'afegir ADA bovina fusionada a una proteïna fluorescent a cultius d'aquesta línia cel·lular es va observar co-localització amb el receptor A_1 inclús a nivells més elevats que amb CD26 (Ciruela et al., 1996; Saura et al., 1998). Aquesta interacció ha estat també observada en la línia cel·lular HEK293 transfectada amb el

DNAc per al receptor A_1 (Sun et al., 2005). Recentment, a més s'ha descrit la capacitat de l'ADA per a actuar com a modulador al·lostèric del receptor A_1 millorant l'afinitat d'aquest receptor per als seus lligands i incrementant-ne la senyalització (Gracia et al., 2008) (Figura 9).

Diferents estudis centrats en la caracterització de la interacció entre CD26 i ADA en cèl·lules immunitàries ja havien destacat la presència de limfòcits T positius per a ecto-ADA i negatius per a CD26 (Cordero et al., 2001; Herrera et al., 2001a). Donada la nul·la o molt baixa expressió de receptors A_1 en aquestes cèl·lules els resultats apuntaven a un altre receptor com a candidat per a unir l'ADA. Així, tant en cèl·lules CHO com en Jurkat i mitjançant tècniques de coimmunoprecipitació i coimmunolocalització es va demostrar la unió d'ADA als receptors d'adenosina A_{2B} (Herrera et al., 2001a). Tal i com succeeix amb el receptor A_1 , la interacció d'ADA amb el receptor A_{2B} és capaç d'incrementar l'afinitat del receptor pels seus lligands i estimular la producció d'AMPc, segon missatger associat a la senyalització d'aquest receptor. Finalment, estudis recents del grup de recerca han determinat també la interacció de l'ecto-ADA amb els receptors A_{2A} d'adenosina en cèl·lules CHO transfectades amb el DNAc per a aquest receptor. Mitjançant tècniques d'unió de radiol·ligands s'ha determinat que tal i com passa amb el receptor A_1 i l' A_{2B} , l'ADA actua millorant l'afinitat del receptor A_{2A} per als seus lligands (Gracia et al., 2011). És interessant destacar que aquests efectes d'ADA sobre els receptors d'adenosina es produeixen fins i tot quan l'activitat enzimàtica és inhibida per $HgCl_2$ (Ciruela et al., 1996; Herrera et al., 2001a; Gracia et al., 2011).

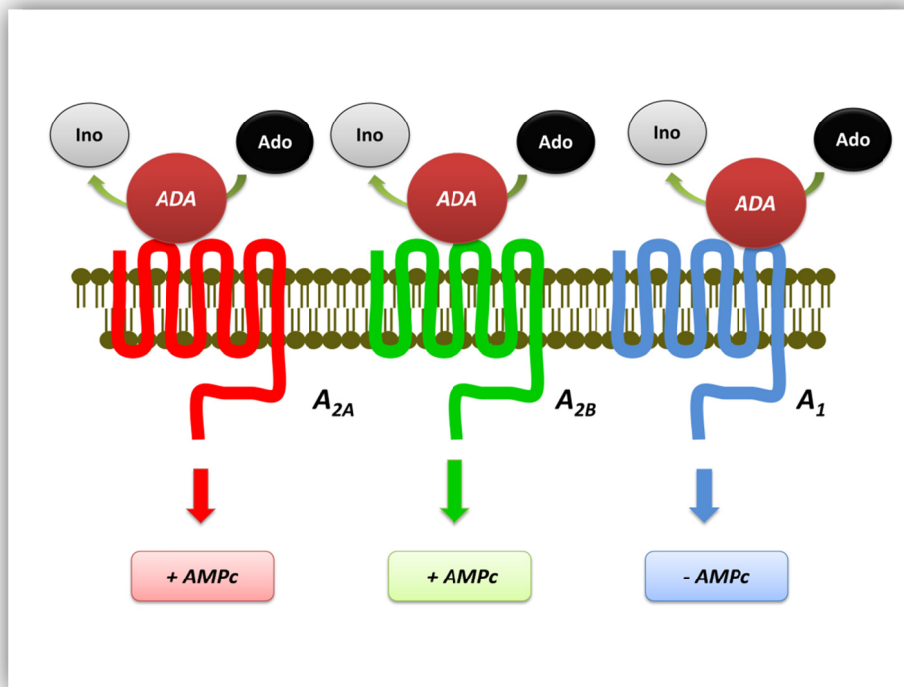


Figura 9: Interacció de l'ADA amb els receptors d'adenosina

Així doncs, la presència d'ecto-ADA en la superfície cel·lular és clau per a regular els nivells extracel·lulars d'adenosina, fet que finalment pot modular les senyals dels diferents receptors d'adenosina. Aquest fet es va observar en timòcits, on la quantitat d'ecto-ADA unida a les cèl·lules, clarament influenciada per l'expressió de CD26, resultava en diferents senyals d'AMPc per part dels receptors d'adenosina (Hashikawa et al., 2004). Aquest rol seria d'especial importància en elevades densitats cel·lulars, ambients on hi hauria gran quantitat d'adenosina extracel·lular, com ara el tim (Hashikawa et al., 2004), o en respostes immunitàries.

1.5.4 Paper de l'ecto-adenosina desaminasa en el sistema immunitari

1.5.4.1 ADA com a molècula co-estimuladora de l'activació limfocitària

El primer indici de que l'ADA extracel·lular podia desenvolupar un paper específic en el sistema immunitari va ser l'observació d'un increment en l'expressió de CD26 i ecto-ADA en limfòcits T activats via el complex TCR/CD3, suggerint un paper d'aquest complex en l'activació limfocitària. De fet, l'addició d'ADA exògena conjuntament amb l'estimulació del TCR/CD3, es va mostrar capaç d'incrementar

l'activació limfocitària. Donat que ni els anticossos policlonals contra l'ADA ni l'addició d'ADA sense estímuls per al TCR/CD3 produïen un efecte activador, es va postular que la interacció de l'ADA amb el CD26 actuaria com a senyal coestimuladora per a limfòcits T (Martín et al., 1995). Diversos estudis han suggerit que la unió d'ADA a CD26 possibilitaria la degradació extracel·lular d'adenosina, per tant eliminant senyals inhibidores per al sistema immunitari (Dong et al., 1996, 1997; Ruers et al., 1987). Molt més recentment, s'ha evidenciat que la interacció CD26-ADA té lloc preferencialment en cèl·lules T efectores, que a més expressen baixos nivells de CD39 o CD73, enzims productors d'adenosina. En canvi, cèl·lules amb fenotip supressor (Treg) mostren nivells elevats de CD39 o CD73 i nivells molt més baixos de complexos CD26/ADA a la seva membrana (Mandapathil et al., 2010). Així, sembla clar que la unió d'ADA a CD26 i l'activitat adenosina desaminasa extracel·lular estarien implicades en l'activació limfocitària, mentre la generació d'adenosina extracel·lular i una manca de complexos CD26/ADA correlacionaria amb una major immunosupressió. És de destacar que s'han obtingut resultats similars en altres models cel·lulars. Així, tant en membranes de timòcits com en cèl·lules endotelials s'han observat complexos CD26/ADA que permetrien evitar un acúmulo excessiu d'adenosina en situacions d'hipòxia generades per altes densitats cel·lulars com les que es troben durant la maduració limfocitària en el tim o per processos inflamatoris diversos (Hashikawa et al., 2004; Eltzschig et al., 2006; Van Linden y Eltzschig, 2007). Per altre banda, la interacció de l'ADA amb el CD26 s'ha vist capaç d'incrementar la proliferació i activació limfocitària de forma independent a la seva activitat enzimàtica (Martín et al., 1995; Pacheco et al., 2005; Franco et al., 2007). Així, tot i inhibint l'activitat catalítica amb $HgCl_2$, l'ADA és capaç d'incrementar la proliferació i secreció de citocines de limfòcits estimulats per dendrítiques autòlogues pulsades amb un super-antigen (SEA) (Pacheco et al., 2005). En aquest mateix estudi es va demostrar que la major part dels efectes de l'ADA eren inhibits al bloquejar la interacció CD26-ADA mitjançant TA5.9, un anticòs monoclonal front l'epítipo d'unió a ADA en la molècula de CD26. Donat que és conegut que el CD26 té dominis intermembrana d'interacció amb el CD45 (Torimoto et al., 1991), és plausible que la interacció d'ADA amb el CD26 influeixi sobre la senyalització intracel·lular mitjançada per aquesta tirosin-fosfatasa (Pacheco et al., 2005; Franco

et al., 2007). El fet que la majoria de CD26 expressat per diversos tipus cel·lulars no es trobi saturat amb ADA (Morrison et al., 1993; Martín et al., 1995; Dong et al., 1996), recolzaria un rol regulador d'aquesta interacció. És a dir, en moments determinats, la secreció d'ADA incrementaria la quantitat d'enzim unit al CD26 a la superfície de les cèl·lules, influïnt en la senyalització cel·lular, incrementant la degradació extracel·lular d'adenosina o oferint anclatge per a contactes cèl·lula-cèl·lula (Pacheco et al., 2005)

Finalment, la rellevància fisiològica de les interaccions de l'ADA amb els receptors d'adenosina ha estat molt menys estudiada. S'ha observat que en cèl·lules dendrítiques murines on l'ADA de la superfície no s'uneix al CD26 murí i probablement interacciona amb els receptors d'adenosina, l'ADA és necessària per a evitar els efectes supressors de l'adenosina (Desrosiers et al., 2007). En aquest sentit, el nostre grup de recerca va demostrar la presència d'ADA a la superfície de cèl·lules dendrítiques humanes (Pacheco et al., 2005). Aquesta ADA co-localitzava principalment amb els receptors d'adenosina A_{2B} . Es va formular la hipòtesi per la qual la unió d'ADA a la cèl·lula dendrítica mitjançant els receptors A_{2B} i alhora a les cèl·lules T mitjançant el CD26 actuaria de molècula pont co-estímulant a la cèl·lula T (Pacheco et al., 2005; Franco et al., 2007).

1.5.5 Interacció CD26-ADA i infecció pel VIH.

La implicació de l'ADA i del CD26 en l'immunopatologia derivada de la infecció per VIH es va proposar a l'observar una correlació entre la reducció dels nivells de cèl·lules CD26⁺ i la progressió a SIDA (Blazquez et al., 1992; Vanham et al., 1993) i a l'observar que els nivells plasmàtics d'ADA es troben elevats en aquests pacients (Chittiprol et al., 2007; Khodadadi et al., 2011).

Inicialment es va proposar un paper del CD26 e la infecció per VIH considerant l'activitat catalítica d'aquesta molècula. L'activitat peptidasa del CD26 s'ha demostrat capaç d'influir sobre la capacitat de certes citocines d'inhibir l'entrada del VIH. Així davant de soques R5, el processament de RANTES pel CD26 milloraria la unió al CCR5, inhibint de forma més efectiva l'entrada del virus. Per contra, el processament de SDF-1 α pel CD26, redueix la seva capacitat d'inhibir l'entrada viral via CXCR4 (De Meester

et al., 1999). Segons això, el CD26 podria resultar protector en els primers estadis de la infecció quan predominen les soques R5, mentre que contribuiria a la disseminació de la infecció en estats més avançats on abunden soques X4 (De Meester et al., 1999). En consonància amb l'anterior hipòtesi, l'expressió de CD26 s'ha vist incrementada en una cohort d'individus exposats no infectats (Songok et al., 2010). A part de l'activitat catalítica el CD26 pot interaccionar amb diferents elements del VIH. A finals dels anys 90 es va demostrar que la proteïna Tat del VIH podia unir-se i inhibir l'activitat enzimàtica del CD26, possiblement contribuint a la immunosupressió mitjançada pel virus (Gutheil et al., 1994; Fan et al., 2012). També durant la mateixa dècada es va proposar el CD26 com a coreceptor d'entrada per al VIH en línies cel·lulars (Callebaut et al., 1993), tot i que altres grups varen ser incapaços de replicar aquests resultats (Lazaro et al., 1994; Wang et al., 1995), fet que va generar força controvèrsia. El fet que s'hagi observat una interacció directa i una comodulació entre el CD26 i el CXCR4, correceptor del virus, en la membrana de cèl·lules T (Herrera et al., 2001b) afavoreix la hipòtesi de que el CD26 pugui actuar com a coreceptor d'entrada per al VIH. Aquesta hipòtesi està també avalada pel fet de que la proteïna de l'envolta gp120 és capaç de desplaçar la unió de l'ADA al CD26 (Valenzuela et al., 1997; Blanco et al., 2000; Herrera et al., 2001b; Eltzhig et al., 2006), fet que podria explicar els nivells plasmàtics elevats d'ADA en aquests pacients. A més, la gp120 tot reduint el coestímul CD26/ADA, podria provocar la menor resposta immunològica a antígens VIH que s'observa en pacients en estadis avançats de la malaltia (Martinez-Navio et al., 2009). Per altre banda, la interacció CD26/ADA en cas d'estar preservada en els pacients, ja sigui per un control innat de la infecció o pel tractament antiretroviral, oferiria una millora de la resposta VIH específica. En aquest sentit, s'ha observat un increment de la proliferació de limfòcits T i secreció de citocines Th-1/pro-inflamatòries en un model de cocultiu autòleg usant cèl·lules dendrítiques pulsades amb el virus inactivat (Climent et al., 2009).

1.6. α -Defensines

El concepte de pèptids com a antibiòtics naturals és força antic en la literatura científica. Ja als anys 50 es va observar l'activitat microbicida de la "leukina" pèptid

present en leucòcits (SKARNES y WATSON, 1956). No va ser fins als anys 80 però, que es varen caracteritzar amb més detall pèptids antibiòtics naturals presents en els macròfags alveolars, amb una gran capacitat antimicrobiana davant una varietat de patògens com *candida*, o vàries espècies de bacteris gram-positives (Patterson-Delafield et al., 1980, 1981; Lehrer et al., 1983). Aquests pèptids posteriorment es varen anomenar defensines, donada la seva característica funció. És interessant destacar que pèptids d'estructura i funcionalitat semblant s'han observat en plantes (Carvalho y Gomes, 2011), fongs (Zhu, 2008) i invertebrats (Isogai et al., 2011).

1.6.1 Classificació i Estructura

Actualment s'engloba a les defensines dins dels mecanismes efectors de la immunitat innata, per la seva activitat antimicrobiana d'ampli espectre. Són pèptids amfipàtics molt petits (3-6 KDa), rics en cisteïna, bàsics i altament catiònics. En els vertebrats es distingeixen 3 subfamílies de defensines segons la seva estructura: α , β i θ . Cada subfamília presenta un domini altament conservat que conté 6 cisteïnes, emparellades per 3 ponts disulfur. Cada subfamília presenta una distribució diferent d'aquests ponts disulfur (veure fig 10). En l'estructura terciària de les α i β defensines predomina els plegaments en forma de full β , formant estructures molt semblants (Hill et al., 1991; Selsted y Ouellette, 2005). En canvi, les defensines θ mostren una estructura circular. En l'ésser humà i en primats del nou món la traducció de les defensines θ s'atura prematurament per un codó d'aturada en la seqüència senyal, evitant que es produeixi la proteïna madura (Tang et al., 1999; Tongaonkar et al., 2011). Curiosament, això no succeeix en primats del vell món ni en orangutans (Nguyen et al., 2003).

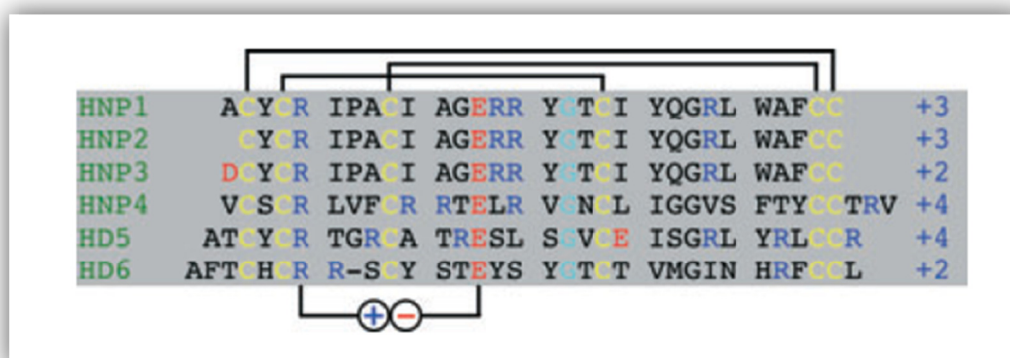


Fig 10: Seqüència proteica i càrrega de les diferents defensines humanes

S'ha demostrat la capacitat de certes defensines, com l' α -defensina-1 i 3, per formar dímers (Hill et al., 1991), fet que es postula que podria ser important per a la seva funcionalitat (Pazgier et al., 2012). Inclús es proposa la possibilitat de que aquests pèptids formin estructures més complexes, o oligòmers (Hoover et al., 2000).

1.6.2 Estructura gènica.

Els gens de les α i β defensines ocupen locus adjacents en el cromosoma 8p22-23, fet que és consistent amb una possible evolució a partir d'un gen ancestral (Liu et al., 1997; Lehrer y Lu, 2012). Donat que les β -defensines ja existeixen en rèptils o aus, però només els mamífers presenten α -defensines, sembla clar que les α -defensines es van originar a partir de les β , (Lynn y Bradley, 2007; Lehrer y Lu, 2012) probablement per fenòmens de duplicació i posterior pressió selectiva.

Pel que fa a les α -defensines humanes, fins a dia d'avui s'han trobat 5 gens codificant 6 pèptids diferents. El processament proteolític d'un residu d'alanina en la HNP-1 o d'àcid aspàrtic en l'HNP-3 dona lloc a la HNP-2, raó per la qual el gen d'aquesta defensina no s'ha trobat (Linzmeier et al., 1993; Lehrer y Lu, 2012). Els gens *DEFA1* i *DEFA3*, codificants per a la HNP-1 i HNP-3, respectivament, es presenten en un nombre variable de còpies que pot variar entre un mínim de 2 i un màxim de 12, segons diferents estudis (Mars et al., 1995; Hollox et al., 2003; Aldred et al., 2005; Linzmeier y Ganz, 2005). A més, entre un 10% i un 37% de la població no presenta el gen *DEFA3* (Ballana et al., 2007). Paral·lelament, els gens *DEFB4*, *DEFB103* i *DEFB104* codificants per a β -defensines també mostren un nombre variable de còpies (Lehrer y Lu, 2012). Contràriament al que es podria concloure després d'aquestes observacions, la majoria de gens implicats en la immunitat innata no presenten un nombre variable de còpies (Linzmeier y Ganz, 2006). Tant és així que les gens per a les α -defensines *DEFA4*, *DEFA5* i *DEFA6* i les β -defensines *DEFB1* es presenta en un nombre fix (2) de còpies per genoma diplode (veure fig 11).

Tot i que l'origen i extensió dels fenòmens d'herència en nombre de còpies variable tot just s'han començat a entendre i a estudiar amb profunditat (Wain et al., 2009; Craddock et al., 2010), varis estudis han demostrat la seva relació amb diverses patologies. Per al que fa les α i β -defensines, s'han correlacionat CNVs amb la malaltia de Crohn (Bentley et al., 2010; Jespersgaard et al., 2011), mentre que el CNV de les β -defensines s'ha associat també amb psoriasis (Hollox et al., 2008). És important destacar que s'ha trobat una correlació entre els nivells d'RNAm provinents de cèl·lules de sang perifèrica total i la quantitat de còpies dels gens de defensines (Hollox et al., 2003).

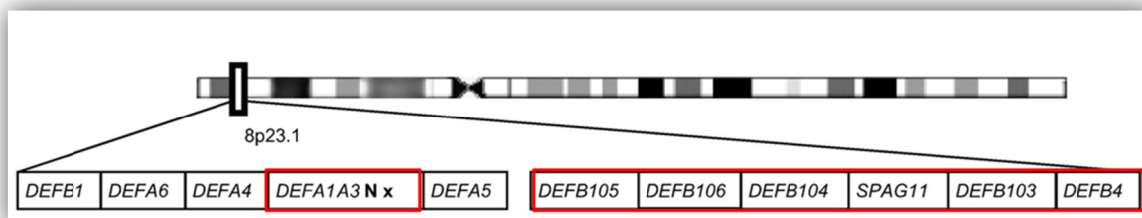


Figura 11: Estructura gènica de les α -defensines. En vermell zones subjectes a CNV

1.6.3 Síntesi, expressió i distribució de les α -defensines.

En l'ésser humà, la principal font de les α -defensines 1-4 són els neutròfils, sent les α -defensines 1-3 molt més abundants que la 4. D'aquesta expressió característica se'n deriva la nomenclatura HNP (*Human Neutrophil-derived Peptides*). Les α -defensines 1-3 o HNP1-3 representen del 5 al 7% de la proteïna total d'un neutròfil, i del 30 al 50% del contingut dels grànuls primaris (Rice et al., 1987). La quantitat de pèptids d'HNP1-3 en neutròfils s'ha vist correlacionada amb el nombre de còpies per a aquests gens (Linzmeier y Ganz, 2005). Les defensines es sintetitzen com a pre-pro-pèptids en poblacions precursoras de neutròfils, com ara promielòcits (Arnljots et al., 1998; Cowland y Borregaard, 1999). Un cop aquests neutròfils ja són plenament diferenciats, aturen la síntesi d'mRNA i proteïna d' α -defensines (Harwig et al., 1992). El processament proteolític d'una seqüència senyal de reticle endoplasmàtic d'uns 15 residus, allibera la pro-defensina, que encara no posseeix activitat antimicrobiana. Es considera que aquesta petita "pro" seqüència peptídica actua conferint a la pro-defensina càrrega neutre, protegint així la cèl·lula de fenòmens d'autotoxicitat (Ganz,

2003; Selsted y Ouellette, 2005). En els neutròfils, després d'un últim processament proteolític en el golgi, les defensines s'emmagatzemen en els grànuls primaris d'aquestes cèl·lules (Rice et al., 1987).

A banda dels neutròfils, majors productors d' HNP1-3, també s'ha observat la presència d'aquests pèptids en altres poblacions cel·lulars, com ara cèl·lules B, NK , $\gamma\delta$ o monòcits (Agerberth et al., 2000). Recentment, a més, s'ha descrit la capacitat de les cèl·lules dendrítiques derivades de monòcit de produir i secretar aquestes molècules (Rodríguez-García et al., 2007). Pel que fa a les altres α -defensines, l'HD5 i l'HD6, es produeixen principalment en les cèl·lules de Paneth de l'intestí (Porter et al., 1997; Ghosh et al., 2002), tot i que també s'han detectat en secrecions salivals o uretrals.

Finalment, les 6 β -defensines fins ara trobades s'expressen preferencialment en cèl·lules epitelials (Klotman y Chang, 2006), tot i també s'han observat en altres cèl·lules (Duits et al., 2002). L'HDB1 és sintetitzada de forma constitutiva tot i que els seus nivells varien en situacions inflamatòries, mentre que les HDB2-4 són induïbles en resposta a productes microbians, vírics o citocines proinflamatòries (Singh et al., 1998; Tsutsumi-Ishii y Nagaoka, 2003; Harder et al., 2004). Finalment, l'expressió de l'HBD5 i 6 sembla restringida a l'epidídim (Lehrer, 2004).

1.6.4 Variabilitat inter-espècie en l'expressió de defensines

És important destacar que existeixen particularitats molt definides en l'expressió de defensines, inclús entre les diferents espècies de vertebrats, que s'han de tenir en compte a l'hora de valorar els resultats obtinguts en diferents estudis. Així, per exemple, els neutròfils humans expressen 4 α -defensines, els neutròfils bovins expressen 14 β -defensines, mentre que els neutròfils dels ratolins no expressen cap defensina (Eisenhauer y Lehrer, 1992). No només els neutròfils mostren aquests tipus de diferències en l'expressió de defensines, (veure taula 5).

Taula 5. Expressió de defensines en diferents espècies de vertebrats

<i>Espècie</i>	<i>Neutròfils</i>	<i>Cels Paneth</i>	<i>Epiteli</i>
Humà	α	α	α i β
Primat <i>Rhesus</i>	α i θ	N D	β
Ratolí	Absents	α	α i β
Rata	α	α	β
Porc	No detectades	N D	β
Vaca	β	Absents	β
Pollastre	β	ND	β

Modificat de (Ganz, 2003)

1.6.5 Les α -defensines com a molècules efectores de la immunitat innata.

1.6.5.1 Activitat antimicrobiana directe.

Totes les defensines caracteritzades fins ara mostren una activitat antimicrobiana d'ampli espectre, efectiva davant fongs, bacteris, virus i fins i tot alguns paràsits. Aquestes dades provenen d'estudis on s'ha assajat *in vitro* la capacitat de defensines purificades per a eliminar un ampli ventall de patògens. Així s'ha determinat que les condicions òptimes per aquesta activitat són una baixa força iònica i pH neutre. En aquestes condicions, les defensines tenen una activitat microbicida directe en un rang de 0.5 – 5 μ M (Selsted y Ouellette, 2005). Aquesta activitat es antagonitzada per concentracions creixents de sals (150mM NaCl), cations divalents

(Ca²⁺) i proteïnes sèriques (Selsted et al., 1985; Tang et al., 1999). Les α -defensines tenen una extremada tendència a unir-se a membranes cel·lulars i a tot tipus de proteïnes, especialment si estan glicosilades. Això es deu probablement a la càrrega positiva d'aquests pèptids i a la negativa dels carbohidrats i membranes. Aquest fet fa que en plasma, pràcticament la totalitat de les α -defensines que hi pugui haver es trobin unides a proteïnes plasmàtiques, potencialment reduint la seva capacitat antimicrobiana (Lehrer y Lu, 2012). En canvi, en el procés de fagocitosi per part dels neutròfils i posterior fusió amb el fagolisosoma es creu que es poden arribar a concentracions de defensines de l'ordre dels 10mg/ml, concentració que s'ha demostrat bactericida a concentracions salines fisiològiques. Concentracions semblants s'han proposat en el lumen de les criptes de Lieberkhün de l'intestí (Ganz et al., 1986; Ayabe et al., 2000). Així l'activitat bactericida d'aquests pèptids quedaria restringida a zones d'inflamació, principalment epitelis i mucoses.

Estudis en diversos models de ratolí validen *in vivo* la capacitat antimicrobiana de les defensines. Per exemple ratolins *knock out* per a l'enzim MMP-7, que processa el pas de pro-defensina a defensina madura en les criptes intestinals, mostraven una major susceptibilitat a una exposició oral per *S. Typhimurium* que els ratolins control (Wilson et al., 1999). En l'extrem contrari, un ratolí transgènic que expressava HD-5 humana en les cèl·lules de Paneth, es va demostrar immune a l'exposició oral de soques virulentes de *S. Typhimurium* (Salzman et al., 2003).

1.6.5.2 Mecanismes antimicrobians directes de les α -defensines.

Els mecanismes que permeten l'activitat microbida de les defensines tot just es comencen a entendre. Inicialment es va observar que l'exposició de soques d'*E.coli* a HNP1-3 provocava la permeabilització seqüencial de la membrana exterior i la interior, provocant l'aturada de síntesi d'ARN i ADN i posteriorment la mort bacteriana (Lehrer et al., 1989). Curiosament, es requeria que el bacteri es trobés en fase de creixement i tingués un mínim potencial de membrana per a observar els efectes lítics de les HNP1-3. Per altre banda, l'exposició de *candida albicans* a HNP1-3 provoca l'alliberament no lític però sí letal d'ATP cel·lular (Edgerton et al., 2000). Posteriors estudis han determinat la capacitat de les defensines de formar porus en les

membranes diana, conseqüència tant de l'elevada càrrega positiva com d'una certa hidrofobicitat d'aquestes molècules (Kagan et al., 1990; Wimley et al., 1994; Zhang et al., 2010). Una major càrrega negativa de les parets i membranes bacterianes afavoriria la unió de les defensines a aquestes estructures, en comptes de fer-ho a cèl·lules i membranes pròpies. Aquests mecanismes també s'ha demostrat efectius davant virus amb embolcall (Daher et al., 1986), (veure més endavant).

1.6.5.3 Activitat quimiotàctica

Algunes defensines han demostrat tenir activitat quimiotàctica i la capacitat de promoure la secreció de citocines en cèl·lules epitelials i monòcits, influint per tant, en la resposta immunitària adaptativa. Així les HNP1-3 s'han demostrat quimiotàctiques per a monòcits, cèl·lules T (incloent cèl·lules naïve) i cèl·lules dendrítiques (Territo et al., 1989; Chertov et al., 1996; Yang et al., 2000). De forma semblant s'ha caracteritzat com la interacció de la HBD-2 amb el receptor CCR6 atreu cèl·lules T memòria i dendrítiques immadures (Yang et al., 1999). També les HBD-3 i 4 mostren quimioatracció per monòcits i macròfags (García et al., 2001), observant-se interaccions amb el receptor CCR2 (Röhrl et al., 2010; Jin et al., 2010). Finalment, tot i que a dia d'avui no s'ha evidenciat de forma clara interaccions de les HNP1-3 amb receptors concrets, es coneix que poden provocar la desgranulació de mastòcits, un fenomen que es pot bloquejar amb toxina pertússica, fet que revela un mecanisme dependent de proteïna G (Befus et al., 1999; Niyonsaba et al., 2002).

1.6.5.4 Efectes indirectes sobre diferents poblacions immunològiques.

A banda de les propietats quimiotàctiques i antimicrobianes directes, s'ha observat la capacitat de les defensines de modular l'alliberament de citocines i quimiocines diverses. Tal i com s'ha comentat anteriorment, les HNP1-3 provoquen la desgranulació de mastòcits, fet que també allibera histamina, incrementant processos inflamatoris. Per altre banda, aquestes mateixes defensines incrementen la secreció de CXCL8 i CXCL5 per part de l'epiteli bronquial (van Wetering et al., 2002). En monòcits s'han descrit fenòmens semblants, amb les HNP1-3 incrementant la secreció de TNF- α i IL-1 β , tot reduint la secreció d'IL-10 (Chaly et al., 2000). Tots aquests fenòmens

impliquen amplificar la resposta immunitària innata, tot iniciant l'adaptativa. D'acord amb aquest fet, s'ha descrit la capacitat de les HNP1-3 per activar el procés de maduració de la cèl·lula dendrítica, tot incrementant marcadors com CD80, CD83, CD86 i HLA-DR i un seguit de citocines pro-inflamatòries com TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 o IL-12 (Rodríguez-García et al., 2009; Presicce et al., 2009). Aquestes dendrítiques demostren una lleugera millora en la seva capacitat d'estimular cèl·lules T. S'han proposat efectes semblants per a la HBD-3 sobre dendrítiques tant mieloides com plasmacitoides, mitjançant interaccions amb els TLR-1 i 2 (Funderburg et al., 2007). Finalment, molt recentment s'ha descrit la capacitat de l'HBD-2 d'incrementar la secreció d'IFN- γ i IL-10 tot reduint la d'IL-17 en cèl·lules T (Kanda et al., 2011), confirmant que tot i ser efectores de la immunitat innata les accions de les defensines modulen també la immunitat adaptativa.

1.6.6 Efectes antivirals de les α -defensines, infecció per VIH.

Ja als anys 80 es coneixia l'activitat antiviral de les HNP1-3, almenys davant virus com l'HSV (herpes), CMV (citomegalovirus), el VSV (virus de l'estomatitis) o virus de la grip (influença A) (Daher et al., 1986). No va ser però fins al 1993 que es va veure aquesta activitat antiviral també davant el VIH (Nakashima et al., 1993). Posteriorment es va observar que cèl·lules CD8⁺ de pacients infectats però que controlaven la infecció, secretaven un component amb activitat inhibidora del VIH (Mackewicz et al., 1995). Aquest factor soluble, produït i secretat pels CD8⁺ es va anomenar CAF (*CD8 Antiviral Factor*), i es va proposar que les HNP1-3 en formaven part (Zhang et al., 2002). Posteriorment es va veure que les HNP1-3 observades a l'interior de les cèl·lules CD8⁺ provenien en realitat de cèl·lules accessòries usades en els cultius (Zaharatos et al., 2004), provocant la retracció de la interpretació segons la qual els CD8⁺ produïen HNP1-3 (Zhang et al., 2004). Evidentment, les HNP1-3 es varen descartar com a integrants del CAF (Mackewicz et al., 2003; Chang et al., 2003), tot i que la seva activitat antiviral i anti-VIH no ha estat qüestionada, i s'ha demostrat en nombrosos estudis posteriors (D'Agostino et al., 2009; Seidel et al., 2010; Lehrer y Lu, 2012). Aquesta controvèrsia va revelar la facilitat amb la que diferents tipus cel·lulars adquireixen defensines sense necessitat de produir-les (Zaharatos et al., 2004). A més

existeixen mecanismes com la fagocitosi de grànuls provinents de neutròfils apoptòtics per part de macròfags que poden representar nous mecanismes mitjançant els quals diferents cèl·lules adquireixen defensines (Arnett et al., 2011; Tan et al., 2006). Aquests resultats ressalten la importància de la presència de les defensines en els llocs d'inflamació i exposició a patògens, independentment dels tipus cel·lulars que les puguin produir.

1.6.6.1 Mecanismes anti-VIH de les α -defensines

Actualment s'accepta que els efectes antivirals de les defensines depenen del virus, la defensina i les cèl·lules diana estudiades. No obstant, estudis inicials varen demostrar que la presència d'HNP1-3 a dosis de 200 μ g/ml era capaç d'inhibir la replicació del VIH en un 70-98% en aproximadament una hora (Mackewicz et al., 2003). Aquest efecte, a més, s'inhibia en presència d'un 5% de FCS en el medi. Resultats similars es varen obtenir en posteriors estudis, inclús a dosis de defensines més baixes (Chang et al., 2005). No obstant, aquest últim estudi proposava que els efectes directes sobre el virió (equivalents als anteriorment explicats per a bacteris) no eren els únics implicats en l'activitat anti-VIH de les defensines. Prèviament s'havia demostrat la capacitat de les defensines per a interactuar i inhibir la PKC (Charp et al., 1988). Aquest mecanisme es va evidenciar clau per a explicar l'efecte inhibitori de les defensines a concentracions no citotòxiques sobre la transcripció i import nuclear del VIH en cèl·lules T CD4⁺ (Chang et al., 2005). En un estudi molt més recent es comparen les activitats anti-VIH de diferents defensines, arribant-se a la conclusió que comparteixen alguns mecanismes antivirals com una reducció d'expressió de CXCR4, mentre que en difereixen en altres. Així per exemple, l'HNP-1 o l'HBD-1 són capaces d'inhibir la replicació viral fins a 12 hores post-infecció, un cop la retrotranscripció viral ja s'ha completat, inactivant tant soques X4 com R5 (Seidel et al., 2010).

Per altre banda, s'ha proposat que les defensines serien capaces d'interactuar tant amb la proteïna gp120 com amb el CD4 (Wang et al., 2004; Demirkhanyan et al., 2012), tot inhibint la fusió del VIH amb la membrana de la cèl·lula diana (Furci et al., 2007). Resultats similars s'han observat per a la HNP4, inclús amb millor activitat anti-VIH que les HNP1-3 (Wu et al., 2005). Finalment, les HNP1-3 poden incrementar la

secreció de quimiocines com CCL3, CCL4 O CCL5, quimiocines capaces d'antagonitzar la unió del VIH als seus coreceptors (Guo et al., 2004).

1.6.6.2 α -defensines i protecció davant del VIH. Individus exposats no infectats.

Donades les diverses propietats antivirals de les defensines, és evident que poden resultar un factor decisiu en la protecció davant la infecció per VIH. Així la pròpia presència del virus indueix la secreció de defeninses (HBD-2 i 3) en cèl·lules epitel·lials (Klotman y Chang, 2006). A més, s'ha observat que en individus sans, tant les secrecions vaginals com el fluid seminal contenen certa activitat anti-VIH, atribuïble en gran mesura a pèptids catiònics com les defensines (Venkataraman et al., 2005; Martellini et al., 2009). Certes malalties de transmissió sexual s'han observat també capaces d'elevat els nivells locals de defensines (Porter et al., 2005), fet que paradoxalment s'ha associat a una major transmissió del VIH (Klotman et al., 2008; Levinson et al., 2009) tot i que aquest fenomen podria tenir més relació amb els mateixos patògens que amb les defensines en sí (Ding et al., 2010; Ding y Chang, 2012).

Per tot l'anteriorment descrit, seria esperable que una major expressió o funcionalitat de les defensines comportés una millor resistència o millor resposta immunològica a la infecció per VIH. Estudis en cohorts d'individus exposats no infectats confirmen aquesta hipòtesi. Així es va demostrar una expressió constitutiva d'HNP1-3 més elevada en cèl·lules CD8⁺ d'EU comparat amb individus infectats per VIH o individus sans (Trabattoni et al., 2004). Aquest increment, a més, s'observava tant en CD8 de sang perifèrica com provinents de rentats cervico-vaginals. De forma interessant, els autors mostraven que els pacients infectats per VIH mostraven nivells més elevats d'HNP1-3 que els individus sans, possiblement concordant amb una inducció d'aquests pèptids per la resposta innata al mateix virus. Confirmant aquesta hipòtesi, es va trobar una correlació entre la càrrega viral a la que cadascun dels individus EU s'exposaven (virèmia plasmàtica de la corresponent parella infectada per VIH) i els nivells basals d'HNP1-3. Aquesta correlació s'ha confirmat en un estudi molt més recent, en una cohort de 164 dones exposades no infectades (Levinson et al.,

2012). Aquest estudi demostrava, a més que la capacitat de les secrecions vaginals de neutralitzar el VIH era deguda principalment a pèptids catiónics (HNP1-3 i LL-37). Donada l'extensa variabilitat en la herència gènica de certes α i β defensines, no es pot descartar que certs polimorfismes o genotips particulars puguin contribuir a una major resistència al VIH, tal i com s'ha descrit per a altres factors tant de la immunitat innata com adaptativa. En aquest sentit, es va observar una major quantitat d'ARNm de β -defensines en una cohort d'exposats no infectats que en individus control. A més, la cohort EU mostrava una freqüència més elevada d'un polimorfisme associat a una major producció d'aquestes defensines (Zapata et al., 2008; Milanese et al., 2009).

Objectius

2.OBJECTIUS

El grup de recerca en el que s'ha desenvolupat aquesta Tesis ha estat pioner en la investigació del paper de l'ADA com una proteïna extracel·lular que, mitjançant la unió a proteïnes de membrana, és capaç de potenciar la proliferació de limfòcits T induïda per l'activació del complex TCR-CD3 (Martín et al., 1995; Pacheco et al., 2005; Martinez-Navio et al., 2009). Per tal d'aprofundir en aquest coneixement, el primer Objectiu General d'aquesta Tesi ha estat:

Analitzar el possible paper co-estimulador de l'ADA en la immunosinapsi produïda per interacció de cèl·lules T i cèl·lules dendrítiques de donants sans o pacients infectats pel VIH.

Per assolir aquest objectiu general s'han plantejat els següents objectius concrets:

- **Objectiu 1.** Caracteritzar l'efecte de l'ADA en la maduració i presentació antigènica de les cèl·lules dendrítiques de donants sans o d'una àmplia cohort de pacients infectats pel VIH.
- **Objectiu 2.** Caracteritzar l'efecte co-estimulador de l'ADA en la generació de cèl·lules T CD4⁺ efectores, memòria o reguladores en co-cultius autòlegs de cèl·lules T CD4⁺ CD45RA⁺ i cèl·lules dendrítiques de donants sans o d'una àmplia cohort de pacients infectats pel VIH.
- **Objectiu 3.** Investigar quines citocines estan implicades en l'efecte co-estimulador de l'ADA

Un dels fets més esperançadors per a la recerca d'una teràpia preventiva enfront el VIH és el fet que certs individus mostren control sobre la progressió de la malaltia, o fins i tot immunitat natural davant la infecció. S'han descrit mecanismes que poden contribuir a aquesta resistència, però molts romanen totalment desconeguts. Tal com s'ha descrit en la introducció d'aquesta Tesi, les α -defensines produïdes per les cèl·lules dendrítiques són molècules candidates a participar en aquest procés, tant per la seva marcada capacitat antiviral com pel fet que les dendrítiques són de les primeres cèl·lules a contactar amb el virus durant la infecció. En aquest context, el segon Objectiu General d'aquesta tesis ha estat:

Estudiar la producció d' α -defensines per part de cèl·lules dendrítiques com a possible mecanisme innat de resistència a la infecció per VIH.

Per assolir aquest objectiu general s'han plantejat els següents objectius concrets:

- **Objectiu 4.** Investigar la producció i secreció d' α -defensines 1-3 per cèl·lules dendrítiques en pacients infectats pel VIH amb diferent grau de progressió de la malaltia.
- **Objectiu 5.** Investigar la relació existent entre el nombre de còpies del gen *DEFA1A3* i la protecció front la infecció per VIH.

Resultats

3. RESULTATS

Els resultats d'aquesta Tesi es presenten en les següents publicacions o manuscrits:

3.1 Adenosine Deaminase Enhances the Immunogenicity of Human Dendritic cells from Healthy and HIV-infected individuals

Víctor Casanova*, Isaac Naval-Macabuhay *, Marta Massanella, Marta Rodríguez-García, Julià Blanco, José M. Gatell, Felipe García, Teresa Gallart, Carme Lluís, Josefa Mallol, Rafael Franco*, Núria Climent*, Peter J. McCormick*.

Accepted at Plos One

3.2 Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory and regulatory CD4⁺ T-cells

José M. Martínez-Navio*, Víctor Casanova*, Rodrigo Pacheco, Núria Climent, Felipe García, José M. Gatell, Josefa Mallol, Teresa Gallart, Carme Lluís and Rafael Franco

J Leukoc Biol. 2010 Oct 27

3.3 Increased α -defensins 1-3 production by dendritic cells in HIV-infected individuals is associated with slower disease progression

Marta Rodríguez-García, Núria Climent*, Harold Oliva*, Víctor Casanova, Rafael Franco, Agathe Leon, José M. Gatell, Felipe García and Teresa Gallart

PLoS One. 2010 Feb 25;5(2):e9436

3.4 Higher DEFA1A3 Gene Copy Number and α -Defensins 1-3 Secretion are Associated with HIV Protection.

Víctor Casanova, Isaac Naval-Macabuhay, Felipe García, Agathe Leon, Marta Rodríguez-García, Emma Fernández, Laia Miralles, Cristina Rovira, Josefa Mallol, Peter-Joseph McCormick, Enric I Canela, José María Gatell, Teresa Gallart*, Núria Climent*.

(Manuscrit en preparació)

Resultats 3.1: L'adenosina desaminasa incrementa la immunogenicitat de les cèl·lules dendrítiques d'individus sans i infectats per VIH.

*Víctor Casanova^{*1}, Isaac Naval-Macabuhay^{*1}, Marta Massanella², Marta Rodríguez-García³, Julià Blanco², José M. Gatell⁴, Felipe García^{4,5}, Teresa Gallart^{4,6}, Carme Lluís¹, Josefa Mallol¹, Rafael Franco^{*1}, Núria Climent^{*4}, Peter J. McCormick^{*1}*

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ² Fundació irsiCaixa-HIVACAT, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. ³ Department of Physiology and Neurobiology, Dartmouth Medical School Lebanon, NH, USA. ⁴ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)-AIDS Research Group, and Catalanian Center for HIV Vaccines (HIVACAT), Barcelona, Spain. ⁵ Infectious Diseases and AIDS Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁶ Service of Immunology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

L'ADA és un enzim implicat en el metabolisme purínic, crucial per a una correcta funció immunològica. El seu dèficit congènit comporta una immunodeficiència combinada severa (SCID). La unió d'ADA als receptors d'adenosina en la cèl·lula dendrítica i al CD26 en els limfòcits T possibilita senyals co-estimuladores per als limfòcits T, fet que incrementa l'activació i la proliferació de la cèl·lula T. Tot i l'existència de nombrosos estudis sobre les funcions de l'ADA en l'activació de la cèl·lula T, la possible modulació dels processos de maduració de la cèl·lula dendrítica per aquest ecto-enzim és encara enigmàtica. En aquest treball, es varen investigar les accions de l'ADA en la biologia de la cèl·lula dendrítica humana derivada de monòcit. Els resultats obtinguts demostren que l'ADA incrementa l'expressió de CD80, CD86, CD40 i CCR7 en cèl·lules dendrítiques immadures tant en individus sans com en infectats pel VIH. En aquests processos tant l'activitat enzimàtica com la no enzimàtica de l'ADA hi estan implicades. Els increments en CD83 i mol·lècules co-estimuladores són paral·lels a una major secreció d'IL-12, IL-6, TNF- α , CXCL8(IL-8), CCL3(MIP1- α), CCL4(MIP-1 β) i CCL5(RANTES), tant en donants sans com en pacients infectats pel VIH. En aquests últims, a més, s'obren patrons d'apoptosi alterats com a conseqüència de l'efecte de l'ADA. D'acord amb els resultats esmentats, els efectes de l'ADA sobre les iDCs són capaços d'incrementar la proliferació de cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺ al·logèniques, fet que reflexa una major immunogenicitat d'aquestes dendrítiques. De forma conjunta, aquests resultats suggereixen que l'ADA promouria respostes T més potents i millor polaritzades en pacients infectats pel VIH en estat asimptomàtic.

Adenosine Deaminase Enhances the Immunogenicity of Human Dendritic cells from Healthy and HIV-infected individuals.

Víctor Casanova^{*1}, Isaac Naval-Macabuhay^{*1}, Marta Massanella², Marta Rodríguez-García³, Julià Blanco², José M. Gatell⁴, Felipe García^{4,5}, Teresa Gallart^{4,6}, Carme Lluís¹, Josefa Mallol¹, Rafael Franco^{*1, ¶}, Núria Climent^{*4}, Peter J. McCormick^{*1}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ² Fundació irsiCaixa-HIVACAT, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. ³ Department of Physiology and Neurobiology, Dartmouth Medical School Lebanon, NH, USA. ⁴ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)-AIDS Research Group, and Catalanian Center for HIV Vaccines (HIVACAT), Barcelona, Spain. ⁵ Infectious Diseases and AIDS Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁶ Service of Immunology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.

¶ Present address: Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), University of Navarra, Pamplona, Spain

* These authors contributed equally to this work

Corresponding author: Peter J. McCormick. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, Avd. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. Phone: 0034 934039280. FAX: 934021559. Email address: pmccormick@ub.edu

Abstract

ADA is an enzyme implicated in purine metabolism, and is critical to ensure normal immune function. Its congenital deficit leads to severe combined immunodeficiency (SCID). ADA binding to adenosine receptor on dendritic cell surface enables T-cell costimulation through CD26 crosslinking, which enhances T-cell activation and proliferation. Despite a large body of work on the ecto-enzyme ADA actions on T-cell activation, questions arise on whether ADA can also modulate dendritic cell maturation. To this end we investigated the ADA actions on human monocyte derived dendritic cell biology. Our results show that ADA enhances CD80, CD83, CD86, CD40 and CCR7 expression on immature dendritic cells from healthy and HIV-infected individuals, and both the enzymatic and non-enzymatic activities of ADA are implicated. These ADA-mediated increases in CD83 and costimulatory molecule expression is concomitant to an enhanced IL-12, IL-6, TNF- α , CXCL8(IL-8), CCL3(MIP1- α), CCL4(MIP-1 β) and CCL5(RANTES) cytokine/chemokine secretion both in healthy and HIV-infected individuals and to an altered apoptotic death in cells from HIV-infected individuals. Consistently, ADA-mediated actions on iDCs are able to enhance allogeneic CD4 and CD8-T-cell proliferation, globally yielding increased iDC immunogenicity. Taken together, these findings suggest that ADA would promote enhanced and correctly polarized T-cell responses in strategies targeting asymptomatic HIV-infected individuals.

INTRODUCTION

Adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) is a key enzyme in the purine pathway catalyzing the irreversible deamination of adenosine or 2'-deoxyadenosine to inosine or 2'-deoxyinosine and ammonia. ADA's function is essential in maintaining an immune response as patients with ADA deficiency suffer from SCID, a rare inherited metabolic disorder that causes lymphopenia and immunodeficiency [1,2] due to the accumulation of toxic substrates [3] and excessive adenosine receptor activation [4]. ADA is released into the extracellular medium by immune cells where the enzyme can bind to certain membrane proteins such as CD26 [5–7] and adenosine receptors A_1 [8], A_{2B} [9] and A_{2A} [10]. CD26 is a T-cell-activation marker molecule that has dipeptidylpeptidase enzymatic activity. Physiologically, this activity regulates the actions of several peptides, including chemokines [11]. Adenosine receptors are members of the G protein coupled receptor family. A_1 is negatively coupled to adenylate cyclase, while A_{2A} and A_{2B} can activate this same enzyme through the G_s protein subunit. This leads to an increase in cAMP levels, which may account for the adenosine mediated anti-inflammatory effects on T-cells, neutrophils or antigen presenting cells [12]. Thus, ADA is expressed as an ecto-enzyme with relevant physiological roles in the immune synapse [13,14]. On one hand, the enzymatic activity of ADA reduces adenosine levels available for stimulation of adenosine receptors expressed on the T-cell surface contributing to immune regulation [7,15,16]. On the other hand, ADA delivers costimulatory signals to T-cells through CD26 crosslinking [17]. By acting as a bridge between A_{2B} adenosine receptors on dendritic cells (DCs) and CD26 on T-cells [13], ADA acts as a costimulatory molecule in DC-T-cells cocultures enhancing T-cell proliferation, Th-1/pro-inflammatory cytokine secretion [13], and T-CD4⁺ cell activation, memory, and Foxp3⁺ generation in both healthy and HIV-infected subjects [18]. Although HIV gp120 envelope protein disrupts ADA-CD26 interaction [19], possibly contributing to the immunodeficiency [20], ADA is still able to enhance autologous T-cell proliferation against inactivated-HIV presentation by DC in individuals under HAART [21], suggesting a beneficial role for ADA on improving HIV-specific T-cell responses in those individuals [22].

While ADA actions on T-cells have been extensively studied, its actions on human DC are still largely unknown, despite the pivotal role of these cells on the immunological synapse and T-cell activation. In fact, DCs are the most potent antigen presenting cells (APC), critical in

the initiation and control of protective immune responses [23,24]. Immature dendritic cells (iDCs) are widely spread among peripheral tissues, where they actively scan the environment to detect any invading pathogen or foreign antigen. Towards this end, pathogen associated molecular patterns (PAMPS), nucleotides, inflammatory cytokines or cell damage activate a complex DC maturation programme consisting of the up-regulation of maturation markers such as CD83, costimulatory (such as CD80, CD86 and CD40) and HLA molecules, the activation of CCR7 expression-induced migration to secondary lymph-nodes and the secretion of T-cell polarizing cytokines, in a process set to efficiently activate antigen-specific T-cells [25]. In contrast, in the absence of alarm signals, self-antigens are presented to T-cells in the absence of or in limited costimulation, which results in tolerance, either by T-cell apoptosis, anergy or regulatory T-cell (Treg) development in a process driven by inhibitory receptors such as PD-1 or CTLA-4 [26] and suppressive mediators such as IL-10, TGF- β or adenosine [27–29]. These unique and versatile properties of DCs makes them a valuable tool for therapeutic vaccination purposes such as in HIV [30,31], cancer [32,33] or tolerogenic approaches [34]. Therefore, it is important to know the role played by ADA on the biology of DCs.

Since it has been observed that DCs are able to arise from monocytes *in vivo* [35,36], monocyte-derived DCs are a good model for *in vitro* studies [37]. The role of ADA on the expression of costimulatory molecules, on cytokine and chemokine secretion, on the immunogenicity, migration and viability of human monocyte-derived DC from healthy or HIV-infected donors was here addressed. Four novel observations derive from this study: First, ADA enhances DCs costimulatory molecule expression. Second, ecto-ADA actions on iDCs are able to increase the secretion of both pro-inflammatory cytokines and chemokines that are known to promote Th-1 immune responses. Third, we establish that both the enzymatic and enzymatic-independent role of ADA participate in ADA-induced effects. Finally, ADA globally enhances the immunogenicity of human DCs, a process that results in improved CD4⁺ T-cell proliferation after alloantigen presentation. These results demonstrate that ADA can lead to an increased mature DC status; a property that can be harnessed to improve the outcome of immune responses to chronic infections such as HIV.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and study population

Blood samples were obtained by venipuncture from the antecubital vein using EDTA-treated vacutainers (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) and were processed immediately after extraction. Healthy control volunteers (n = 25) and HIV-1-infected individuals (n = 22) were included in the study. The study received the approval of the Institutional Committee of Ethics and Clinical Investigation and all individuals gave informed written consent. The characteristics of HIV- infected subjects are shown in Table 1.

Antibodies and Reagents

FITC-conjugated mAbs against HLA-DR, HLA-ABC, CD4, CD14, CD19, CD25, CD45RA and IgG- γ 1 isotype-matched control, PE-conjugated mAbs against HLA-DR, CD1a, CD11c, CD14, CD19, CD25, CD40, CD45RO, CD56 and IgG- γ 1 isotype-matched control, PerCP-conjugated mAbs against CD3, CD4 and IgG- γ 1 isotype-matched control and PE-Cy7-conjugated mAb against CCR7 from Becton Dickinson Biosciences (Erembodegem-Aalst, Belgium); PE-conjugated mAbs against CD80, CD83 and CD86 from Coulter-Immunotech Diagnostic (Marseille, France); PE-conjugated mAb against CD209 from eBioscience (California, USA). Human-specific mAb against CD26, TA5.9-CC1-4C8 were used as previously indicated [13,19,20]

ADA preparation and activity determination

ADA from calf intestine (Roche Diagnostic Inc, Mannheim, Germany) was desalted by passage through a PD-10 column (Amersham Biosciences, Cerdanyola, Spain) and its enzymatic activity was evaluated by adenosine deamination measured as decreases in absorbance at 265 nm as previously reported [38]. To obtain ADA without enzymatic activity, desalted ADA was treated with HgCl₂ as described previously [8] and passed again through a PD-10 column to eliminate remaining HgCl₂. The enzymatic activity of Hg²⁺-treated ADA (ADA-Hg) was completely abolished. The possibility of LPS contamination in the ADA preparations was addressed by boiling the ADA preparation for 10 min before its addition to iDCs cultures. This process completely removed ADA's ability to induce phenotypic changes in iDCs (data not shown).

Generation of monocyte-derived DCs

Monocyte-derived DCs were obtained as described previously [13,18,39]. Human PBMC were obtained immediately after blood extraction using the standard Ficoll gradient method. To obtain monocytes, PBMC were incubated for 2 h at 37 °C in a humid atmosphere of 5% CO₂ in 75 cm² plastic flasks with DC-medium, consisting of serum free XVIVO-15 medium (Bio-Whittaker, Walkersville, MD, USA) supplemented with 1% autologous serum, 50 µg/ml gentamycin (Braun B., Melsungen, Germany), 2.5 µg/ml fungizone (Bristol-Myers Squibb, Munchen, Germany) and, in the case of HIV-infected individuals, with 1 µM zidovudine (Retrovir from GlaxoSmithKline, Madrid, Spain) to avoid possible replication of endogenous HIV-1. To obtain immature DCs (iDCs) adherent monocytes were washed four times with pre-warmed serum free XVIVO-10 medium (Bio-Whittaker) and cultured during 5 days in DC-medium, supplemented at days 0 and 2 with human recombinant IL-4 and GM-CSF (1000 UI/ml, each) (Prospec-Tany Technogene LTD, Rehovot, Israel). The purity and immunophenotype were assessed by flow cytometry and was found to be similar to previously reported [13,18,39]. At day 5 of differentiation, iDCs were washed 4 times with XVIVO-10 media, counted and 5·X10⁵ cells/ml distributed in 12.5 cm² plastic flasks with fresh DC-medium supplemented with IL-4 and GM-CSF. To obtain ADA-treated DCs or fully mature DCs (mDCs), 2 µM ADA or 10 µl/ml of cytokine maturation cocktail were added, and cultured for two additional days. This cytokine maturation cocktail contains TNF-α, IL-6 (1000 UI/ml each, Strathmann-Biotec AG), IL-1β (300 UI/ml, Strathmann Biotec AG) and PGE₂ (1 µg/ml, Pfizer, Madrid, Spain).

T-cell isolation, cocultures and proliferation assays.

As a source of T-cell-enriched population, non-adherent PBMC (see above) were washed four times with XVIVO-10 medium and collected for further coculture experiments as described before [13,18]. To measure T-cell proliferation, 10⁷ cells/ml were stained with 5 µM CFSE using the CellTrace CFSE proliferation kit (Molecular Probes, Paisley,UK) as indicated by the manufacturer's protocol.

Autologous or allogeneic cocultures were performed in 96-well round bottom plates, containing non-treated or treated iDCs (10⁴ cells/well) and fresh CFSE stained T-cells (2·x10⁵ cells) in a

final volume of 200 μ l of in XVIVO-10 media. T-cell proliferation was assessed by flow cytometry after 7 days of coculture in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C.

Cytokine and chemokine secretion measurement.

iDCs, ADA-treated iDCs or mDCs ($5 \cdot 10^5$ cell/ml) were cultured in DC-medium and the secretion of cytokines and chemokines was measured in the supernatants after 48 h of culture. Multiplex Luminex assays (Cytokine Human 25-Plex Panel, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were performed following the manufacturer instructions. The following 25 mediators were tested: Eotaxin, GM-CSF, IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8(IL-8), IL-10, IL-12p40/p70, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- α , IFN- γ , CXCL10(IP-10), CCL2(MCP-1), CXCL9(MIG), CCL3(MIP1- α), CCL4(MIP-1 β), CCL5(RANTES) and TNF- α

Chemotaxis assay

DCs migration towards CCL19 or CCL21 chemokines (from PeproTech, London, UK) was measured in a 96-plate transwell chemotaxis chambers (Corning Costar, Cambridge, MA, USA), using a polycarbonate filter of 5 μ m pore size as previously reported [40]. Briefly, 150 μ l of recombinant human CCL19 (300 ng/ml) or recombinant human CCL21 (250 ng/ml) or medium alone were placed in the lower wells. Upper wells were loaded with 50 μ l of XVIVO-15 medium containing $2.5 \cdot 10^4$ iDCs, ADA-treated iDCs or mDCs. Each condition was set up in duplicates. The complete chamber was kept in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C for 3 h. Thereafter, cell suspensions in the upper well were removed and cells that had migrated through the filter to the lower wells were counted by flow cytometry for 1 min. Values were given as percentage of migrated cells \pm SEM in relation to the initial cell input.

Flow cytometry

Cells were collected, washed with PBS and incubated 30 min at 4°C with PBS containing 10% rabbit serum and 0,1% NaN₃ prior 30 min incubation (4°C) with primary labeled antibodies. When CCR7 staining was performed, cells were incubated with PBS containing 5% BSA for 30 min at room temperature prior staining with CCR7-labeled monoclonal antibody for 30 min at 4 °C. Cells were washed with PBS and 10,000 to 50,000 events were collected on a FACsCAN or a FACsCANTO flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences Erembodegem-Aalst, Belgium).

Data was analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc. Ashland, OR, USA). The expression of iDCs immunophenotype (CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD56⁻, HLA-DR⁺, HLA-ABC⁺, CD80^{low}, CD83^{low}, CD86⁺, CD1a⁺, CD11c⁺, CD40⁺, CD45RO⁺, CD45RA⁻) was addressed and the percentage of positive cells and the geometric mean fluorescence intensity was measured. DC and T-cell populations were selected by forward and side light-scatter parameters.

Cell Death Assay

iDCs, ADA-treated iDCs and mDCs were carefully washed with XVIVO-15 medium after 48 h cell culture in DC-medium. Cells ($2 \cdot 10^5$) were resuspended in 200 μ l of XVIVO-15 media and incubated with 40 nM of the potentiometric mitochondrial probe DIOC₆ (Molecular Probes; Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and 10 μ l of propidium iodide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 1 h at 37 °C. Samples were then acquired in a FACsCANTO instrument (BD). A minimum of 10,000 events of every sample were collected and analyzed on FlowJo software. After gating on DCs population by Forward and Side parameters, apoptotic and necrotic cells were identified by their low DIOC₆ fluorescence [41] plus the absence or presence of propidium iodide staining.

Statistical Analysis:

Graphs were plotted using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA). Quantitative variables were analyzed using medians and IQRs. The non-parametric Mann Whitney *U*-test for unpaired data or the Wilcoxon signed rank test for paired data were used when comparing two groups. For multiple comparisons, Kruskal-Wallis test followed by Dunns post-test was used. For all the tests used, a two tailed *P* value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

ADA enhances the expression of costimulatory molecules in iDCs

To study the influence of ADA on the phenotype of DCs, we first investigated the effect of ADA on the expression of costimulatory molecules by flow cytometry. Immature monocyte-derived DCs (iDCs) from healthy or HIV-infected donors were cultured in the absence or in the presence of ADA for 48 h, and the expression of CD83, CD80 and CD86 was compared with the expression detected in mature DCs (mDCs) obtained from the same donors after a cytokine-PGE₂ maturation cocktail stimulation [42]. Different doses of ADA were tested, choosing 2 μM as the lowest dose at which significant ADA effects were observed (Supplemental Fig. S1 A and B). When iDCs were treated with ADA, a consistent and statistically significant ($P < 0.001$) upregulation of CD83 (Fig. 1 A and B) and CD80 (Fig. 1 C and D) was observed, both in healthy and in HIV-infected donors. As expected, mDCs showed a marked increase in the expression of CD83 and CD80 (Fig. 1 A and C). When assessing CD86 expression (Fig. 1 E and F), all DCs expressed CD86 (>95% cells were positive on this marker) but culturing iDCs in the presence of ADA resulted in a statistically significant increase in CD86 geometric mean, which was seen in healthy donors ($P < 0.05$) as well as in HIV-infected individuals ($P < 0.001$) (Fig. 1 F). Again, mDCs expressed a higher CD86 geometric mean than its immature counterparts. CD83, CD80 and CD86 are classically considered maturation markers [43], and their upregulation suggests that ADA is potentiating DC maturation. The coordinated upregulation of costimulatory and HLA molecules on the surface of DCs is a characteristic feature of maturing DCs [43], thus, we next sought to examine the ADA effect on HLA expression in the same experimental settings as above. No statistically significant changes in HLA-DR (Fig. 2 A and B) or HLA-ABC (Fig. 2 C and D) geometric mean were obtained in either healthy nor in HIV-infected individuals when their iDCs were cultured in the presence of ADA. In contrast, cytokine maturation of DCs clearly increased HLA-DR and ABC geometric mean (Fig. 2 A and C). Both ADA treatment and cytokine maturation cocktail failed to affect the percentage of cells expressing other monocyte-derived DCs markers such as CD11c (90% positive) or CD14 (<5% positive). The failure of ADA to induce a clear upregulation of HLA molecules indicates that ADA does not promote a full maturation process but a preferential enhancement of costimulatory molecules. To address the

latter, the ADA effect on the expression of CD40, another costimulatory marker, was measured. All iDCs expressed CD40 (>95% cells were positive on this marker). A moderate and significant ($p < 0.05$) increase in CD40 geometric mean was observed when iDCs from healthy donors were treated with ADA (Fig. 2 E and F). A tiny increase in CD40 geometric mean was noticeable when iDCs from HIV-infected individuals were treated with ADA, although this effect was not consistent on every patient tested due to a high inter-individual variability (Fig. 2 F). In contrast, a clear increase in geometric mean was observed both in healthy and HIV individuals in mDCs (Fig. 2 E). Considering that CD83, CD80, CD86 and CD40 are important for delivering the appropriate secondary signals to T-cells [43,44] the ADA-mediated up-regulation of these markers indicates that ADA may increase the costimulatory potential of iDCs. Given the heterogeneity of the different HIV-infected individuals (table 1) we sought to determine whether differences could be observed on iDCs by classifying patients according to their clinical parameters, including CD4⁺ or CD8⁺ cell counts, viral load, HAART treatment or disease progression (controller vs non controller). This analysis shows that iDCs from patients with detectable viremia have increased CD80 while reduced CD83 expression compared to patients with undetectable viremia (Supplemental Fig. S2 B). No other major differences were found on this analysis. We further tested whether ADA effects on costimulatory markers expression might correlate with any clinical parameter from these patients. Interestingly, ADA-mediated effects on CD80 expression did correlate with the patients' viral load (Supplemental Fig S3 A), but no other major correlations were found.

ADA enhances Th-1/pro-inflammatory cytokines and chemokines secretion

Eliciting the appropriate cytokine and chemokine expression pattern to each invading pathogen is critical to ensure a correctly polarized and efficient immune response [25]. To investigate whether ADA was able to enhance DC cytokine and chemokine release and to characterize the specific molecules involved, up to 25 cytokines and chemokines were determined in culture supernatants from non-treated and ADA-treated iDCs using the Luminex technology. iDCs from either healthy or HIV-infected individuals were cultured in the absence or in the presence of ADA or with the maturation cocktail. After 48 h supernatants were collected for further analysis. ADA addition to iDCs cultures resulted in a consistent enhancement in the

release of a specific group of Th-1/pro-inflammatory cytokines and chemokines both in healthy and in HIV donors (Fig. 3). IL-12, whose secretion is pivotal in regulating Th-1 polarization, was augmented 2-fold in the presence of ADA when compared to iDCs in both healthy and HIV-infected individuals. When the pro-inflammatory cytokines were addressed, a striking 10-fold up-regulation of IL-6 was found, whereas a less consistent increase in TNF- α (2.5 median in-fold) was seen (Fig. 3). It must be noted that IL-1 β which is often found together with IL-6 and TNF- α under inflammatory stimuli, was not detected in our iDC cultures in any donor, suggesting that a very specific effect was triggered. Low, yet measurable levels (40-50 pg/ml) of the antiviral IFN- α cytokine were detected in iDCs, but were not increased by ADA (Supplementary Fig. S1 C). When chemoattractant mediators were analysed in the supernatants, a clear and significant increase in CXCL8, CCL3, CCL4 and CCL5 was observed in healthy donors and also in HIV-infected individuals (Fig. 3). The ADA-mediated increase on these latter three CCL chemokines (β -chemokines) is relevant to HIV pathogenesis since potent HIV-inhibitory activities are associated to these mediators [45]. In addition, ADA induced a less prominent but noticeable increase in other chemokines such as CCL2 (Fig. 3) or CXCL9 (1.35 median in-fold, Supplementary Fig. S1). Importantly, the cytokine and chemokine profile enhanced by ADA is very similar to the one observed for mDCs (Supplementary Fig. S1). It is also remarkable that in our culture conditions no measurable levels of eotaxin, IL-5, IL-7, IL-13, IL-15, IL-17 and CXCL10 were detected (data not shown).

ADA enzymatic-dependent and independent activities contribute to its effects on iDCs

Both adenosine deamination and CD26 binding are reported to have important roles on the immune system [7,14]. Thus, we sought to delineate the particular contribution of these activities on the ADA-mediated effects on iDCs. To address this question, we blocked the enzymatic activity of ADA via inhibition with HgCl₂ (ADA-Hg). ADA-Hg is unable to degrade adenosine while retaining its receptor binding capability [8]. iDCs were then cultured in the absence or presence of ADA or ADA-Hg. As expected, ADA led to an upregulation of CD83 and CD80 expression on all donors tested (Fig. 4 A and B). By contrast, ADA-Hg decreased the ADA-mediated up-regulation of CD83 and CD80 in a median of 0.7 and 0.8 in-fold respectively (Fig. 4 A). Despite this reduction, ADA-Hg was still able to induce a noticeable increase in CD80 and CD83 expression compared to non-treated iDCs (Fig. 4 A), indicating that a mechanism

other than the enzymatic activity must be also involved. Since the presence of ADA on cell membranes has classically been associated to CD26 expression in many cell types [5,46,47] and CD26 is also expressed in human iDCs [13], the participation of CD26 on ADA-mediated effects on iDCs was investigated. To address this, the mAb TA5.9, which is directed against the ADA-binding epitope on CD26, was used. When iDCs had been previously pre-incubated with TA5.9, the ADA-mediated upregulation of CD83 and CD80 was reduced by 0.46 and 0.64 in-folds respectively suggesting an important role for ADA binding to CD26 in the ADA-mediated increase in CD86 and CD80 expression (Fig. 4 B). Our next goal was to address the role of ADA enzymatic activity and CD26 binding on cytokine and chemokine release. iDCs cultured in the presence of ADA-Hg have a decreased secretion of IL-12, CCL2, CCL4 and slightly CCL3 (Fig. 4 C) while TNF- α secretion were not significantly modified and IL-6 secretion was enhanced under these condition (Fig. 4 C). When the mAb TA5.9 was used in the same experimental settings, no significant effect could be seen on IL-12, TNF- α or CCL3 secretion, while IL-6, CCL2 and CCL4 were slightly decreased (Fig. 4 C). Interestingly, neither the ADA-mediated changes in CXCL8 and CCL5 secretion were affected by ADA-Hg or TA5.9 (results not shown), suggesting these require a mechanism independent of CD26 or adenosine levels. Taken together, these results suggest that both the enzymatic activity and binding to CD26 contribute to the global ADA mediated effects observed, since the abrogation of one of these mechanisms alone does not abolish all the ADA effects.

ADA enhances the DCs capacity to stimulate allogeneic T-cells.

The ADA-induced enhancement of costimulatory molecules expression and Th-1/pro-inflammatory mediators release on iDCs, suggested that ADA could render iDCs more immunogenic by improving antigen presentation. To address this question, iDCs were cultured in the absence or presence of ADA or with maturing cocktail during 48 h, strictly washed, and cocultured with allogeneic CFSE-stained T-cells or autologous CFSE-stained T-cells as a negative control. Proliferation of both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets was quantified. As expected, mDCs induced the highest T-cell proliferation (Fig. 5 A and B). Remarkably, ADA also induced a significant increase in CD4⁺ T-cell proliferation compared to non-treated iDCs (Fig. 5 A and C). Moreover, an enhanced proliferation of CD8⁺ T-cells was also observed in cocultures with ADA-treated iDCs, although this increase was less consistent than that of CD4⁺ T-cells

(Fig. 5 B and C). Barely detectable levels of CD4⁺ or CD8⁺ T-cell proliferation was detected on autologous cocultures, neither in the absence nor in the presence of ADA (Fig. 5 A and B), discarding the possibility of ADA being presented as a foreign antigen. As ADA has been previously shown capable of increasing Th-1 immune responses when present at the immune synapse [13], we further tested whether ADA-induced effects on iDCs could still favor this T-cell polarization. To address this issue, co-culture supernatants were addressed for IFN- γ , IL-4, and IL-17, indicative of Th-1, Th-2 and Th-17 polarization, respectively. In all conditions tested IFN- γ levels clearly predominated, and ADA actions on iDC did not alter this secretion profile, as we detected 423 pg/ml of IFN- γ as a median, while only 40 pg/ml of IL-4 and 49 pg/ml of IL-17 were found (Fig 5 D). These results indicate that the ADA-induced effects on iDCs contribute to an improved iDC function.

ADA increases CCR7 expression without an increase in DCs migration.

To further characterize the ADA effect on DCs status, we next tested the effect of ADA on DCs migration. CCR7 is critical to normal DC function as it drives antigen-loaded DCs entry to secondary-lymph nodes, through CCL19 and CCL21-dependent chemotactic gradients [48]. AS CCR7 is up-regulated upon DCs maturation, its expression is an indicator of DC status [43]. Therefore, we determined CCR7 expression and CCR7-dependent DCs migration as a way to evaluate the DC population. iDCs from healthy donors were cultured in the absence or in the presence of exogenous ADA or in the presence of maturing cocktail and CCR7 expression was determined by flow cytometry. A small but statistically significant increase in CCR7 expression was obtained in the presence of ADA in every tested healthy donor (Fig. 6 A and B). In accordance with previous studies [49], the maturation cocktail induced a more potent up-regulation of CCR7 (Fig. 6 A). We next sought to determine whether the increase on CCR7 expression also improved CCR7-dependent DC migration. To address this question, a transwell assay was used to assess the migration towards CCL19 or CCL21. As expected, extremely low numbers of iDCs migrated to CCL19 or to CCL21 after 3 hours of assay (Fig. 6 C and D). ADA addition to iDC cultures did not result in significant changes in iDC migration, neither to CCL19 nor to CCL21 in contrast to the migration observed with mDCs (Fig. 6 C and D). The ADA-induced increase in CCR7 expression fits with the role of ADA on increasing the expression of

costimulatory molecules in iDCs that confers a more mature DC status, but is not sufficient to induce an increase on the in vitro DCs migration.

Role of ADA in iDCs viability.

The right balance between cell death and survival is critical to achieve a correct immune homeostasis and this is especially important in HIV-infected donors where DCs death contributes to the pathogenesis of the disease [50]. Thus, we next tested whether the ADA-induced more mature DC phenotype could be playing a role on DCs viability. iDCs from either healthy or HIV-infected individuals were cultured in the absence or in the presence of ADA or with maturing cocktail. DIOC₆, a fluorescent dye sensing mitochondrial potential was used to stain viable cells. Early apoptotic and late apoptotic/necrotic cells could be easily distinguished through the combination of low DIOC₆ staining and negative (apoptosis) or positive (necrosis) propidium iodide staining (Fig. 7). The low percentage of cells that showed a bright DIOC₆ and positive propidium iodide staining might represent dead cells phagocytosed by live DCs or DCs broken during manipulation. ADA addition to iDCs from healthy or HIV-infected donors did not result in significant changes in iDCs viability after 48 h of cell culture as measured by low DIOC₆ staining (Fig. 7 A and B). When apoptosis and necrosis were addressed on iDCs from healthy donors, ADA was found unable of inducing significant changes in any of these populations, (Fig. 7 A, C and D). In contrast, all HIV-infected donors showed increased percentage of early apoptotic cells in the presence of ADA while a reduced necrosis was detected (Fig. 7 A, C and D). A clearly higher DCs viability with reduced apoptosis and necrosis were observed in mDCs from either healthy or HIV-infected individuals (Supplemental Fig. S4), a result most likely due to the presence of PGE₂ in the maturing cocktail [51]. These findings indicate that ADA does not play a role in iDCs viability in healthy individuals whereas a different situation emerges on HIV-infected donors. In a chronic disease setting, ADA showed a protective role against late steps of cell death, an observation which may apply to other cells such as CD8 T-cells [52]. This was however, not always reflected in a total increase in iDCs viability, suggesting that ADA is inhibiting a post-mitochondrial event in apoptotic cascades in iDCs from HIV-infected individuals.

DISCUSSION

In this study, we explored the effects of extracellular ADA on human monocyte-derived DCs from healthy and HIV-infected individuals. Four novel observations derive from this study. First, ADA added to human iDCs cultures enhances DCs-self costimulatory and maturation molecule expression. Second, we demonstrate, for the first time, that ecto-ADA actions on iDCs are able to increase the secretion of both pro-inflammatory cytokines and chemokines that are known to promote Th-1 immune responses. Third, we establish that both the enzymatic and enzymatic-independent role of ADA participate in ADA-induced effects. Finally, ADA globally enhances the immunogenicity of human DCs, a process that results in an improved CD4⁺ and CD8⁺ T-cell activation after alloantigen presentation.

Despite the now clear role of ecto-ADA on promoting an enhanced T-cell activation, proliferation and Th-1 effector/memory generation [13,18,21], it remained unclear whether ecto-ADA would modulate human DC functions. It is this issue we have investigated. Using human monocyte-derived DCs obtained from peripheral blood, we first determined if the addition of ADA to iDC cultures would induce the expression of costimulatory molecules on iDCs. In fact we observed that ADA increases CD83, CD80, CD86 and CD40 expression. These molecules are classically considered maturation markers and their up-regulation suggests that ADA is potentiating the DCs maturation. Considering that CD83, CD80, CD86 and CD40 are important for delivering the appropriate secondary signals to T-cells [43,44], the ADA-mediated up-regulation of these markers indicates that ADA may increase the costimulatory potential of DCs. Another interesting aspect to highlight is that the addition of ADA to iDC cultures increases Th-1/pro-inflammatory cytokine release including IL-12, TNF- α and IL-6. This cytokine pattern is very similar to the ADA-increased effect on DC-T-cell autologous cocultures [13], indicating that ADA can act not only on lymphocytes but also on DCs to increase Th-1/pro-inflammatory cytokine release. Whereas IL-12 is critical to polarize T-cells towards Th-1, both IL-6 and TNF- α promote inflammation and the activation of both innate and adaptive immune responses including T-CD4⁺ memory generation [18,53] and the maturation of DCs [54]. In addition, pro-inflammatory cytokines in general and IL-6 in particular have been shown to block Treg mediated suppression of DCs [55] as well as global Treg suppression capacity [56]. Together with deaminase activity,

the ADA-induced secretion of pro-inflammatory cytokines would provide a local “suppression free” environment to facilitate T-cell activation. In addition to the cytokines, we also demonstrate, for the first time, that ADA addition to iDCs culture is able to increase the secretion of chemokines such as CXCL8, CCL2, CCL3, CCL4 and CCL5. The global role of these chemokines is to recruit immune cells such as neutrophils, monocytes, DCs, and activated T and B cells to the sites where antigen processing is taking place, in order to further develop the corresponding immune response [57].

To discern the exact mechanisms by which ADA is acting to induce DCs maturation is difficult but our results indicate that both the enzymatic and extraenzymatic activity of ADA are mediating its effects. By using ADA inhibited by HgCl₂ we observed a reduced expression of costimulatory molecules and a decreased secretion of IL-12, CCL2, CCL3 and slightly CCL4 compared to active ADA, suggesting that the enzymatic activity of ADA is mediating part of these effects. ADA catalyzes the irreversible deamination of adenosine to inosine and ammonia decreasing the amount of extracellular adenosine able to bind to its receptors. It is known that human monocyte-derived DCs as well as plasmacytoid DCs express adenosine receptors [13,58,59] and adenosine, by binding to its receptors, modulates DC function, generally reducing the maturation and immunogenicity of stimulated DCs by enhancing IL-10 while diminishing IL-12, IL-6 and TNF- α secretion, lowering allo-stimulatory potential and limiting Th1 polarization [58–60]. Since the ADA-induced effects are the increase, not the decrease, of the expression or secretion of these molecules, part of the effects here observed can be due to the ADA-mediated reduction of adenosine available to bind adenosine receptors. This has been seen in mice where adenosine deamination by ecto-ADA on DCs surface was revealed to be critical to ensure DCs activation to TLR ligands [61]. Interestingly however, inactive ADA (ADA-Hg) is able to increase IL-6 secretion, rather than decreasing it. Since adenosine has been proposed to signal through A_{2B} receptors and promote IL-6 secretion on iDCs [62,63] and ADA, by binding to A_{2B} increases the affinity and signaling of its ligands [9], it is plausible that ADA inactivation results in increased adenosine effects through its receptors. We observed that part of the ADA-mediated effects are independent of its enzymatic activity. In this respect, human or bovine ADA binds to human CD26 [5,64,65], whereas murine ADA neither binds to mouse nor human CD26 [66], suggesting relevant differences between human and mice models. We have

previously described that ADA, by a mechanism independent of its enzymatic activity, binds to CD26 on T-cells enhancing cytokine release and T-cell costimulation [13,18,20]. To address the role of CD26 in the ADA-induced effects, the mAb TA5.9, which is directed against the ADA-binding epitope on CD26, was used. In the presence of the antibody, the ADA-mediated upregulation of CD83 and CD80 was reduced and the secretion of IL-6, CCL2 and CCL4 were slightly decreased suggesting a role for ADA binding to CD26 in these effects. Membrane-bound CD26 is known to interact with CD45 [67], a tyrosine phosphatase also present in dendritic cells. Since CD45 has been shown to modulate costimulatory molecule expression and TLR-induced cytokine secretion on murine DCs [68–70] it is plausible that after ADA binding, CD26 may interact and affect the subsequent Src kinases under CD45.

While ecto-ADA may attract immune effector cells through chemokine up-regulation, it clearly does not seem to promote iDCs migration to CCL19 or CCL21 gradients, despite the upregulated CCR7 receptor expression observed in presence of ADA. This would fit with a role of ADA in the facilitation of DCs maturation rather than inducing the entire process alone. Regardless, the above mentioned ADA-mediated effects converge into one ultimate purpose: render DCs more immunogenic. In fact, in cocultures of lymphocytes and iDCs previously treated with ADA it was observed an enhanced proliferation of CD4⁺ T-cells. As DCs were extensively washed to eliminate the ADA added before the coculture, this improved immunogenicity is likely attributable to the enhanced expression of costimulatory molecules previously demonstrated. It is also plausible that iDCs treated with ADA are able to release greater amounts of cytokines and chemokines upon T-cell contact, due to their more mature status.

Finally, we have examined the effects of ADA on dendritic cells from asymptomatic HIV subjects. HIV-1 viral particles are known for affecting several immune mechanisms in their compulsory search for immune evasion. DC costimulatory molecule expression [71] and even CD26/ADA interactions [19,20] are found to be disrupted by HIV-1. In addition, HIV-1 deviates the appropriate Th-1 cell polarization towards Th-2 [72] and takes advantage of immunoregulatory mechanisms such as Tregs [73] or adenosine cell generation [74] to ensure the disease progression. Last but not least, diverse HIV factors are known to render DCs more

sensitive to apoptosis [50]. In the asymptomatic HIV subjects addressed here, where limited or null viremia is found, ADA was able to enhance costimulatory molecule expression and Th-1 promoting cytokine/chemokine secretion, slightly enhancing DCs viability in some individuals. Taken together, these findings suggest that HIV-T-cell specific responses could be improved in the presence of ADA. In fact, previous experiments revealed that inactivated HIV-loaded DCs cocultured with autologous T-cells in the presence of ADA enhanced HIV-specific T-cell responses [21]. In addition, CCR5-binding chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 are among the most potent natural HIV-1 suppression factors [45] known to block HIV cell fusion by antagonizing CCR5, an HIV co-receptor [75]. Also CXCL8 showed some transcriptional inhibition of HIV-1 in peripheral blood lymphocytes [76]. These facts raise the question of whether ecto-ADA mediated effects on iDCs could be accompanied of certain HIV-1-R5 suppressing activity, a hypothesis deserving future investigation. Taken together, the findings here described demonstrate that ADA enhances maturation and costimulatory molecule expression on iDCs from healthy and HIV-infected individuals, concomitantly to an enhanced IL-12, IL-6, TNF- α , CXCL8, CCL3, CCL4 and CCL5 cytokine/chemokine secretion and an altered transition to late apoptosis in HIV-infected individuals. As a whole these effects render DCs more immunogenic and suggest that ADA might promote enhanced and correctly polarized HIV-specific T-cell responses targeting asymptomatic HIV-infected individuals.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to all blood donors and to M.C. Pardo, M. Compte and M.A. López for technical assistance in blood extraction. We also acknowledge the invaluable technical help obtained from Cristina Rovira and Laia Miralles from the Hospital Clínic of Barcelona. PJM is a Ramón y Cajal Fellow.

REFERENCES

1. Gaspar HB, Aiuti A, Porta F, Candotti F, Hershfield MS, et al. (2009) How I treat ADA deficiency. *Blood* 114: 3524–3532. doi:10.1182/blood-2009-06-189209.
2. Blackburn MR, Thompson LF (2012) Adenosine Deaminase Deficiency: Unanticipated Benefits from the Study of a Rare Immunodeficiency. *J Immunol* 188: 933–935. doi:10.4049/jimmunol.1103519.
3. Arredondo-Vega FX, Santisteban I, Daniels S, Toutain S, Hershfield MS (1998) Adenosine deaminase deficiency: genotype-phenotype correlations based on expressed activity of 29 mutant alleles. *Am J Hum Genet* 63: 1049–1059. doi:10.1086/302054.
4. Cassani B, Mirolo M, Cattaneo F, Benninghoff U, Hershfield M, et al. (2008) Altered intracellular and extracellular signaling leads to impaired T-cell functions in ADA-SCID patients. *Blood* 111: 4209–4219. doi:10.1182/blood-2007-05-092429.
5. Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C (1993) Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* 261: 466–469.
6. De Meester I, Vanham G, Kestens L, Vanhoof G, Bosmans E, et al. (1994) Binding of adenosine deaminase to the lymphocyte surface via CD26. *Eur J Immunol* 24: 566–570. doi:10.1002/eji.1830240311.
7. Dong RP, Kameoka J, Hegen M, Tanaka T, Xu Y, et al. (1996) Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *J Immunol* 156: 1349–1355.
8. Ciruela F, Saura C, Canela EI, Mallol J, Lluís C, et al. (1996) Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett* 380: 219–223.
9. Herrera C, Casadó V, Ciruela F, Schofield P, Mallol J, et al. (2001) Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol Pharmacol* 59: 127–134.
10. Gracia E, Pérez-Capote K, Moreno E, Barkešová J, Mallol J, et al. (2011) A2A adenosine receptor ligand binding and signalling is allosterically modulated by adenosine deaminase. *Biochem J* 435: 701–709. doi:10.1042/BJ20101749.
11. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M (2009) On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 58: 1723–1747. doi:10.1007/s00262-009-0728-1.
12. Haskó G, Cronstein BN (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25: 33–39.
13. Pacheco R, Martínez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, et al. (2005) CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9583–9588. doi:10.1073/pnas.0501050102.
14. Franco R, Pacheco R, Gatell JM, Gallart T, Lluís C (2007) Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Crit Rev Immunol* 27: 495–509.
15. Hershfield MS (2005) New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur J Immunol* 35: 25–30. doi:10.1002/eji.200425738.

16. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, et al. (2010) Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem* 285: 7176–7186. doi:10.1074/jbc.M109.047423.
17. Martín M, Huguet J, Centelles JJ, Franco R (1995) Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. Possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. *J Immunol* 155: 4630–4643.
18. Martinez-Navio JM, Casanova V, Pacheco R, Naval-Macabuhay I, Climent N, et al. (2011) Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory, and regulatory CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 89: 127–136. doi:10.1189/jlb.1009696.
19. Blanco J, Valenzuela A, Herrera C, Lluís C, Hovanessian AG, et al. (2000) The HIV-1 gp120 inhibits the binding of adenosine deaminase to CD26 by a mechanism modulated by CD4 and CXCR4 expression. *FEBS Lett* 477: 123–128.
20. Martinez-Navio JM, Climent N, Pacheco R, Garcia F, Plana M, et al. (2009) Immunological dysfunction in HIV-1-infected individuals caused by impairment of adenosine deaminase-induced costimulation of T-cell activation. *Immunology* 128: 393–404. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03121.x.
21. Climent N, Martinez-Navio JM, Gil C, Garcia F, Rovira C, et al. (2009) Adenosine deaminase enhances T-cell response elicited by dendritic cells loaded with inactivated HIV. *Immunol Cell Biol* 87: 634–639. doi:10.1038/icb.2009.53.
22. Martinez-Navio JM, Climent N, Gallart T, Lluís C, Franco R (2011) An old enzyme for current needs: adenosine deaminase and a dendritic cell vaccine for HIV. *Immunology and Cell Biology*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21931337>. Accessed 8 November 2011.
23. Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245–252. doi:10.1038/32588.
24. Lanzavecchia A, Sallusto F (2001) Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106: 263–266.
25. Macagno A, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F (2007) Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol* 28: 227–233. doi:10.1016/j.it.2007.03.008.
26. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M (2005) Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6: 280–286. doi:10.1038/ni1165.
27. Pulendran B, Tang H, Manicassamy S (2010) Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol* 11: 647–655. doi:10.1038/ni.1894.
28. Ohta A, Sitkovsky M (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414: 916–920. doi:10.1038/414916a.
29. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, et al. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204: 1257–1265. doi:10.1084/jem.20062512.
30. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu J-M (2004) Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* 10: 1359–1365. doi:10.1038/nm1147.

31. García F, Climent N, Assoumou L, Gil C, González N, et al. (2011) A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection. *J Infect Dis* 203: 473–478. doi:10.1093/infdis/jiq077.
32. Banchereau J, Palucka AK (2005) Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5: 296–306. doi:10.1038/nri1592.
33. Gallois A, Bhardwaj N (2010) A needle in the “cancer vaccine” haystack. *Nat Med* 16: 854–856. doi:10.1038/nm0810-854.
34. Morelli AE, Thomson AW (2007) Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7: 610–621. doi:10.1038/nri2132.
35. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, et al. (2006) Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 7: 265–273. doi:10.1038/ni1307.
36. Cheong C, Matos I, Choi J-H, Dandamudi DB, Shrestha E, et al. (2010) Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143: 416–429. doi:10.1016/j.cell.2010.09.039.
37. León B, Ardavin C (2008) Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol Cell Biol* 86: 320–324. doi:10.1038/icb.2008.14.
38. Franco R, Canela EI, Bozal J (1986) Heterogeneous localization of some purine enzymes in subcellular fractions of rat brain and cerebellum. *Neurochem Res* 11: 423–435.
39. Rodríguez-García M, Climent N, Oliva H, Casanova V, Franco R, et al. (2010) Increased alpha-defensins 1-3 production by dendritic cells in HIV-infected individuals is associated with slower disease progression. *PLoS ONE* 5: e9436. doi:10.1371/journal.pone.0009436.
40. Climent N, Guerra S, García F, Rovira C, Miralles L, et al. (2011) Dendritic Cells Exposed to MVA-Based HIV-1 Vaccine Induce Highly Functional HIV-1-Specific CD8+ T Cell Responses in HIV-1-Infected Individuals. *PLoS ONE* 6: e19644. doi:10.1371/journal.pone.0019644.
41. Blanco J, Barretina J, Clotet B, Esté JA (2004) R5 HIV gp120-mediated cellular contacts induce the death of single CCR5-expressing CD4 T cells by a gp41-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 76: 804–811. doi:10.1189/jlb.0204100.
42. Lee AW, Truong T, Bickham K, Fonteneau J-F, Larsson M, et al. (2002) A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 20 Suppl 4: A8–A22.
43. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, et al. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767–811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
44. Kruse M, Rosorius O, Krätzer F, Bevec D, Kuhnt C, et al. (2000) Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J Exp Med* 191: 1581–1590.
45. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, et al. (1995) Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270: 1811–1815.
46. Eltzschig HK, Faigle M, Knapp S, Karhausen J, Ibla J, et al. (2006) Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood* 108: 1602–1610. doi:10.1182/blood-2006-02-001016.

47. Hashikawa T, Hooker SW, Maj JG, Knott-Craig CJ, Takedachi M, et al. (2004) Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. *FASEB J* 18: 131–133. doi:10.1096/fj.03-0011fje.
48. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA (2005) Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5: 617–628. doi:10.1038/nri1670.
49. Scandella E, Men Y, Gillessen S, Förster R, Groettrup M (2002) Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 100: 1354–1361. doi:10.1182/blood-2001-11-0017.
50. Laforge M, Campillo-Gimenez L, Monceaux V, Cumont M-C, Hurtrel B, et al. (2011) HIV/SIV Infection Primes Monocytes and Dendritic Cells for Apoptosis. *PLoS Pathog* 7: e1002087. doi:10.1371/journal.ppat.1002087.
51. Baratelli F, Krysan K, Heuzé-Vourc'h N, Zhu L, Escudero B, et al. (2005) PGE2 confers survivin-dependent apoptosis resistance in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 78: 555–564. doi:10.1189/jlb.1004569.
52. Parish ST, Kim S, Sekhon RK, Wu JE, Kawakatsu Y, et al. (2010) Adenosine deaminase modulation of telomerase activity and replicative senescence in human CD8 T lymphocytes. *J Immunol* 184: 2847–2854. doi:10.4049/jimmunol.0903647.
53. Longhi MP, Wright K, Lauder SN, Nowell MA, Jones GW, et al. (2008) Interleukin-6 Is Crucial for Recall of Influenza-Specific Memory CD4+ T Cells. *PLoS Pathog* 4: e1000006. doi:10.1371/journal.ppat.1000006.
54. Frick J-S, Grünebach F, Autenrieth IB (2010) Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int J Med Microbiol* 300: 19–24. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.010.
55. Pasare C, Medzhitov R (2003) Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299: 1033–1036. doi:10.1126/science.1078231.
56. Shen H, Goldstein DR (2009) IL-6 and TNF-alpha synergistically inhibit allograft acceptance. *J Am Soc Nephrol* 20: 1032–1040. doi:10.1681/ASN.2008070778.
57. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A (2000) The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18: 593–620. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.593.
58. Panther E, Idzko M, Herouy Y, Rheinen H, Gebicke-Haerter PJ, et al. (2001) Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J* 15: 1963–1970. doi:10.1096/fj.01-0169com.
59. Schnurr M, Toy T, Shin A, Hartmann G, Rothenfusser S, et al. (2004) Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 103: 1391–1397. doi:10.1182/blood-2003-06-1959.
60. Panther E, Corinti S, Idzko M, Herouy Y, Napp M, et al. (2003) Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* 101: 3985–3990. doi:10.1182/blood-2002-07-2113.
61. Desrosiers MD, Cembrola KM, Fakir MJ, Stephens LA, Jama FM, et al. (2007) Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *J Immunol* 179: 1884–1892.
62. Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Matafonov A, Biaggioni I, et al. (2009) Differential role of the carboxy-terminus of the A(2B) adenosine receptor in stimulation of

adenylate cyclase, phospholipase C β , and interleukin-8. *Purinergic Signal* 5: 289–298. doi:10.1007/s11302-008-9129-8.

63. Wilson JM, Kurtz CC, Black SG, Ross WG, Alam MS, et al. (2011) The A2B Adenosine Receptor Promotes Th17 Differentiation via Stimulation of Dendritic Cell IL-6. *J Immunol* 186: 6746–6752. doi:10.4049/jimmunol.1100117.
64. Weihofen WA, Liu J, Reutter W, Saenger W, Fan H (2004) Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface. *J Biol Chem* 279: 43330–43335. doi:10.1074/jbc.M405001200.
65. Fan H, Tansi FL, Weihofen WA, Böttcher C, Hu J, et al. (2012) Molecular mechanism and structural basis of interactions of dipeptidyl peptidase IV with adenosine deaminase and human immunodeficiency virus type-1 transcription transactivator. *Eur J Cell Biol* 91: 265–273. doi:10.1016/j.ejcb.2011.06.001.
66. Richard E, Alam SM, Arredondo-Vega FX, Patel DD, Hershfield MS (2002) Clustered charged amino acids of human adenosine deaminase comprise a functional epitope for binding the adenosine deaminase complexing protein CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* 277: 19720–19726. doi:10.1074/jbc.M111901200.
67. Ishii T, Ohnuma K, Murakami A, Takasawa N, Kobayashi S, et al. (2001) CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12138–12143. doi:10.1073/pnas.211439098.
68. Piercy J, Petrova S, Tchilian EZ, Beverley PCL (2006) CD45 negatively regulates tumour necrosis factor and interleukin-6 production in dendritic cells. *Immunology* 118: 250–256. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02363.x.
69. Montoya M, Dawes R, Reid D, Lee LN, Piercy J, et al. (2006) CD45 is required for type I IFN production by dendritic cells. *Eur J Immunol* 36: 2150–2158. doi:10.1002/eji.200535304.
70. Cross JL, Kott K, Miletic T, Johnson P (2008) CD45 Regulates TLR-Induced Proinflammatory Cytokine and IFN- β Secretion in Dendritic Cells. *J Immunol* 180: 8020–8029.
71. Chaudhry A, Das SR, Hussain A, Mayor S, George A, et al. (2005) The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *J Immunol* 175: 4566–4574.
72. Klein SA, Dobmeyer JM, Dobmeyer TS, Pape M, Ottmann OG, et al. (1997) Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *AIDS* 11: 1111–1118.
73. Suchard MS, Mayne E, Green VA, Shalekoff S, Donninger SL, et al. (2010) FOXP3 expression is upregulated in CD4T cells in progressive HIV-1 infection and is a marker of disease severity. *PLoS ONE* 5: e11762. doi:10.1371/journal.pone.0011762.
74. Nikolova M, Carriere M, Jenabian M-A, Limou S, Younas M, et al. (2011) CD39/Adenosine Pathway Is Involved in AIDS Progression. *PLoS Pathog* 7: e1002110. doi:10.1371/journal.ppat.1002110.
75. Berger EA, Murphy PM, Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17: 657–700. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.657.

76. Rollenhagen C, Asin SN (2010) IL-8 decreases HIV-1 transcription in peripheral blood lymphocytes and ectocervical tissue explants. *J Acquir Immune Defic Syndr* 54: 463–469. doi:10.1097/QAI.0b013e3181e5e12c.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. ADA enhances CD83, CD80 and CD86 expression on iDCs.

iDCs, obtained as indicated in Materials and Methods, were cultured for 48 h in medium in the absence (-ADA) or in the presence (+ADA) of 2 μ M ADA or in the presence of maturing cocktail (mDCs). Expression of CD83 (A and B), CD80 (C and D) or CD86 (E and F) in the DCs gate was assessed by flow cytometry. In A, C and E, histogram overlays and the percentage of positive cells (A and B) or geometric mean (C) for a representative healthy donor and HIV-infected subject are shown. In B, D and F, values obtained from 16 to 19 healthy donors (circles) or 12 to 16 HIV-infected individuals (triangles) in the absence (open symbols) or in the presence (filled symbols) of 2 μ M ADA are plotted. Each pair of linked symbols represents results from a particular individual. * P < 0.05; *** P < 0.001.

Figure 2. ADA effect on CD40 and HLA expression on iDCs

iDCs, obtained as indicated in Materials and Methods, were cultured for 48h in medium in the absence (-ADA) or in the presence (+ADA) of 2 μ M ADA or in the presence of maturing cocktail (mDCs). Expression of HLA-DR (A and B), HLA-ABC (C and D) or CD40 (E and F) in the DCs gate was measured by flow cytometry. In A, C and E, histogram overlays and the geometric mean from a representative healthy donor and HIV-infected patient are shown. In B, D and F, values obtained from 6 to 10 healthy donors (circles) or 9 to 10 HIV-infected subjects (triangles) in absence (open symbols) or in presence (filled symbols) of 2 μ M ADA. Values obtained from 6 to 10 healthy donors (circles) or 9 to 10 HIV-infected subjects (triangles). * P < 0.05.

Figure 3. ADA increases cytokines and chemokines secretion.

iDCs, obtained as indicated in Materials and Methods, from 9 healthy (circles) and 8 HIV-infected (triangles) donors were cultured during 48 h in medium in the absence (iDCs) or in the presence of 2 μ M ADA and the indicated cytokines and chemokines were determined in the supernatant as described in Materials and Methods. Values are expressed as the ratio (in-fold) of cytokine or chemokine levels obtained in presence of ADA versus levels obtained in absence

of ADA (iDCs, the reference value of 1 is represented by a dotted line). For each group, the median is indicated by a thick line. **P* <0.05; ***P* <0.01 respect to iDCs.

Figure 4. Enzymatic and non-enzymatic activities are implicated on ADA-mediated effects.

iDCs, obtained as indicated in Materials and Methods, from 4 to 8 healthy donors were cultured for 48 h in medium in the absence (iDC) or in the presence of 2 μ M ADA (+ADA) or 2 μ M HgCl₂ inactivated ADA (ADA-Hg) or iDCs were pre-incubated with the mAb anti-CD26 TA5.9 and incubated with 2 μ M ADA (ADA+TA5.9). In (A) and (B), the expression of CD83 and CD80 was assessed in the DCs gate by flow cytometry. In C) the indicated cytokines and chemokines were determined in the supernatants after 48 h of cell culture. Each pair of linked symbols represents results from a particular individual. Results are expressed as the ratio (in-fold) of the values obtained in presence of ADA, ADA-Hg or ADA+TA5.9 versus untreated cells (iDCs, the reference value of 1 is represented by a dotted line). **P* <0.05; ***P* <0.01 respect to iDCs

Figure 5. ADA enhances DCs immunogenicity in iDC-T-cell Allogeneic cocultures.

In A and B, iDCs, obtained as described in Materials and Methods, from a representative healthy donor were cultured during 48 h in medium in the absence of ADA (iDCs), in the presence of 2 μ M ADA (iDCs + ADA) or in the presence of maturing cocktail (mDCs). DCs were washed and cocultured with allogeneic (upper contour plots) or autologous (lower contour plots) T-cells (1:20 DCs:T-cells ratio). After 7 days, the percentage of CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T-cell proliferation was assessed by flow cytometry using the CFSE method. In (C) percentages of CD4⁺ (circles) and CD8⁺ (squares) T-cell proliferation in absence (open symbols) or presence (filled symbols) of 2 μ M ADA in allogeneic cocultures from 6 to 7 healthy donors are shown. Each pair of linked symbols represents results from a particular healthy donor. **P* <0.05. In (D) bars indicate IFN- γ , IL-4 and IL-17 levels in ADA-treated iDC co-culture supernatants. Results are the mean \pm SD (pg/ml) of 3 independent experiments.

Figure 6. Effect of ADA on CCR7 expression and iDC migration.

iDCs, obtained as described in Materials and Methods, from healthy donors were cultured during 48 h in medium in the absence (-ADA) or in the presence (+ADA) of 2 μ M ADA or in the

presence of maturing cocktail (mDCs). In (A) and (B), CCR7 expression in the CD40⁺ DCs gate was measured by flow cytometry. Histogram overlays and the percentage of CCR7 expression for a representative donor are shown in (A). Values obtained from 7 healthy donors in the absence (open symbols) or in the presence (filled symbols) of 2 μ M ADA are shown in (B). In (C) and (D), CCL19/CCL21 chemokine-induced migration assays were performed as described in Materials and Methods. The percentage of cell migration to CCL19 (C) or CCL21 (D) in the absence (-ADA) or in the presence (+ADA) of 2 μ M ADA or in the presence of maturing cocktail (mDCs), in relation to the initial cell input is shown. * P < 0.01, *** P < 0.001

Figure 7. Effect of ADA on the iDCs viability

iDCs, obtained as described in Materials and Methods, from healthy or HIV-infected donors were cultured during 48 h in the absence (-ADA) or in the presence (+ADA) of 2 μ M ADA. Cell viability was assessed through DIOC₆ and propidium iodide (PI) staining and measured by flow cytometry. In (A), contour plots showing the percentage of viable (bright DIOC₆ and negative propidium iodide staining), apoptotic (low DIOC₆ and negative propidium iodide staining) and necrotic (low DIOC₆ and positive propidium iodide staining) populations from a representative healthy or HIV-infected donor are shown. Percentage of viable (B), apoptotic (C) and necrotic (D) DCs from 7 different healthy and 6 HIV-infected donors are shown. * P < 0.05.

Supplemental Figure S1. ADA dose-response in CD80/83 expression and cytokine secretion.

iDCs, obtained as indicated in Materials and Methods, were cultured for 48h in medium in the absence (iDC) or in the presence of 1, 2, 4 or 6 μ M ADA (+ADA) and the expression of CD83 (A) or CD80 (B) was addressed by flow cytometry in the DCs gate. Bars indicating the mean \pm SEM of 2 independent experiments are shown. In (C) the indicated cytokines and chemokines were determined in the supernatant from iDCs cultured in the absence (iDCs) or in the presence of 1, 2, 4 μ M ADA or in the presence of the maturing cocktail (mDCs). Bars indicating the mean and SEM of 4 different experiments are shown. Values are expressed as the ratio (in-fold) of CD83, CD80 or cytokine/chemokine levels obtained in presence of ADA or mDCs versus levels obtained in absence of ADA (iDCs, the reference value of 1 is represented by a dotted line).

Supplemental Figure S2. CD80 and CD83 expression on iDCs from HIV-infected subjects according to different clinical parameters.

iDCs from HIV-infected subjects were cultured for 48 h in medium in the absence (-ADA) or in the presence of 2 μ M ADA (+ADA) and the expression of CD83 and CD80 was addressed by flow cytometry. Patients were separated according to receiving HAART or not (A), having undetectable (<DL) or detectable viral load (>DL) (B), being above or below 600 CD4⁺/ μ L (C) or above or below 900 CD8⁺/ μ L (D). . **P* <0.05, ***P* <0.01.

Supplemental Figure S3. Correlation of ADA effect on CD83, CD80 and CD86 expression on iDCs from HIV subjects with different clinical parameters.

iDCs from HIV-infected subjects were cultured for 48 h in medium in the absence (-ADA) or in the presence of 2 μ M ADA (+ADA) and the expression of CD83, CD80 and CD86 was addressed by flow cytometry. The % of ADA increase on the expression of each marker was obtained by subtracting the percentage of expression in the absence of ADA from the the percentage of expression in the presence of ADA. These values for CD83 (Left column), CD80 (middle column) and CD86 (right column) were then correlated with patient's viral load (A), CD4⁺ cell counts (B), CD4⁺ Nadir (C) and CD8⁺ cell counts (D). Spearman correlation test was applied.

Supplemental Figure S4. mDCs viability.

iDCs, obtained as described in Materials and Methods, from healthy or HIV-infected donors were cultured during 48 h in presence of a maturing cocktail (mDCs). Cell viability was assessed through DIOC₆ and propidium iodide (PI) staining and measured by flow cytometry. In A, contour plots showing the percentage of viable (bright DIOC₆ and negative propidium iodide staining), apoptotic (low DIOC₆ and negative propidium iodide staining) and necrotic (low DIOC₆ and positive propidium iodide staining) populations from a representative healthy or HIV-infected donor are shown. Percentage of viable (B), apoptotic (C) and necrotic (D) DCs from 4 different healthy and 6 HIV-infected donors are shown.

Table 1, Clinical information of patients with HIV-1

Patients Receiving HAART (n=11)									
Sex	Age	VL*	T CD4		T CD4 Nadir		T CD8		Progression
			cells/ μ L	%	cells/ μ L	%	cells/ μ L	%	
M	48	<DL	582	28	255	28	882	42	NC
M	68	<DL	565	24	277	14	1354	66	NC
M	33	<DL	1075	34	396	16	1458	45	VC
M	40	<DL	666	42	537	30	458	21	NC
M	63	<DL	539	23	266	20	1174	51	NC
M	40	<DL	671	22	243	19	1456	47	NC
F	51	<DL	342	11	332	10	2533	79	VC
F	59	<DL	1245	41	185	35	1435	48	NC
F	44	<DL	625	37	274	28	809	48	NC
M	35	2,7	764	45	365	26	673	40	NC
M	37	2,7	1193	31	783	29	2297	59	VC
Mean		2,7	751,5	30,7	355,7	23,2	1320,8	49,6	
SD			291,4	10,3	170,5	7,8	641,4	14,9	

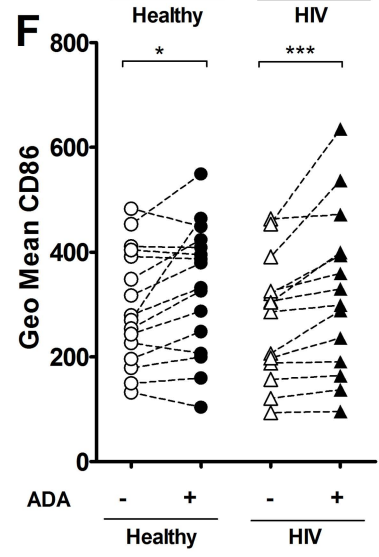
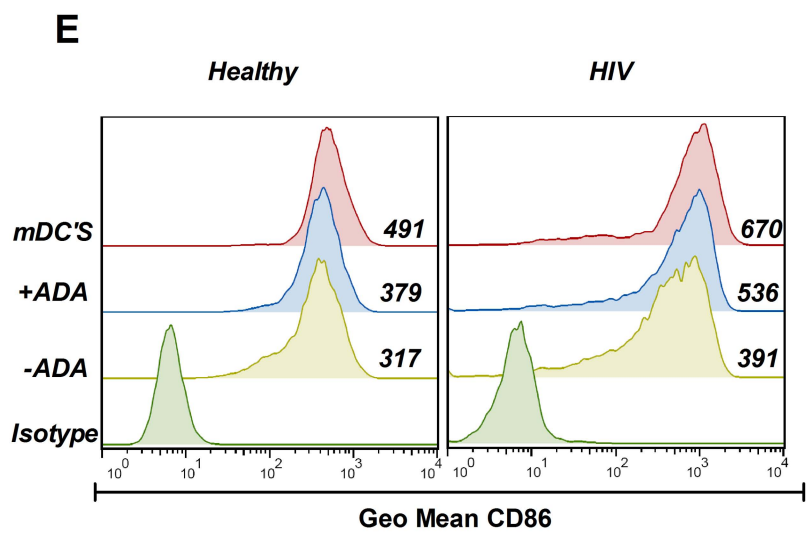
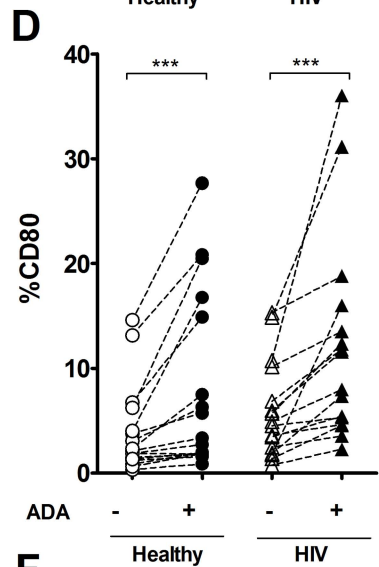
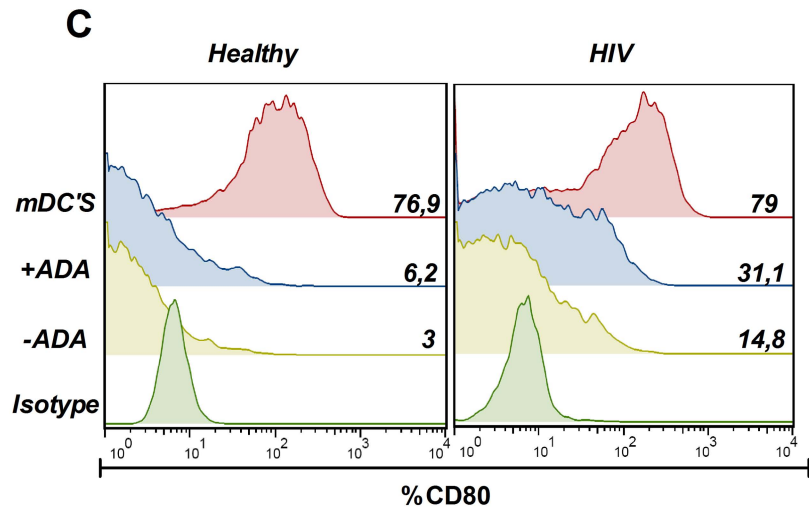
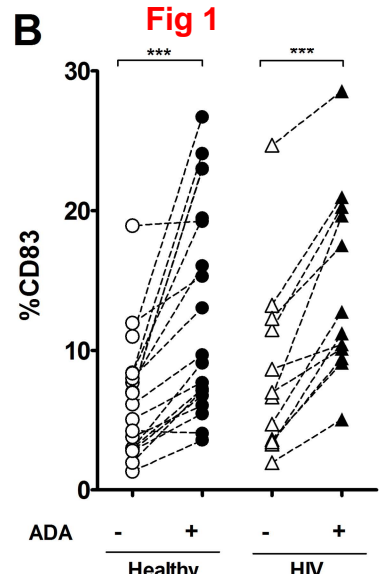
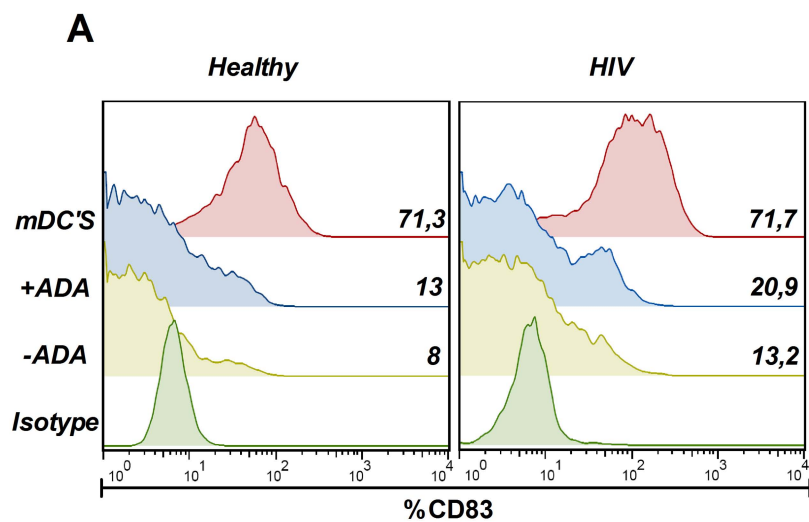
Patients Not Receiving HAART (n=11)									
Sex	Age	VL*	T CD4		T CD4 Nadir		T CD8		Progression
			cells/ μ L	%	cells/ μ L	%	cells/ μ L	%	
M	60	<DL	420	16	420	16	1182	45	VC
M	65	1,6	512	26	504	28	874	44	EC
F	54	1,9	540	20	451	19	854	52	EC
M	48	2,1	876	31	823	30	1355	48	VC
M	36	3,1	576	32	197	30	1332	59	VC
M	34	3,2	519	25	406	29	1148	55	NC
M	31	3,4	480	30	480	30	76	48	VC
M	35	3,4	660	22	452	16	1368	46	NC
F	47	3,4	844	47	702	44	638	35	EC
M	35	3,5	880	40	867	36	1582	48	N/A
M	41	3,5	664	30	537	17	979	44	NC
Mean		2,9	633,7	29,0	530,8	26,8	1035,3	47,6	
SD		0,8	165,7	8,9	195,7	9,0	421,2	6,3	

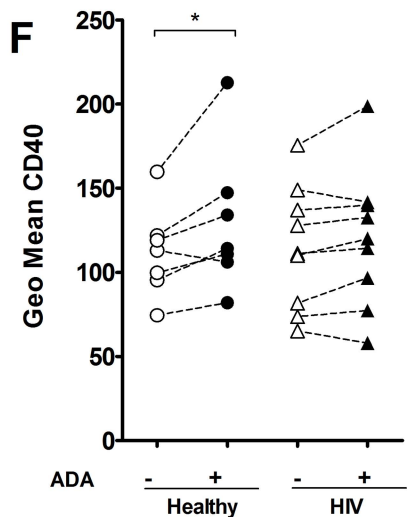
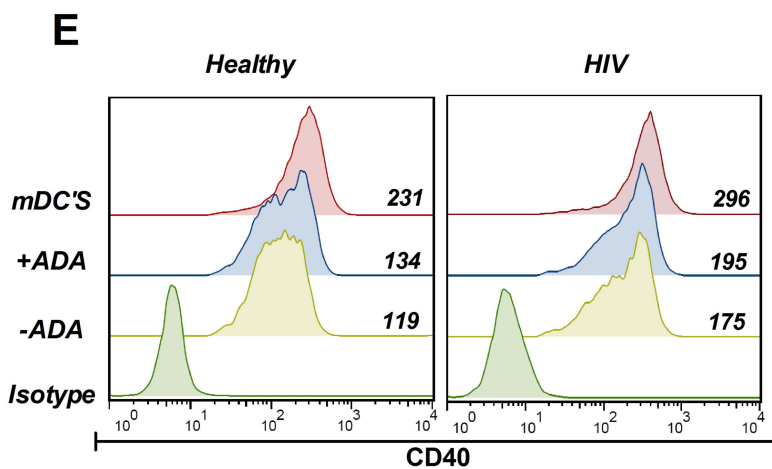
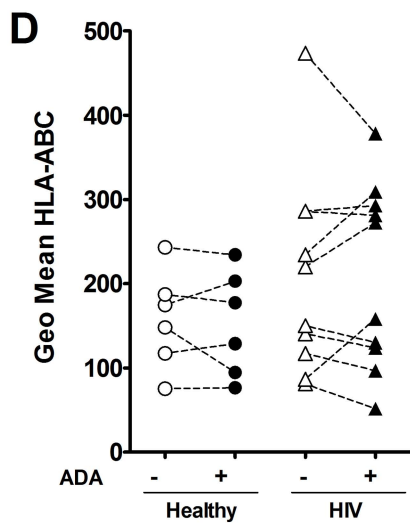
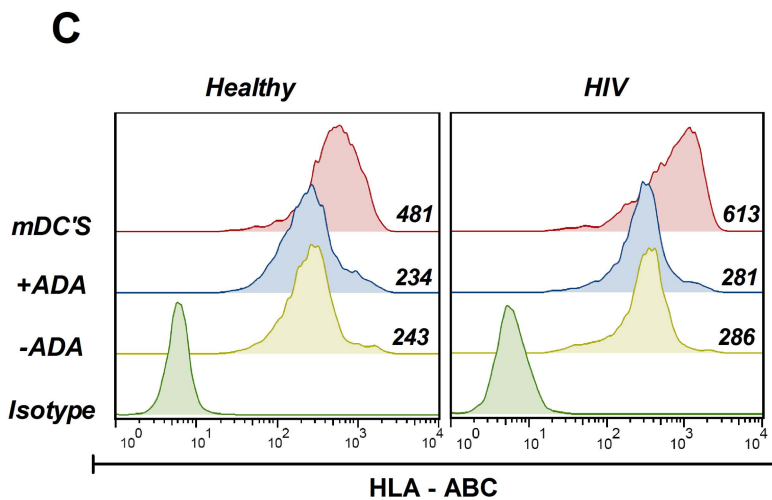
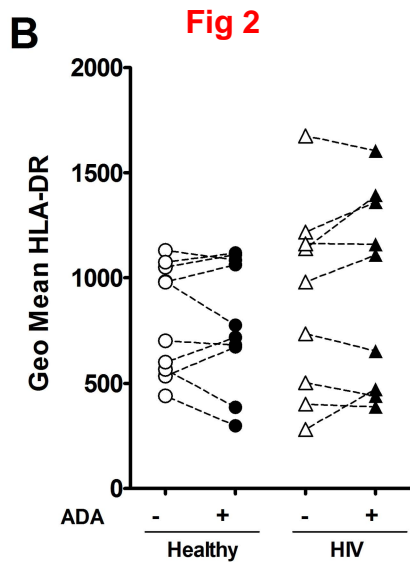
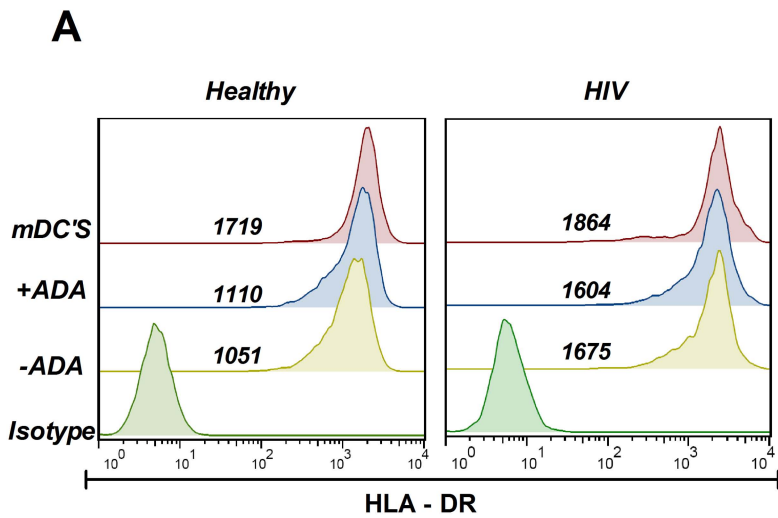
*VL is expressed as log viral copies/ml

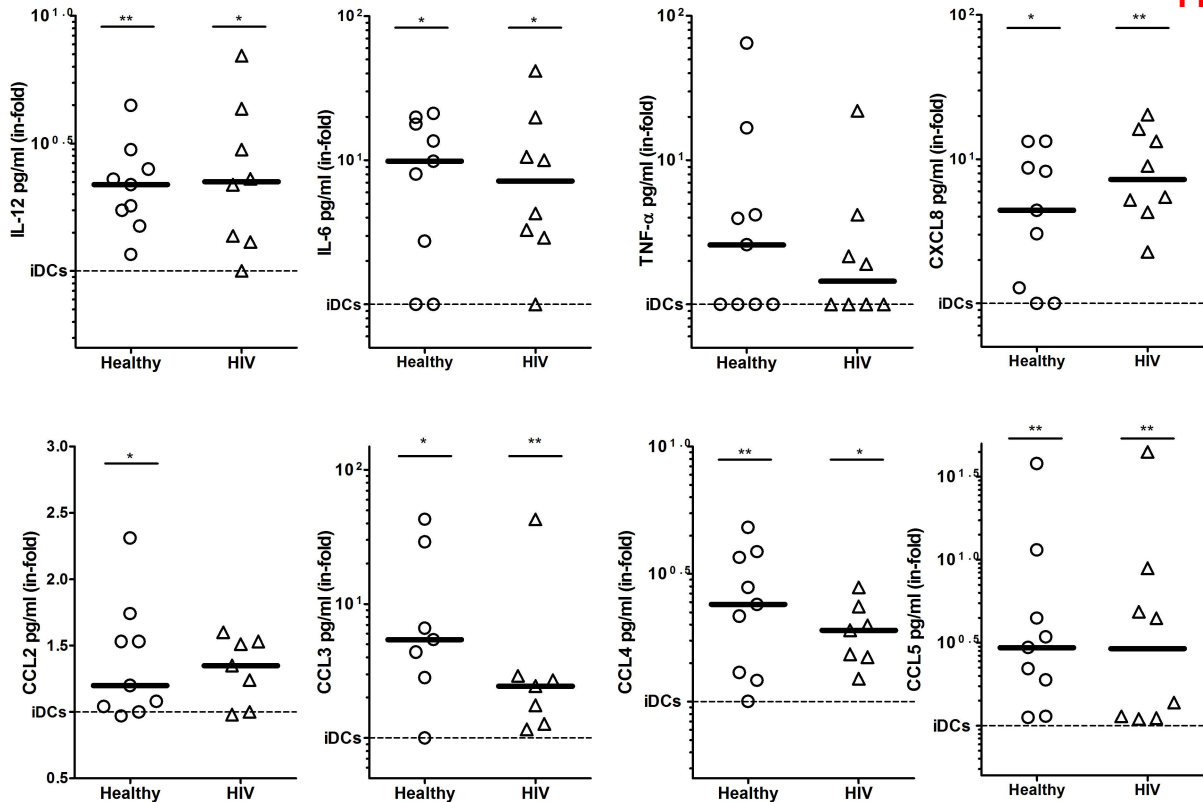
NC: Non controller

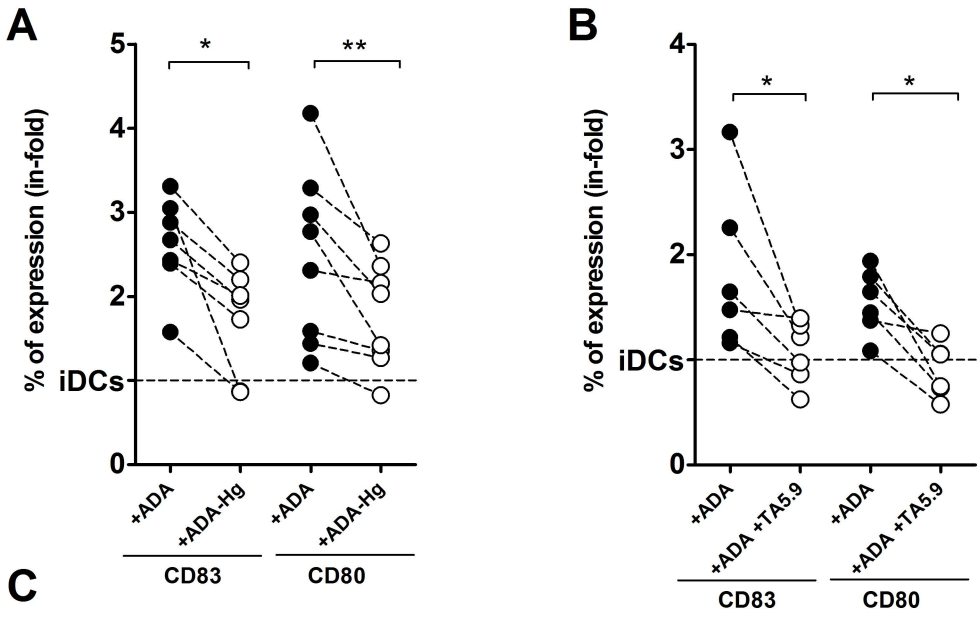
VC: Viremic Controller

EC: Elite Controller

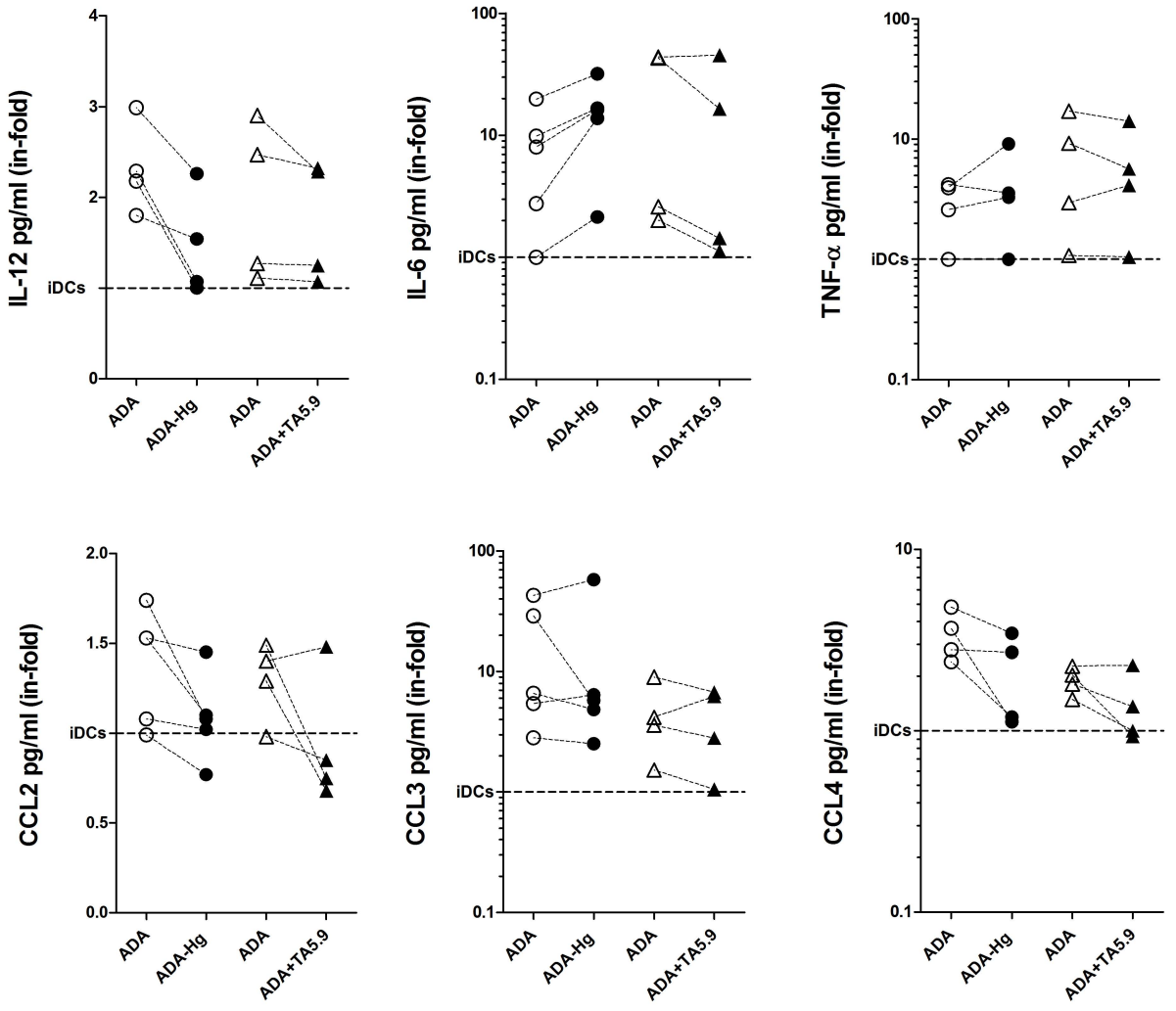


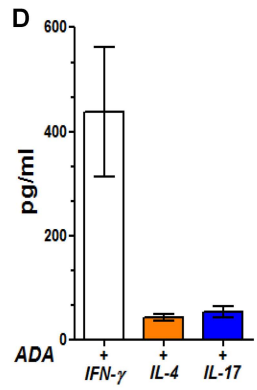
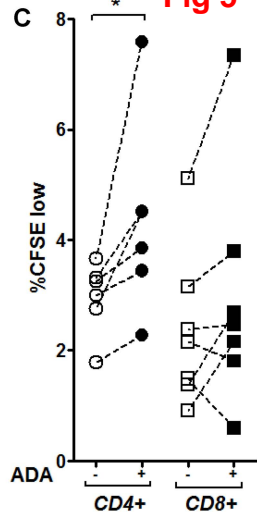
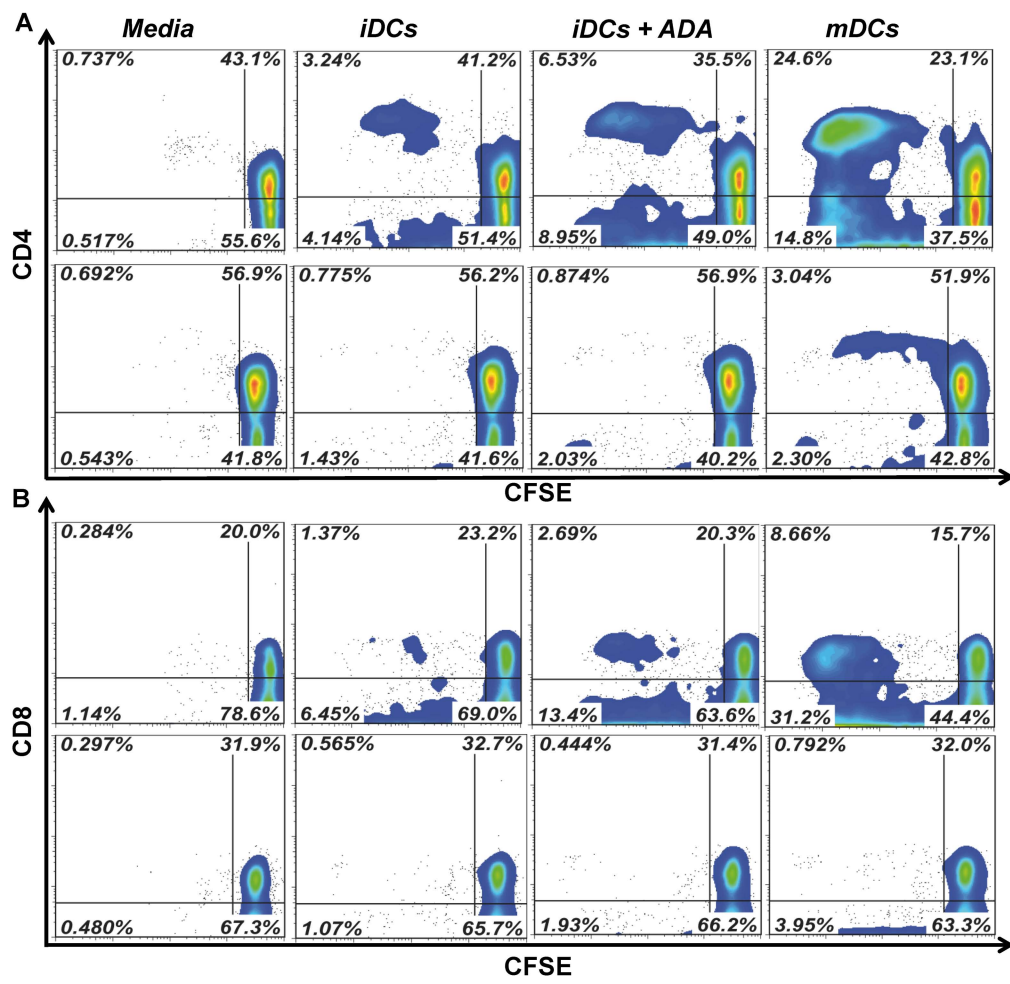




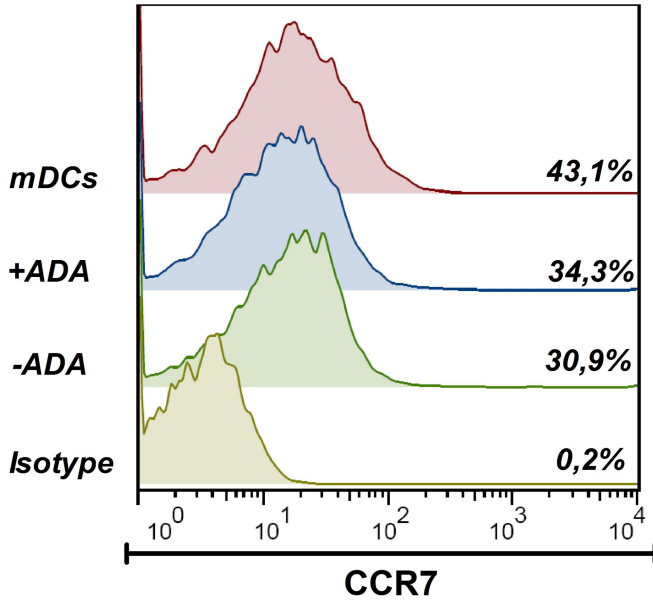


C

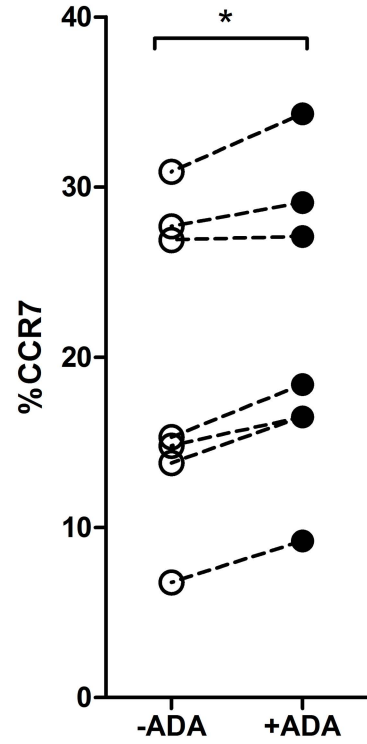




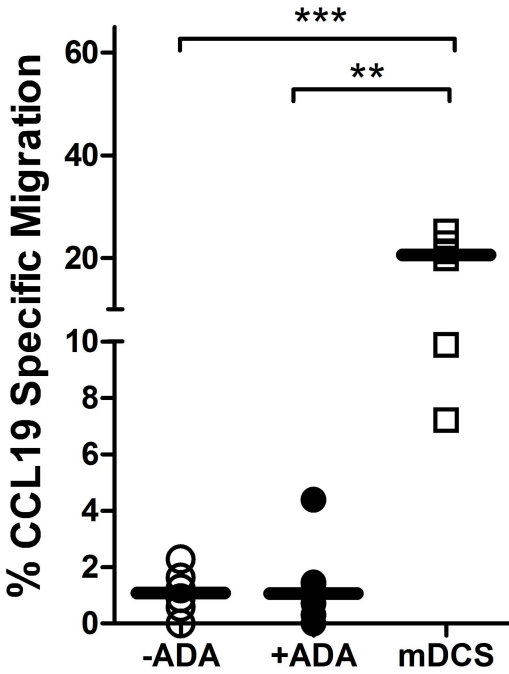
A



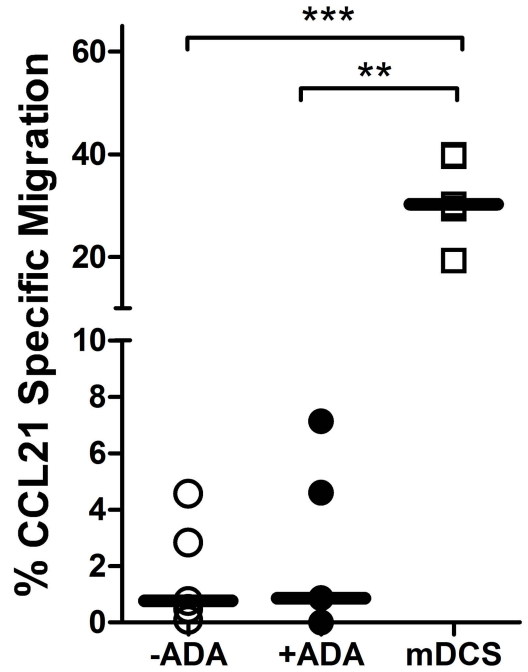
B

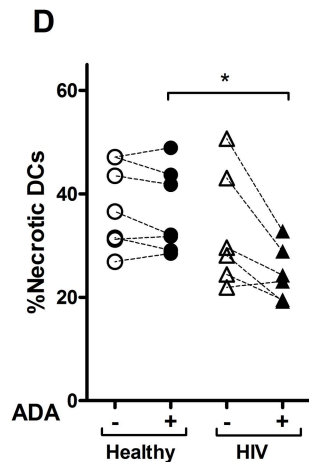
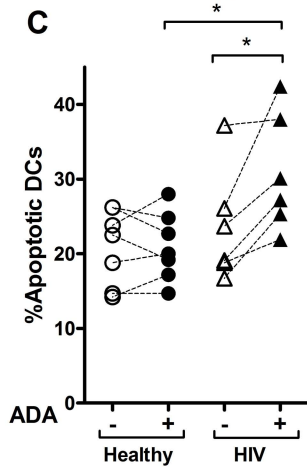
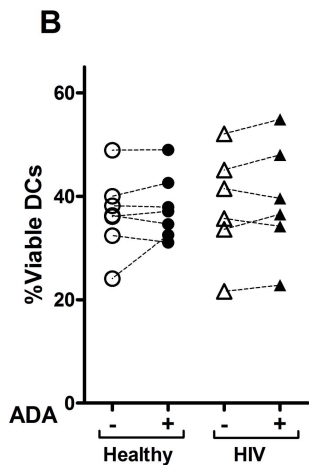
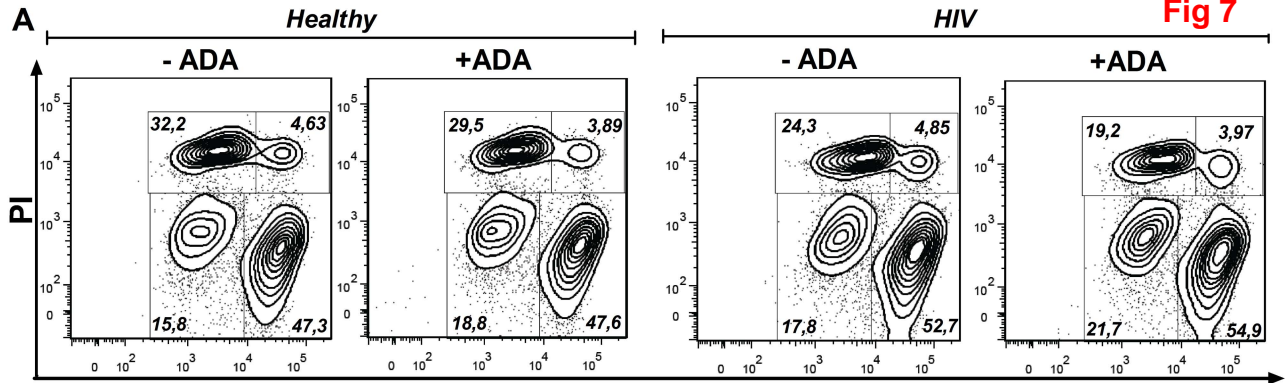


C

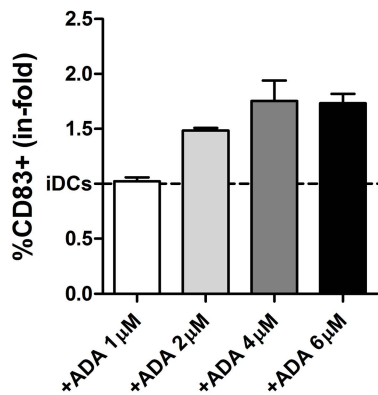


D

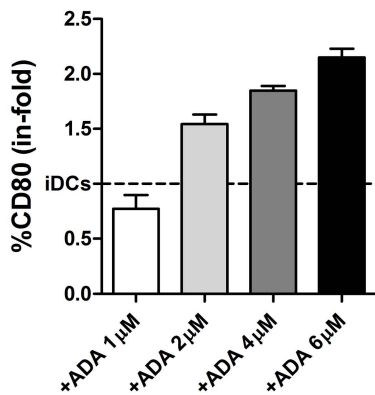




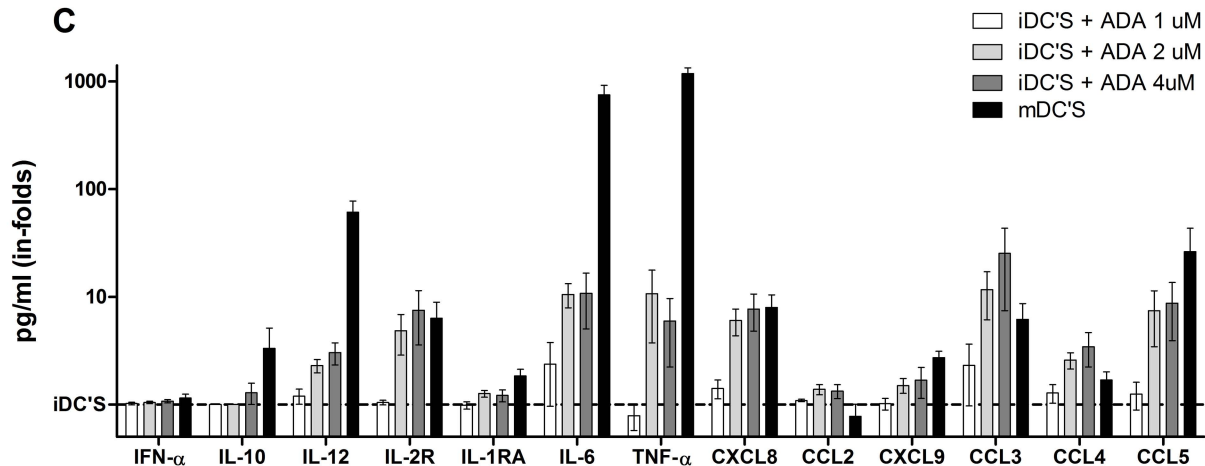
A

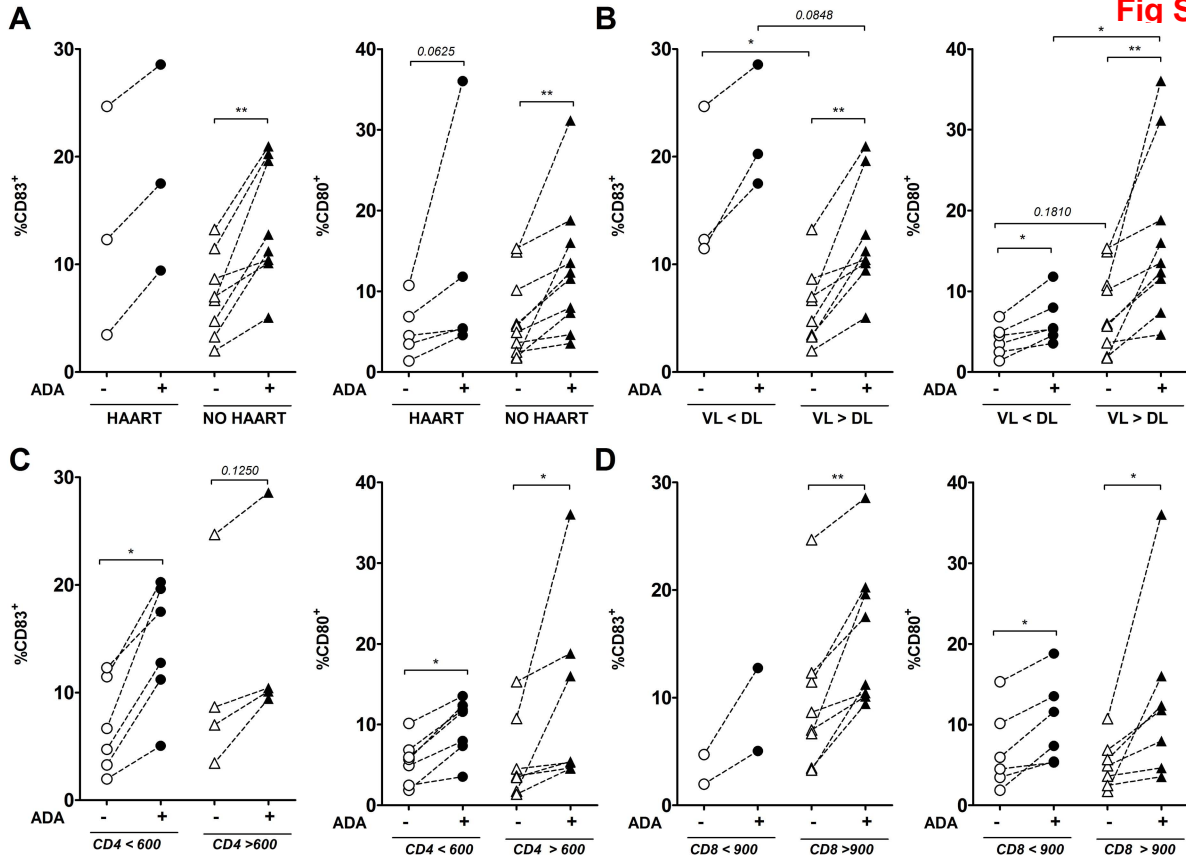


B

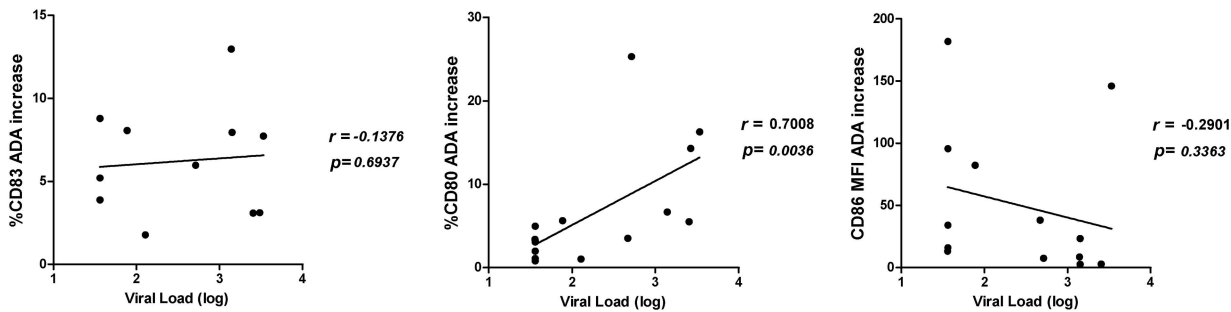


C

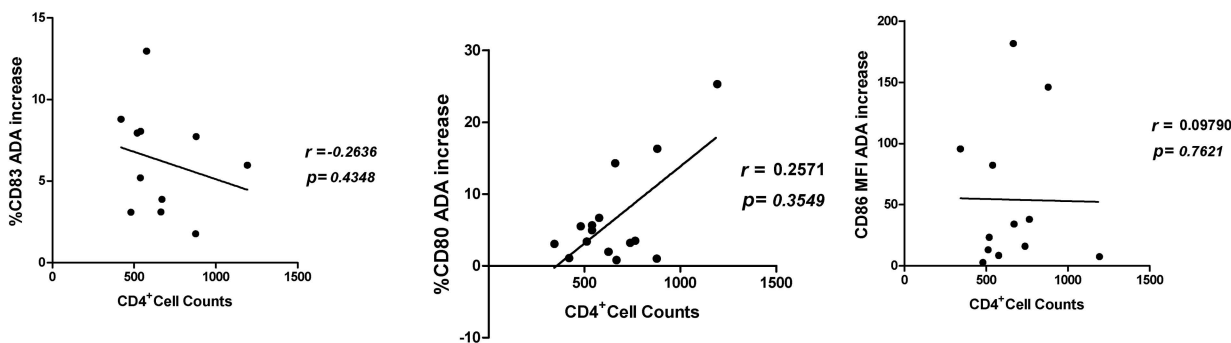




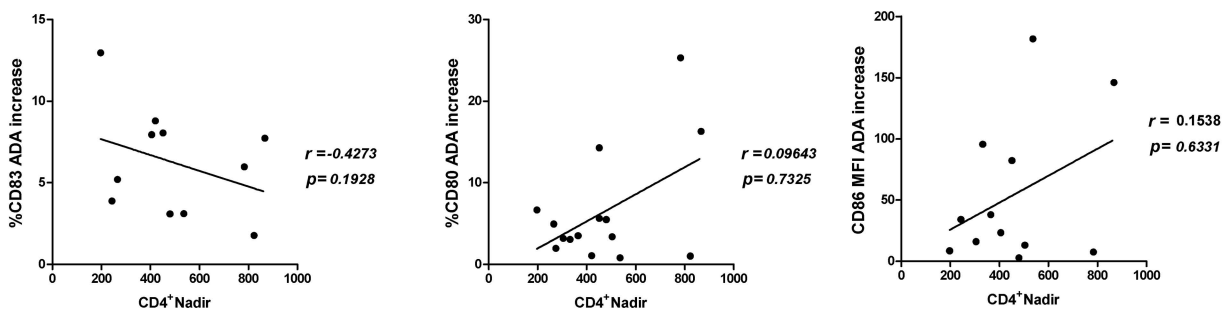
A



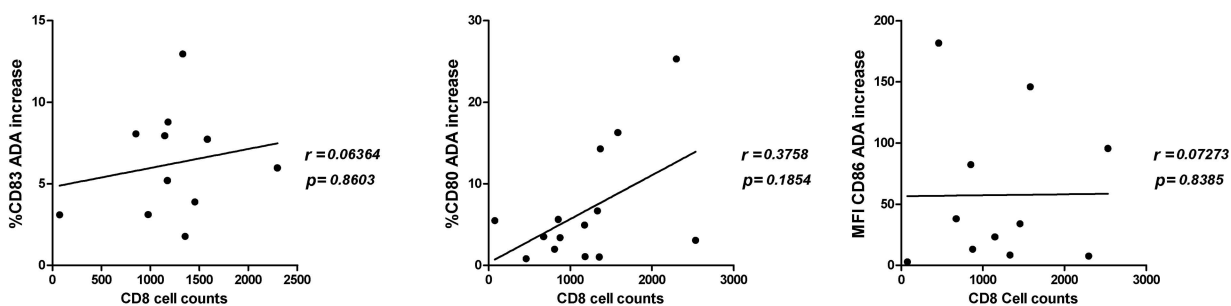
B

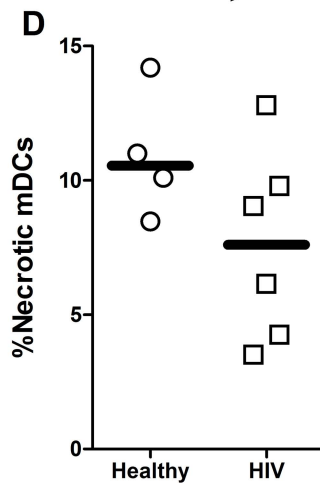
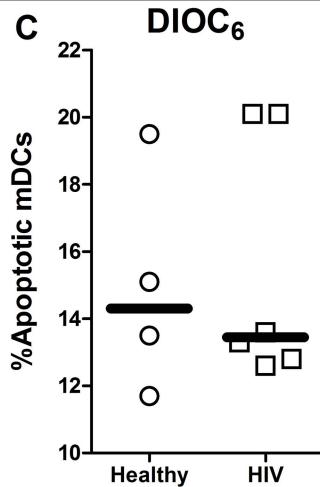
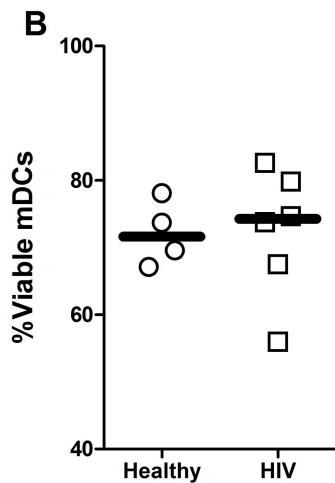
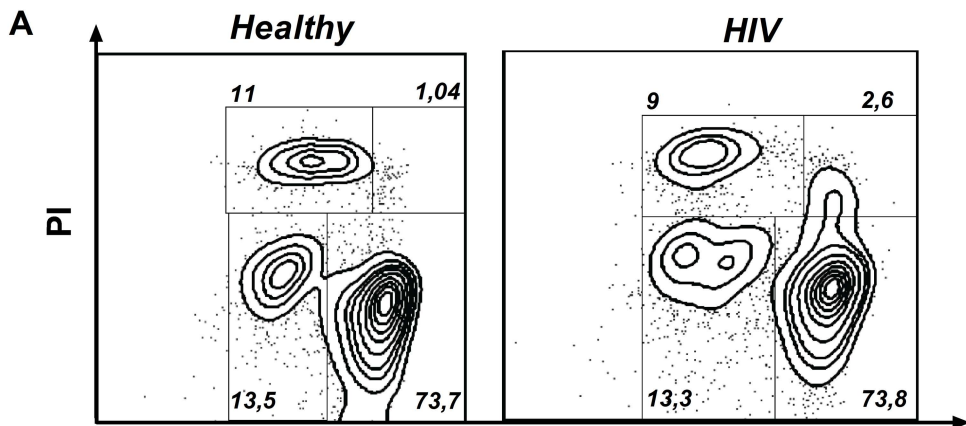


C



D





Resultats 3.2: L'adenosina desaminasa potencia la generació de cèl·lules T CD4⁺ efectores, reguladores i memòria.

José M. Martínez-Navio,^{*1} Víctor Casanova,^{*1} Rodrigo Pacheco,^{†,‡} Isaac Naval-Macabuhay,^{*} Núria Climent,[§] Felipe Garcia,[¶] Jose' M. Gatell,[¶] Josefa Mallol,^{*} Teresa Gallart,[§] Carme Lluís,^{*} and Rafael Franco^{*2}

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, §Services of Immunology and Infectious Diseases & AIDS Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), and ¶ HIVACAT, Hospital Clínic, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Spain; †Fundación Ciencia para la Vida and Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada, Santiago, Chile; and ‡Universidad San Sebastián, Chile.

Degut a la interacció amb el CD26 a la superfície de la cèl·lula T CD4⁺ i amb el receptor A_{2B} a la superfície de la cèl·lula dendrítica, l'ADA desencadena una senyal coestimuladora per a les cèl·lules T humanes. L'objectiu d'aquest treball va ser investigar si el coestímul mitjançat per l'ADA participa en l'activació i diferenciació de les cèl·lules T. Els resultats demostren que de forma independent a la seva activitat enzimàtica i depenent del increment en la lliberació d'IL-6, TNF- α i IFN- γ , l'ADA incrementa la diferenciació de cèl·lules T CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ *Naïve* cap a cèl·lules CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ efectores i CD4⁺ CD45RA⁻ CD45RO⁺ memòria. A més, l'ADA incrementa la generació de cèl·lules CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺, fenotip de Tregs, mitjançant un mecanisme on l'activitat de l'ADA hi està implicada. Aquests increments en la generació de cèl·lules efectores memòria i reguladores s'observa també en cèl·lules de pacients infectats pel VIH. Aquestes dades suggereixen que l'ADA és un modulador important en l'activació i diferenciació de les cèl·lules T CD4⁺, fins i tot en cèl·lules d'individus immunològicament compromesos.

Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory, and regulatory CD4⁺ T cells

José M. Martínez-Navio,^{*,1} Víctor Casanova,^{*,1} Rodrigo Pacheco,^{†,‡} Isaac Naval-Macabuhay,^{*} Núria Climent,^{§,11} Felipe García,^{11,¶} José M. Gatell,^{11,¶} Josefa Mallol,^{*} Teresa Gallart,^{§,11} Carme Lluís,^{*} and Rafael Franco^{*,2}

^{*}Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, [§]Services of Immunology and Infectious Diseases & ¹¹AIDS Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), and [¶]HIVACAT, Hospital Clínic, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Spain; [†]Fundación Ciencia para la Vida and Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada, Santiago, Chile; and [‡]Universidad San Sebastián, Chile

RECEIVED OCTOBER 27, 2009; REVISED SEPTEMBER 10, 2010; ACCEPTED SEPTEMBER 20, 2010. DOI: 10.1189/jlb.1009696

ABSTRACT

By interacting with CD26 on the CD4⁺ T cell surface and with the AdoR A_{2B} on the DC surface, ADA triggers a costimulatory signal for human T cells. The aim of this study was to know whether ADA-mediated costimulation plays a role in the differentiation of T cells. The results show that irrespective of its enzymatic activity and dependent on TNF- α , IFN- γ , and IL-6 action, ADA enhanced the differentiation of CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ naïve T cells toward CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ T effs and CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ memory T cells. Furthermore, ADA potentiated generation of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs by a mechanism that seems to be mainly dependent on the enzymatic activity of ADA. Interestingly, an ADA-mediated increase on Teff, memory T cell, and Treg generation occurred, not only in cocultures from healthy individuals but also from HIV-infected patients. These data suggest that ADA is a relevant modulator of CD4⁺ T cell differentiation, even in cells from immunologically compromised individuals. *J. Leukoc. Biol.* **89**: 000–000; 2011.

Introduction

DCs are relevant APCs for activation of CD4⁺CD45RA⁺ naïve T cells and for their differentiation toward CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ T effs or CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs. Whereas T effs promote immunity against their cognate Ags, Tregs, by inhibiting function of T effs, play an important physiological role limiting the effector phase of T cell responses, maintaining self-tolerance, and pre-

venting autoimmunity [1, 2]. After a CD4⁺ T cell response, reactivated Ag-specific T cells, which are a part of the pool of CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ memory T cells [3, 4], coordinate a faster, stronger, and longer immune response [5, 6].

ADA, an enzyme involved in purine metabolism, catalyzes the hydrolytic deamination of Ado to inosine and ammonia. A congenital defect of ADA causes SCID, which is characterized by the absence of functional lymphocytes in affected individuals [7]. For many years, ADA was considered to be cytosolic, but it has been found on the cell surface of many cells. To date, it has been described that three different surface-anchoring proteins might mediate the binding of ecto-ADA to the cell surface, including the multifunctional protein CD26 and A₁R and A_{2B}R [8, 9]. A number of studies have evidenced that ADA, expressed on the cell surface, not only plays enzymatic activity-dependent functions, but also, it can trigger regulatory signals through its extraenzymatic properties [8, 9].

As a result of its enzymatic activity, ecto-ADA regulates the concentration of Ado available to bind to AdoRs [10]. Surface expression of AdoRs has been described in T cells [11–13] and in DCs [14–19]. In human T cells, the major AdoR expressed is the A_{2A}R [11–13], which is coupled with cAMP production. Elevated cAMP levels induce a marked impairment in T cell activation and IL-2 production [20], which promote anergy and tolerance in Th1 clones [21]. Accordingly, enzymatic activity of ecto-ADA decreases Ado levels available for stimulation of AdoRs expressed on the T cell surface, and this mechanism contributes to immune regulation [10, 22, 23].

During Ag presentation by DCs, T cell activation is subjected to regulation by several intercellular interactions mediated by surface and soluble molecules that stimulate their receptors expressed on T cells. These regulatory interactions might modulate the activation and differentiation of T cells. In this re-

Abbreviations: 3D=three-dimensional, ADA=adenosine deaminase, ADA-Hg=adenosine deaminase inhibited by HgCl₂, Ado=adenosine, A_nR=adenosine receptor *n*, FL1–3=fluorescence 1–3, Foxp3=forkhead box p3, iDC=immature DC, IQR=interquartile ranges, SEA=staphylococcal enterotoxin A, Teff=effector T cell, Treg=regulatory T cell

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

1. These authors contributed equally to this work.
2. Correspondence at current address: CIMA, University of Navarra, Avda Pio XII, 55, 31008 Pamplona. E-mail: rfranco@unav.es

gard, ADA, in a deaminase activity-independent way and by interacting with CD26 on the CD4⁺ T cell surface and with the A_{2B}R on the DC surface, triggers a strong costimulatory signal for T cell activation [14]. This ADA-mediated costimulation not only potentiates T cell proliferation but also the secretion of Th1 (IFN- γ) and proinflammatory (IL-6 and TNF- α) cytokines [8]. Importantly, we have recently described that this ADA-mediated costimulation is attenuated in CD4⁺ T cells obtained from HIV-infected individuals, which contributes to the immunodeficiency [24]. However, when exogenous ADA is added on a coculture of HIV-pulsed DCs and autologous T cells, it is possible to generate a HIV-specific T cell response. This finding supports the possibility of using exogenous ADA to counteract the HIV-induced attenuation of ADA-mediated costimulation [25].

To know whether ADA may modulate naïve T cell differentiation, cocultures of naïve CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ T cells and autologous superantigen-pulsed DCs were used as a model. ADA not only enhanced Teff generation but also increased memory T cell generation. Interestingly, ADA enhanced the generation of Tregs. The ADA-mediated effects were observed not only in healthy donors but also in immunologically compromised individuals, such as HIV-infected patients. In addition, we analyzed the contribution of IL-6, TNF- α , IFN- γ , and the deaminase activity to the ADA-mediated effects.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and study population

Blood samples were obtained by venipuncture from the antecubital vein. EDTA-treated vacutainers (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) were used as collecting tubes, and every sample was processed immediately after extraction. Fifteen HIV-1-infected patients and 30 healthy control volun-

teers were included in the study. All individuals gave informed consent. The characteristics of HIV-infected patients are shown in **Table 1**.

Antibodies and reagents

The following primary antibodies were used: FITC-conjugated mAb against HLA-DR, CCR5, CD4, CD14, CD19, CD25, CD45RA, and IgG- γ 1 isotype-matched control; PE-conjugated mAb against HLA-DR, CXCR4, CD1a, CD11c, CD14, CD19, CD25, CD40, CD45, CD45RO, CD56, and IgG- γ 1 isotype-matched control, and PerCP-conjugated mAb against CD3, CD4, and IgG- γ 1 isotype-matched control from BD Biosciences (Erembodegem-Aalst, Belgium); nonconjugated mouse mAb against CD26 (Ba5), nonconjugated mouse IgG2a control isotype, and PE-conjugated mAb against CD80, CD83, and CD86 (Coulter-Immunotech Diagnostic, Marseille, France); PE-conjugated mAb against CD209 (eBioscience, San Diego, CA, USA); activity-neutralizing mouse mAb against human IL-6, TNF- α , and IFN- γ (Bender MedSystems Inc., Burlingame, CA, USA); affinity-purified, nonconjugated goat pAb against A_{2B}R (N-19; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); and nonconjugated rabbit pAb against purified calf ADA [26]. The following secondary pAb were used: FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Gene Tex, Inc., Irvine, CA, USA), rabbit anti-mouse Igs (Dako, Glostrup Denmark), and rabbit anti-goat IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). All antibodies were used at the concentration range recommended by the supplier. TNF- α , IL-6, SEA and irrelevant mouse IgGs were purchased from Sigma-Aldrich; IFN- γ (Actimmune) was from InterMune, Inc. (Brisbane, CA, USA). ADA from calf intestine (Roche Diagnostic Inc., Mannheim, Germany) was desalted by passage through a PD-10 column (Amersham Biosciences, Cerdanyola, Spain), and its enzymatic activity was evaluated for consumption of Ado, measured as decreases in absorbance at 265 nm [27]. To obtain ADA without enzymatic activity, desalted ADA was treated with HgCl₂, as described previously [28], and passed again through a PD-10 column to eliminate remaining HgCl₂. The enzymatic activity of Hg²⁺-treated ADA was completely and irreversibly abolished.

Cocultures of monocyte-derived DCs and CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ lymphocytes

Human PBMCs were obtained immediately after blood extraction using the standard Ficoll gradient method [29]. Monocytes were obtained as de-

TABLE 1. Clinical Information of Patients with HIV-1

Patient	HAART	Sex	Age	VL	T CD4		T CD4 Nadir		T CD8	
					Cells/ μ l	%	Cells/ μ l	%	Cells/ μ l	%
1	yes	M	42	<DL	858	31.4	364	19.0	858	31.2
2	no	M	30	4.3	802	37.4	565	29.0	672	31.1
3	yes	M	37	<DL	930	29.5	504	19.2	1395	45.0
4	no	F	41	2.2	891	49.2	646	41.8	655	35.7
5	no	F	43	3.6	548	26.3	513	26.3	907	43.1
6	no	M	36	4.0	1007	38.3	714	28.0	1166	43.7
7	yes	M	39	<DL	497	22.5	264	21.6	1401	62.5
8	no	M	32	2.5	1122	34.5	1073	32.4	693	21.0
9	yes	M	45	<DL	914	34.0	450	23.8	618	23.2
10	yes	M	27	2.3	517	31.0	331	17.9	768	46.2
11	yes	M	44	<DL	854	34.8	220	16.0	951	38.8
12	yes	M	39	<DL	665	38.1	437	30.9	577	32.6
13	yes	M	53	<DL	740	25.2	375	14.6	1302	44.0
14	no	M	36	3.14	576	32.0	351	26.0	1098	61.0
15	no	F	53	1.8	540	20.0	451	19.0	1944	72.0
Mean			40	3.0	764.1	32	484	24	1000	42
SD			7	0.9	198	7	211	7	384	14

HAART, Highly active antiretroviral therapy; VL, viral load; DL, detection limit.

scribed previously [14] and were differentiated for 7 days to iDCs by adding 1000 U/ml IL-4 (Prospec-Tany Technogene Ltd., Rehovot, Israel) and 1000 U/ml GM-CSF (Prospec-Tany Technogene Ltd.) at Days 0, 3, and 5. DC immunophenotype (CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD56⁻, HLA-DR⁺, CD80⁺, CD83⁺, CD86⁺, CD1a⁺, CD11c⁺, CD40⁺, CD45RO⁺, CD45RA⁻, CD209⁺, CXCR4⁺, CCR5⁻) was confirmed by flow cytometry. A T cell-enriched fraction was obtained as described previously [14]. By using the human naïve CD4⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec GmbH, Germany), a negative selection of these cells was performed, according to the manufacturer's instructions, to obtain CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻CD25⁻ T cells. To confirm the purity and the naïve phenotype, the presence of CD4 and CD45RA and the absence of CD45RO and CD25 were tested by flow cytometry immediately after cell isolation. The purity of CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻CD25⁻ T cells was between 94% and 98%. Autologous cocultures were performed in 96-well plates, containing naïve CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻CD25⁻ T cells (2×10^5 cells/well) and iDCs (5×10^3 cells/well), pulsed or not with 100 pg/ml SEA for 3.5 h at 37°C in 200 μ l/well XIVO-10 medium containing or not 2 μ M ADA, 20 ng/ml IL-6, 250 U/ml TNF- α , 1000 U/ml IFN- γ , or a combination of these cytokines. When indicated, cocultures were performed in the presence of 2 μ M ADA and anti-IL-6 (150 ng/ml), anti-TNF- α (1.9 μ g/ml), anti-IFN- γ (2 μ g/ml), or irrelevant mouse IgG1 (2 μ g/ml) as a negative control. Cocultures were incubated for the indicated times at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂.

Immunostaining, quantification of Tregs, and flow cytometry

To analyze expression of cell surface markers, cocultured cells were collected, washed with PBS, resuspended at 2×10^6 cells/ml (50 μ l/tube), and incubated with FITC-, PE-, and/or PerCP-conjugated antibodies (see above) for 30 min at 4°C. Cells were then washed with PBS, fixed with 1% formaldehyde in PBS, and analyzed by flow cytometry. FITC-, PE-, and PerCP-conjugated isotype-matched antibodies were used for negative control. When nonconjugated primary antibodies were used, cells washed with PBS were incubated for 30 min at 4°C with blocking buffer (PBS containing 5% BSA for ADA labeling or PBS containing 10% rabbit serum and 0.1% NaN₃ for CD26 or A_{2B}R labeling) prior incubation with 10 μ g/ml N-19, 20 μ g/ml anti-ADA, 20 μ g/ml irrelevant rabbit IgG (used as a negative control of anti-ADA), Ba5 (1:10), or mouse IgG2a (1:10) isotype control (used as a negative control of Ba5) for 30 min at 4°C. Cells were washed three times with blocking buffer and stained for flow cytometry analysis with the corresponding secondary antibodies: FITC-conjugated rabbit anti-goat IgG (1:400), FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG (1:20), and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG. Stained cells were analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). Cells were gated on the basis of forward- and side-scatter parameters, and this gating region was evaluated further for the expression of FL1, FL2, and FL3. To quantify Tregs, Foxp3 was detected using the commercially available human Treg staining kit (eBioscience), following the manufacturer's instructions. Cell samples were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). In all cases, data were analyzed using CellQuest and FlowJo software.

Proliferation assays

T cell proliferation was determined by the CFSE method. Cells (10^7 cells/ml) were stained with 5 μ M CFSE, as indicated by the manufacturer's protocol, using the CellTrace CFSE proliferation kit (Molecular Probes, Paisley, UK).

Statistical analysis

Data were analyzed using the GraphPad Prism 5.0 software. Quantitative variables were analyzed using medians and IQRs. The nonparametric Mann-Whitney *U* test for unpaired data or the Wilcoxon signed rank test for paired data was used when comparing two groups. For multiple compar-

isons, the Kruskal-Wallis test, followed by Dunns post-test, was used. For all the tests used, a two-tailed *P* value <0.05 was considered statistically significant.

Online Supplemental material

Expression of cell surface ADA, CD26, and A_{2B}R in T cells cocultured with SEA-pulsed DCs is shown in Supplemental Fig. 1. Kinetic analysis and the role of enzymatic and extraenzymatic activity of ADA in the generation of the CD4⁺CD25^{high} population are shown in Supplemental Fig. 2. Expression of CD25^{high} on the CD4⁺ T cell population from HIV-infected patients and healthy controls is also shown in Supplemental Fig. 2.

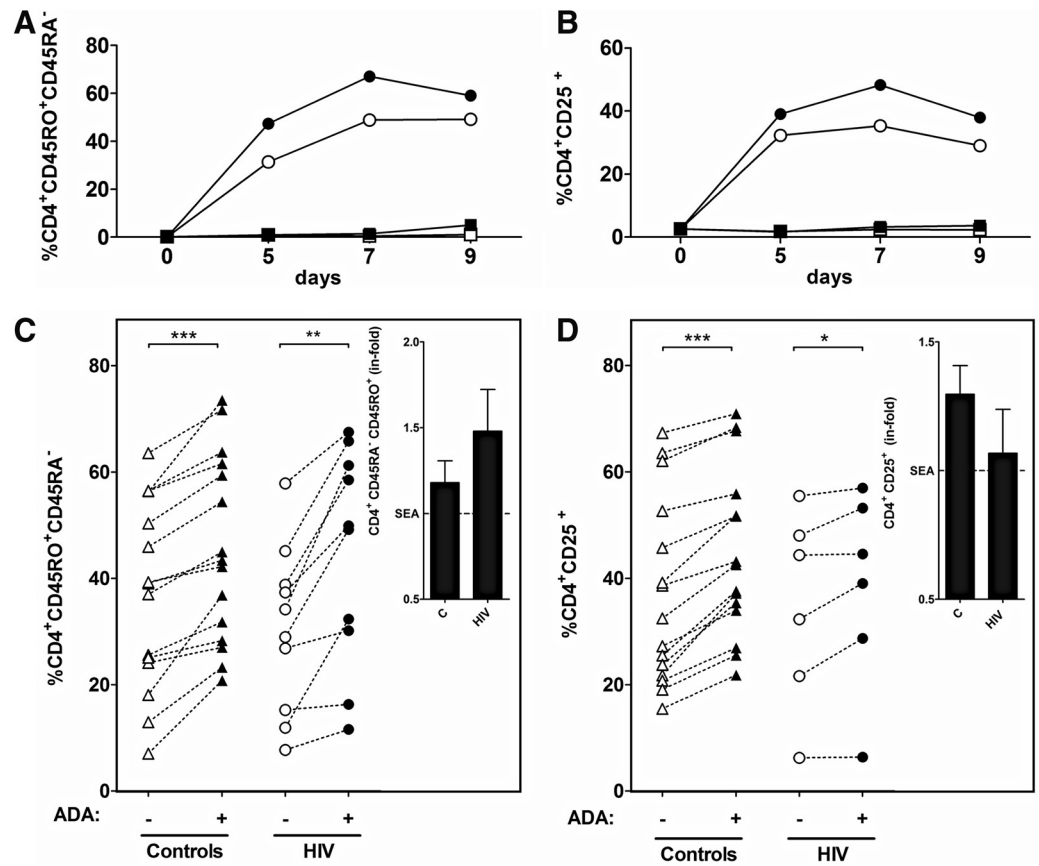
RESULTS

ADA enhanced the switch from the naïve CD45RA⁺CD45RO⁻CD25⁻ to the effector CD45RA⁻CD45RO⁺CD25⁺ phenotype

To address whether ADA has an impact over the generation of T effs, naïve CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ T cells were freshly isolated and cocultured with autologous, SEA-pulsed iDCs. As markers of effector phenotype, expression of CD45RO and CD25 was determined by flow cytometry. In the absence of exogenous ADA, the percentage of CD45RO⁺ and CD25⁺ T cells increased with time, reaching a maximum at Day 7. ADA promoted an increase in the percentage of T cells expressing CD45RO or CD25 with similar kinetics (Fig. 1A and B). Control assays performed with nonpulsed iDCs did not lead to significant increases of CD45RO or CD25 expression in the absence or presence of ADA (Fig. 1A and B). These results indicate that ADA enhanced the TCR-mediated generation of T effs, but it had no effect by itself. The ADA-mediated, costimulatory effect on CD4⁺ T cell proliferation is impaired in HIV-infected individuals [24]. Thereby, the question of whether the generation of T effs is attenuated in cocultures obtained from HIV-infected patients, compared with healthy donors, was investigated. ADA promoted a statistically significant increase of CD45RO and CD25 expression in every tested healthy or HIV-infected donor, showing individual-dependent variability (Fig. 1C and D). The ADA-mediated effect was not significantly different when comparing HIV-infected and healthy donors (Fig. 1C and D, insets), suggesting that ADA is also able to increase generation of the T eff phenotype in these immunologically compromised individuals.

ADA potentiates T cell proliferation in autologous cocultures with Ag-pulsed human iDC or mature DC. Costimulation is not a result of the enzymatic activity but of the interaction of ADA-CD26 complexes on T cells with A_{2B}R expressed on DCs [14]. Accordingly, in cocultures of naïve CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ T cells and autologous, SEA-pulsed iDCs, ADA induced an increase in the T cell proliferation that was independent of Ado deamination. Thus, active ADA and ADA-Hg enhanced T cell proliferation (Fig. 2A). In cocultures performed in the presence of ADA or ADA-Hg, it was observed that active and enzymatically inactive ADA promoted an increase in the percentage of T cells expressing CD45RO (Fig. 2B), demonstrating that the deaminase activity was not required to potentiate the generation of T effs. As it has been described previously that ADA, independently of its deami-

Figure 1. ADA effect on CD45RO and CD25 expression in naïve CD4⁺ T-lymphocytes cocultured with autologous, SEA-pulsed iDCs. CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ naïve T cells were freshly isolated and cocultured with autologous, SEA-pulsed iDCs in the absence or presence of 2 μ M ADA, and subsequently, CD45RO and CD25 expression was determined by flow cytometry. (A and B) T cells were cocultured with nonpulsed (squares) or SEA-pulsed (circles) iDCs in the absence (open symbols) or presence (solid symbols) of ADA, and expression of CD45RO (A) and CD25 (B) was determined in the CD4⁺-gated population. (C and D) The maximum level of expression of CD45RO (C) and CD25 (D) is depicted for cells from healthy donors (triangles) and HIV-infected individuals (circles) in the absence (open symbols) or presence (solid symbols) of ADA. Each pair of linked symbols represents results corresponding to cells from a particular individual. Values are represented as percentage of positive cells for the given surface marker. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (C and D) Inset bar graphs represent the median \pm IQR of the ratio (in-fold) of the percentage of positive cells obtained in the presence of ADA versus those obtained in its absence; the reference value of 1 is indicated by a dotted line. C, Control.



nase activity, leads to a marked increase in the production of the Th1 and proinflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α , and IL-6 [14], the role of these cytokines in the ADA-induced increase in CD45RO and CD25 expression was investigated. Accordingly, naïve CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ T cells were cocultured with autologous, SEA-pulsed iDCs in the presence of ADA, IL-6, TNF- α , IFN- γ , or a combination of these factors, and CD45RO and CD25 expression on T cells was determined by flow cytometry. The concentration of cytokines used for these experiments was equivalent to the average of the maximum amount of cytokines produced in this experimental setup in response to ADA [14]. As shown in **Fig. 3A** and **C**, IL-6 and to a lesser extent, TNF- α and IFN- γ enhanced generation of Teffs. In magnitude, the IL-6-mediated effect was not significantly different from the ADA-mediated effect, and the maximum effect was obtained when using a cocktail of the three cytokines (Fig. 3A and C) or when using IL-6 plus TNF- α or IL-6 plus IFN- γ (data not shown). In cocultures performed in the presence of ADA and activity-neutralizing antibodies directed against IL-6, TNF- α , or IFN- γ , the ADA-induced effect was reduced significantly (Fig. 3B and D), something that was not encountered when an irrelevant mouse IgG1 was used (data not shown). Neither CD45RO nor CD25 expression was modified significantly in cocultures performed in the presence of IL-6 and the anti-IL-6 antibody, TNF- α and the anti-TNF- α antibody, or IFN- γ and the anti-IFN- γ antibody (data not

shown), which confirmed the neutralizing action of these antibodies. Overall, these results indicate that IL-6, TNF- α , and IFN- γ may be involved in the ADA-induced pathway, leading to the potentiation of Teff generation.

Taking into account that ADA induces a costimulatory effect by interacting with CD26 on the T cell surface and with A_{2B}R on the iDCs surface [14], control experiments were performed to test whether the T cell-iDC interaction is able to modulate the expression of ADA and ADA-binding proteins. Results show that ADA expression on the T cell surface was increased by coculturing them with SEA-pulsed iDCs; the effect was slightly potentiated by IL-6 and by a cocktail of IL-6, TNF- α , and IFN- γ (Supplemental Fig. 1A). It was also observed that the CD26 expression on the T cell surface was increased significantly when T cells were cocultured with SEA-pulsed iDCs, and this effect was also slightly potentiated by IL-6 and by a cocktail of IL-6, TNF- α , and IFN- γ but not by ADA (Supplemental Fig. 1B). All CD4⁺ T cells expressed A_{2B}R on the plasma membrane (Supplemental Fig. 1C), and levels of this receptor increased when naïve T cells were cocultured with SEA-pulsed iDCs, as measured by the geometric mean value of fluorescence intensity. Neither ADA nor the cytokines described above were able to further increase A_{2B}R expression levels on CD4⁺ T cells (Supplemental Fig. 1C and D).

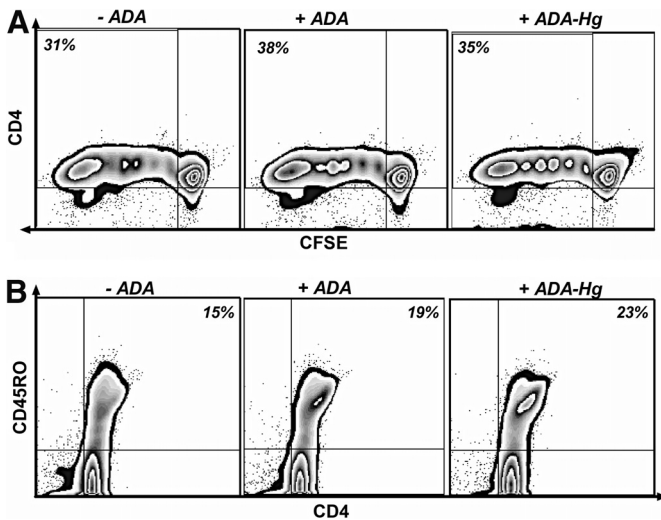


Figure 2. Role of ADA enzymatic activity on the proliferation and the expression of CD45RO in CD4⁺ T cells cocultured with SEA-pulsed DCs. CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ naïve T cells, freshly isolated from healthy donors, were labeled with CFSE and cocultured with autologous, SEA-pulsed iDCs in the absence or presence of 2 μ M ADA or ADA-Hg. (A) CD4⁺ T cell proliferation was analyzed by flow cytometry at Day 7 of coculture. (B) Contour plots showing CD45RO expression at Day 14 of coculture are shown. Representative data from one of three independent experiments are shown.

ADA enhanced the generation of CD4⁺CD45RO⁺CD45RA⁻CD25⁻ memory T cells

To determine the effect of ADA upon memory T cell generation after effector responses, T cells with the memory phenotype CD4⁺CD45RO⁺CD25⁻ were identified in cocultures of naïve CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ T cells and autologous, SEA-pulsed iDCs. The CD45RA expression in the CD4⁺CD25⁻ population decreased upon time (Fig. 4A, upper image), and this CD45RA⁻ population was confirmed to be CD45RO⁺ (Fig. 4A, lower image). Importantly, the presence of ADA induced a notable increase of memory T cells at Day 14 of coculture (Fig. 4A). The ADA-mediated effect was observed in cells from almost every healthy or HIV-infected donor (Fig. 4B) without significant differences when comparing HIV-infected and healthy individuals. Thus, the ADA induced enhancement of the Teff phenotype during the peak of T cell response results, after the contraction phase, in an increased generation of memory T cells.

To test whether the ADA enzymatic activity is involved in the ADA-induced increase of memory T cell generation, cocultures were performed in the presence of ADA or ADA-Hg. As shown in Fig. 4C, ADA and ADA-Hg promoted an increase in the percentage of CD45RO-expressing cells within the CD4⁺CD25⁻ gated population of T cells. These results indicate that ADA enzymatic activity was not required to enhance memory T cell generation and suggest that similarly to ADA-enhanced Teff generation, augmented memory T cell production is mediated by interaction of ADA with ADA-binding proteins. To investigate the role of IFN- γ , TNF- α , and IL-6 on the ADA-induced increase of memory T cell generation, cocultures of naïve

CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ T cells and autologous, SEA-pulsed iDCs were performed in the absence or in the presence of ADA, IFN- γ , TNF- α , or IL-6 and in the presence of a combination of these factors. As shown in Fig. 5A and B, IL-6 and to a lesser extent, IFN- γ and TNF- α were able to emulate the ADA effect on the CD4⁺CD25⁻CD45RO⁺ T cell generation. When the three cytokines were added together, an additive effect was observed. Moreover, when IL-6 was combined with IFN- γ or TNF- α , but not when TNF- α was combined with IFN- γ , a significant increase in the generation of memory CD4⁺ T cells was reached (data not shown). In cocultures performed in the presence of ADA and neutralizing antibodies directed against IL-6, TNF- α , or IFN- γ , the ADA-induced effect was reduced (Fig. 5C), and it did not change in the presence of irrelevant mouse IgG1 (data not shown). As a negative control, the generation of memory CD4⁺ T cells was not significantly modified in cocultures performed in the presence of IL-6 and the anti-IL-6 antibody, TNF- α and the anti-TNF- α antibody, or IFN- γ and the anti-IFN- γ antibody (data not shown). Taken together, these results indicate that mainly IL-6, and to a minor extent, IFN- γ and TNF- α are involved in the ADA-promoted enhancement of the memory CD4⁺ T cell generation.

ADA enhanced the generation of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs

According to the important role played by Tregs in the regulation of immune responses and as a result of the fact that ADA may modulate the generation of other T cell phenotypes (Figs. 1 and 4), the question of whether ADA is able to modulate the generation of Tregs was investigated. To determine the presence of a CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Treg subset in the CD4⁺CD25⁻ T cell population, cocultures of naïve CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ T cells and autologous, SEA-pulsed iDCs were performed. According to the expression of CD25⁺, three different CD4⁺ T cell subpopulations were identified by flow cytometry: cells not expressing CD25, cells moderately expressing CD25, and cells with a high expression of CD25 (CD25^{high}; Supplemental Fig. 2). The CD25^{high} subset of CD4⁺ T cells appeared at Day 5 of coculture, and it became almost undetectable at later time periods (Supplemental Fig. 2A). In the presence of ADA, but not in the presence of ADA-Hg, the percentage of CD25^{high} from HIV-infected and healthy donors was higher than in its absence (Supplemental Fig. 2B and C). To gain further evidence about the role of ADA on the Treg generation, the expression of the transcriptional factor Foxp3 within the CD4⁺CD25^{high} population was also assessed in coculture experiments at Day 5. ADA induced an increased generation of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells in cocultures from healthy and HIV-infected donors (Fig. 6A). The effect was not significantly different on comparing HIV-infected patients and healthy controls. Controls performed using nonpulsed iDCs did not lead to the generation of the CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cell phenotype, in the absence or in the presence of ADA (data not shown). Enzyme-inactive ADA (Fig. 6B) was unable to potentiate the generation of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells in cells from healthy or HIV-infected donors. Taken together, these results suggest that deamination of endogenous Ado promoted an enhanced generation of Tregs during the effector phase of the T

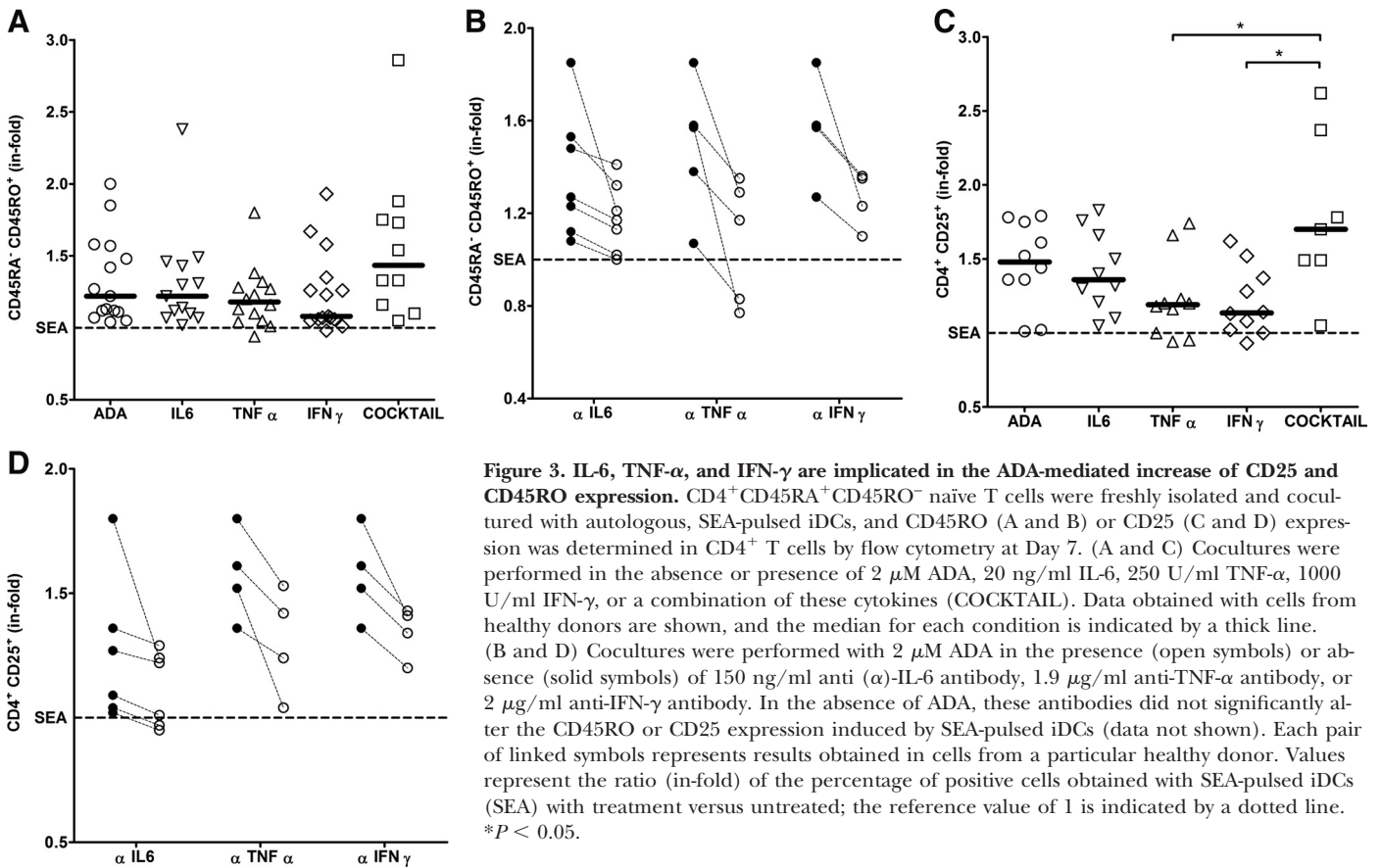


Figure 3. IL-6, TNF- α , and IFN- γ are implicated in the ADA-mediated increase of CD25 and CD45RO expression. CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ naïve T cells were freshly isolated and cocultured with autologous, SEA-pulsed iDCs, and CD45RO (A and B) or CD25 (C and D) expression was determined in CD4⁺ T cells by flow cytometry at Day 7. (A and C) Cocultures were performed in the absence or presence of 2 μ M ADA, 20 ng/ml IL-6, 250 U/ml TNF- α , 1000 U/ml IFN- γ , or a combination of these cytokines (COCKTAIL). Data obtained with cells from healthy donors are shown, and the median for each condition is indicated by a thick line. (B and D) Cocultures were performed with 2 μ M ADA in the presence (open symbols) or absence (solid symbols) of 150 ng/ml anti (α)-IL-6 antibody, 1.9 μ g/ml anti-TNF- α antibody, or 2 μ g/ml anti-IFN- γ antibody. In the absence of ADA, these antibodies did not significantly alter the CD45RO or CD25 expression induced by SEA-pulsed iDCs (data not shown). Each pair of linked symbols represents results obtained in cells from a particular healthy donor. Values represent the ratio (in-fold) of the percentage of positive cells obtained with SEA-pulsed iDCs (SEA) with treatment versus untreated; the reference value of 1 is indicated by a dotted line. * $P < 0.05$.

cell response. According to this notion, the ADA-mediated potentiation on the generation of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells was not directly related to the ADA-induced IFN- γ , TNF- α , and IL-6 secretion. In fact, when the generation of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells was analyzed in cocultures performed in the absence or in the presence of ADA or in the presence of IFN- γ , TNF- α , IL-6, or a cocktail of these cytokines, the ADA-triggered increase of Treg production was not emulated (Fig. 7). Therefore, the generation of Tregs seemed to be dependent on the enzymatic activity of ADA.

DISCUSSION

The lack of ADA is deleterious for the development and function of lymphocytes. The pathological mechanism linking ADA deficiency to SCID was first assumed to be largely dependent on dATP accumulation and toxicity [30]. AdoRs were placed into the equation later on, as excess of Ado as a result of an ADA deficit may lead to sustained activation of AdoRs present in lymphocytes [10, 31]. AdoR-mediated regulation of the immune system is mediated by at least three of the four receptor subtypes, A_{2B} [32, 33], A₃ [34], and A_{2A} [12, 35]. As we demonstrated that ADA was on the cell surface of lymphocytes [36, 37], and cell surface ADA-binding proteins started to be identified [38–41], the enzyme-independent, signaling-dependent role of ADA on immune function has been demonstrated. Cell surface ADA may therefore contribute to lymphocyte develop-

ment, activation, and fate by two mechanisms: by regulating the levels of extracellular Ado available to AdoRs and by interacting with ADA-binding proteins and engaging cAMP-independent signaling pathways. It is here shown that ADA-mediated costimulation, in a deaminase activity-independent way, promotes an enhanced production of Tregs during the effector phase of the T cell response and augmented generation of memory T cells after the effector phase. Furthermore, the enzymatic activity of ADA promotes an augmented generation of Tregs during the effector phase of the T cell response. Importantly, the potentiation in the induction of Tregs, and memory T cells was not only observed in cocultures of cells obtained from healthy individuals but also in cultures of cells obtained from HIV-infected patients.

Cellular and molecular mechanisms involved in the generation of memory T cells are not yet well known. The findings here reported point to the idea that the intercellular A_{2B}R-ADA-CD26 interaction contributes to the differentiation from naïve CD4⁺CD45RA⁺ T cells toward memory CD4⁺CD45RO⁺ T cells. It has been demonstrated that CD26-triggered signaling occurs through its interaction with CD45 in the plasma membrane of T cells [42, 43]. When CD45RO anchors CD26 in lipid raft microdomains, CD26 engagement evokes stimulatory signals for T cell activation [42]; in contrast, when CD45RA maintains CD26 excluded from lipid rafts, CD26 engagement attenuates T cell activation [43]. This evidence suggests that in our coculture conditions, the interaction of the

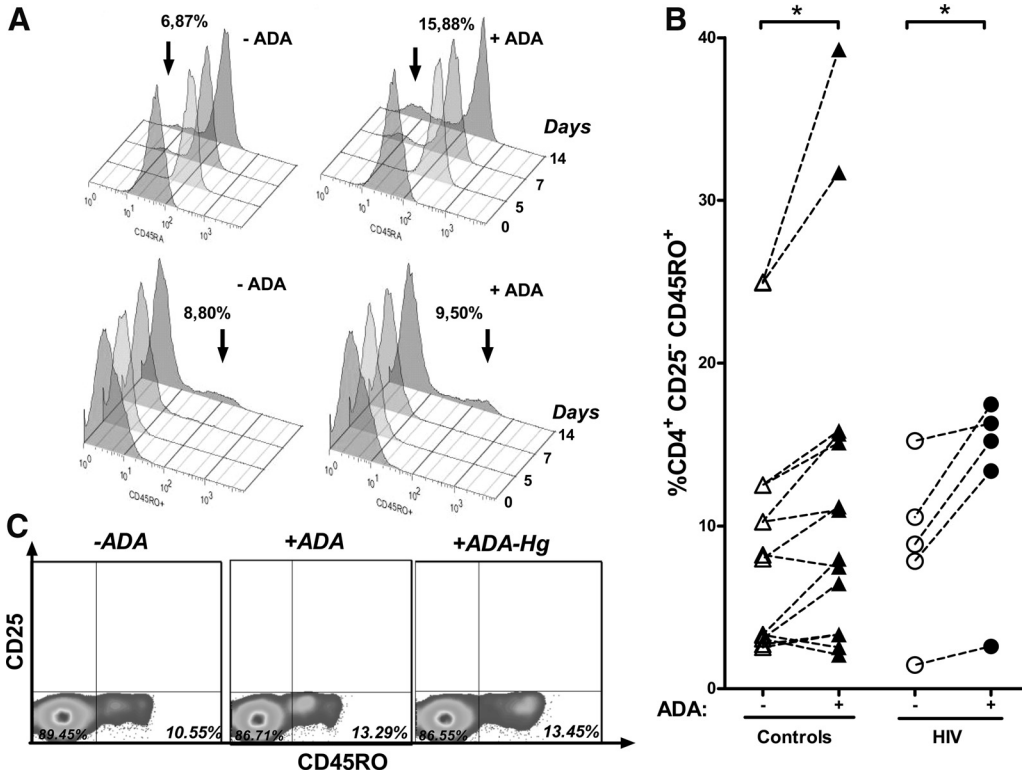


Figure 4. ADA increases the generation of a CD4⁺ T cell population with memory phenotype. CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ naïve T cells were freshly isolated from healthy donors and cocultured with autologous, SEA-pulsed iDCs in the absence or presence of 2 μ M ADA, and subsequently, CD45RA, CD45RO, and CD25 expression was determined by flow cytometry on CD4⁺ T cells. (A) 3D-Overlaid histograms reflecting kinetics of CD45RA (upper images) or CD45RO (lower images) expression in the CD4⁺CD25⁻-gated population are shown (representative experiment). Arrows indicate the CD45RA⁻ or CD45RO⁺ population at Day 14 of coculture. (B) Percentages of CD4⁺CD25⁻CD45RO⁺ cells induced in healthy (triangles) or HIV-infected (circles) donors after 14 days of coculture in the absence (open symbols) or presence (solid symbols) of ADA. Each pair of linked symbols represents data obtained using cells from a particular individual. **P* < 0.05. (C) Contour plots of CD45RO expression in the CD4⁺CD25⁻-gated population of T cells in cocultures, treated or not with 2 μ M ADA or ADA-Hg.

A_{2B}R-ADA-CD26 complex with CD45RA would not, at first, promote any positive effect in the generation of Teffs and memory T cells. Indeed, no ADA-mediated increase of CD25 or CD45RO expression was observed at short incubation times

(data not shown). In contrast, when the TCR-triggered switch of CD45RA to CD45RO is induced, the ADA-mediated effect would begin to operate positively in the production of Teffs and later, in the generation of memory T cells.

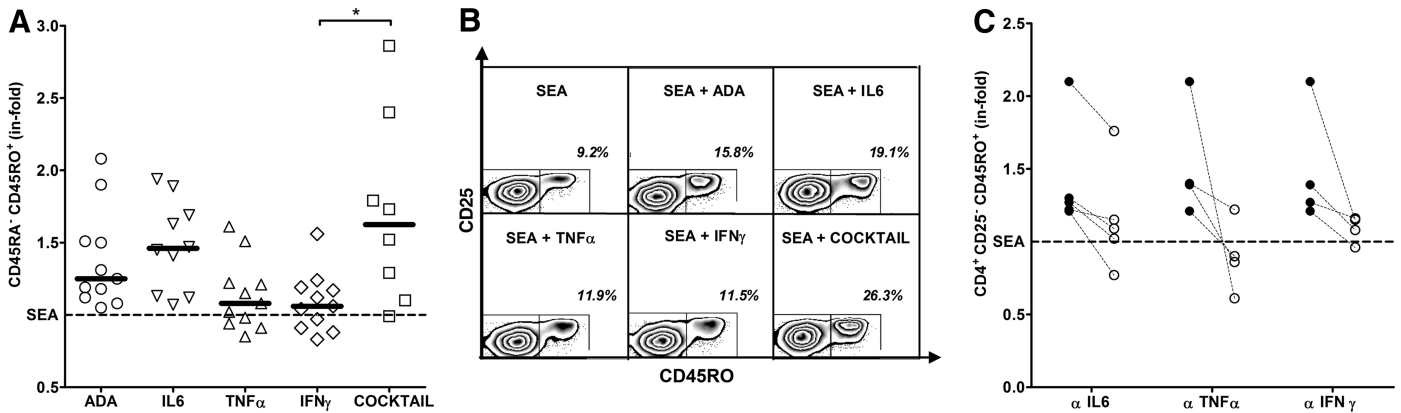
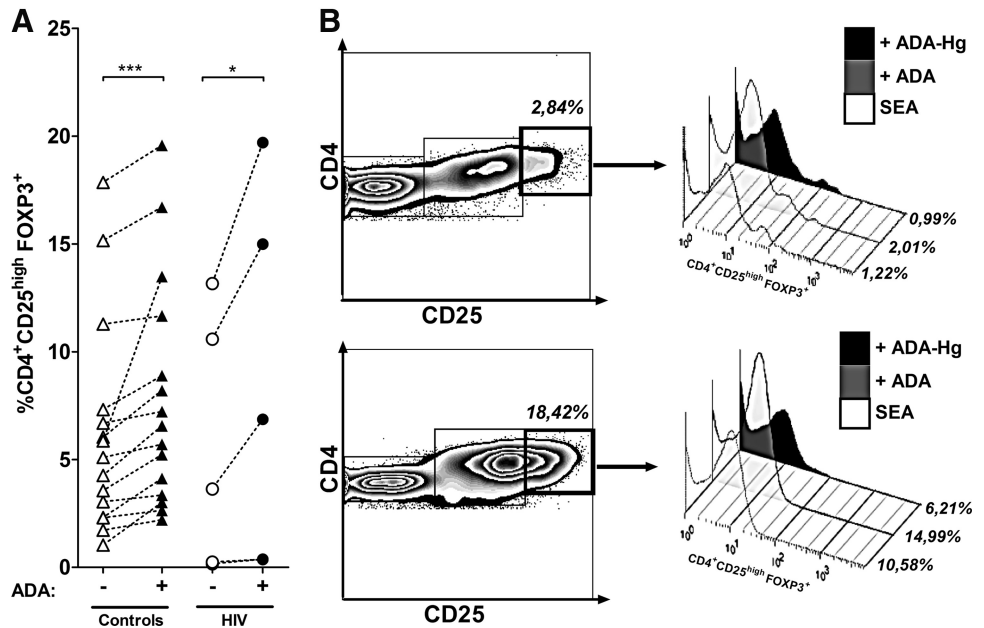


Figure 5. Role of IL-6, TNF- α , and IFN- γ in the ADA-induced increase of memory CD4⁺ T cell generation. CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ naïve T cells were freshly isolated from healthy donors and cocultured with autologous, SEA-pulsed iDCs, and subsequently, CD45RA, CD45RO, and CD25 expression was determined on CD4⁺ T cells by flow cytometry at Day 14. (A and B) Cocultures were performed in the absence or presence of 2 μ M ADA, 20 ng/ml IL-6, 250 U/ml TNF- α , 1000 U/ml IFN- γ , or a combination of these cytokines (COCKTAIL). (A) Expression of the memory phenotype CD45RA⁻CD45RO⁺ from healthy donors is shown, and the median for each treatment is indicated by a thick line. (B) Representative contour plots of CD45RO expression in the CD4⁺CD25⁻-gated population. (C) Expression of CD4⁺CD25⁻CD45RO⁺ cells in cocultures performed with 2 μ M ADA in the absence (solid symbols) or in the presence (open symbols) of 150 ng/ml anti-IL-6 antibody, 1.9 μ g/ml anti-TNF- α antibody, or 2 μ g/ml anti-IFN- γ antibody is depicted. Each pair of linked symbols represents data obtained using cells from a particular donor. (A and C) Values represent the ratio (in-fold) of the percentage of positive cells obtained with treatment versus untreated; the reference value of 1 is indicated by a dotted line. **P* < 0.05.

Figure 6. ADA increased the generation of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs. Freshly isolated, naïve CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ T cells were cocultured for 5 days (see Supplemental Fig. 2) with autologous, SEA-pulsed DCs in the absence or presence of 2 μM ADA. Expression of Foxp3 in the CD4⁺CD25^{high} population (gated as indicated in B) was determined. (A) Expression of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells in cocultures obtained using cells from healthy (triangles) or HIV-infected (circles) donors in the absence (open symbols) or presence (solid symbols) of ADA. Each pair of linked symbols represents a different donor. **P* < 0.05; ****P* < 0.001. (B) Contour plots showing CD25^{high} expression in CD4⁺ T cells and 3D-overlaid histograms representing Foxp3 expression in the CD4⁺CD25^{high}-gated population in cocultures using cells from a healthy (upper image) or a HIV-infected (lower image) donor, performed in the absence or in the presence of 2 μM ADA or 2 μM ADA-Hg.



CD39 and CD73 have been described as two surface markers specifically expressed on the Foxp3⁺ population of CD4⁺ T cells [44, 45]. The coordinated action of these two ecto-enzymes catalyzes the production of pericellular A_{2A}R

stimulation in the activation and function of Teffs [11–13], the synthesis of extracellular A_{2A}R by Tregs constitutes one of the regulatory mechanisms operating in these cells to attenuate Teff responses [44, 45]. In this regard, enhanced expression of ecto-ADA would enhance A_{2A}R degradation, thus leading to make Teffs less responsive to the inhibition exerted by Tregs. On the other hand, we observed here that ADA promoted an augmented generation of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs by a mechanism that seemed to be mainly dependent on its enzymatic activity. This constitutes the first study reporting a regulatory role of A_{2A}R in the generation of Tregs. Therefore, it seems that the deaminase activity of ADA is involved in potentiating the generation of Tregs.

Several studies have revealed a correlation among depletion of CD4⁺CD26⁺ T cells, increased serum levels of ADA, and the evolution of AIDS in infected individuals [46–48]. Furthermore, it has been described that ADA binding to CD26 is inhibited by soluble rHIV-1 envelope glycoprotein gp120 and by HIV-1 infectious particles [49]. Importantly, whereas ADA-CD26-mediated costimulation of T cell activation is impaired in HIV-1-infected patients [24], we here show that ADA-mediated costimulation promotes potentiation in the generation of Teffs and memory T cells in a similar extent to that observed in cocultures from healthy individuals. Thereby, exogenous addition of ADA could increase effector response and generation of CD4⁺ memory T cells against HIV. As ADA-mediated enhancement in the production of Teffs is followed by a delayed increase of Tregs, the addition of exogenous ADA to potentiate effector response seems to be a self-limited and promising approach to be used as a complement for immunostimulatory therapies. Another important point to consider is that whereas HIV-infected patients require potentiation of the Th1 response [25], their T cell responses are often deviated toward Th2 [25]. We have described previously that ADA-mediated costimulation favors a Th1 pattern in CD4⁺ T cells [14]. Thus,

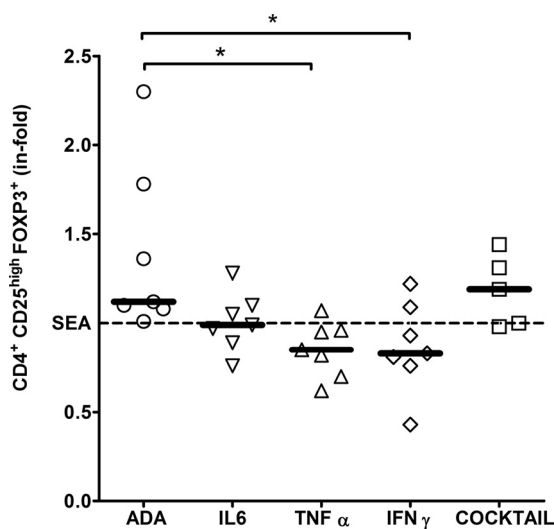


Figure 7. Role of IL-6, TNF-α and IFN-γ in the ADA-induced increase of Tregs. CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ naïve T cells were freshly isolated and cocultured with autologous, SEA-pulsed iDCs in the absence or presence of 2 μM ADA, 20 ng/ml IL-6, 250 U/ml TNF-α, 1000 U/ml IFN-γ, or a combination of these cytokines (COCKTAIL), and the CD25^{high}Foxp3⁺ subset in the CD4⁺ T cell population was quantified by flow cytometry at Day 5. Data obtained using cells from healthy donors are shown, and the median for each treatment is indicated by a thick line. Values represent the ratio (in-fold) of the percentage of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ cells obtained with SEA-pulsed iDCs with treatment versus untreated; the reference value of 1 is indicated by a dotted line. **P* < 0.05.

an ADA-based therapy could be beneficial for potentiation of Th1 effector responses and generation of immunological memory in HIV-infected individuals. In this regard, we have proposed recently that ADA would be a good adjuvant to be used in a DC-based vaccine for the treatment of AIDS [25]. Similarly, this idea could be applicable to potentiate an anti-tumor Th1 response in cancer patients.

The present results not only contribute to the knowledge of T cell biology but also provide a rationale for the development of therapeutic strategies aimed at reinforcing a compromised immune system. In fact, an imbalance between Tregs and Tregs has been observed in pathological scenarios ranging from immunosuppression [50, 51] and cancer [52] to autoimmunity [53, 54]. As a result of the fact that development of vaccines relies on the generation of memory T cells [55], our results may also be useful in the formulation of novel vaccines or immunotherapies.

AUTHORSHIP

J.M.M-N., V.C., R.P., T.G., C.L., and R.F. conceived of and designed the experiments; J.M.M-N., V.C., R.P., I.N-M., and N.C. performed the experiments; J.M.M-N., V.C., R.P., F.G., J.M.G., J.M., T.G., C.L., and R.F. analyzed data; and J.M.M-N., V.C., R.P., and R.F. wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by FIPSE (a nonprofit foundation including Spanish Ministry of Health, Abbott Laboratories, Boehringer Ingelheim, Bristol Myers Squibb, GlaxoSmithKline, Merck Sharp, and Dohme and Roche) 36750/08 (to R.F.) and 36536/05 (to T.G.), HIVACAT (Center for Research and Development of HIV Vaccines in Catalonia), ISCIII-RETIC RD06/006 (Red Temática Cooperativa de Grupos de Investigación en SIDA del Fondo de Investigación Sanitaria de la Seguridad Social; to N.C., F.G., J.M.G., and T.G.), and FIS-PI06-1259 (to T.G.), RIS-173 and USS-5048 (to R.P.), and FONDECYT 1095114 and PFB-16 (to R.P.) from Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica. The authors are grateful to all blood donors and to M. C. Pardo, M. Compte, and M. A. López for technical assistance in blood extraction.

REFERENCES

- DiPaolo, R. J., Brinster, C., Davidson, T. S., Andersson, J., Glass, D., Shevach, E. M. (2007) Autoantigen-specific TGF β -induced Foxp3⁺ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells. *J. Immunol.* **179**, 4685–4693.
- Vandenbark, A. A., Offner, H. (2008) Critical evaluation of regulatory T cells in autoimmunity: are the most potent regulatory specificities being ignored? *Immunology* **125**, 1–13.
- Abbal, C., Jourdan, P., Hori, T., Bousquet, J., Yssel, H., Pene, J. (1999) TCR-mediated activation of allergen-specific CD45RO(+) memory T lymphocytes results in down-regulation of cell-surface CXCR4 expression and a strongly reduced capacity to migrate in response to stromal cell-derived factor-1. *Int. Immunol.* **11**, 1451–1462.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., Nanan, R., Kelleher, A., Fazekas de St Groth, B. (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* **203**, 1693–1700.
- Badovinac, V. P., Harty, J. T. (2006) Programming, demarcating, and manipulating CD8⁺ T-cell memory. *Immunol. Rev.* **211**, 67–80.
- Farber, D. L. (1998) Differential TCR signaling and the generation of memory T cells. *J. Immunol.* **160**, 535–539.
- Franco, R., Valenzuela, A., Lluís, C., Blanco, J. (1998) Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol. Rev.* **161**, 27–42.
- Franco, R., Pacheco, R., Gatell, J. M., Gallart, T., Lluís, C. (2007) Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase I in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Crit. Rev. Immunol.* **27**, 495–509.
- Pacheco, R., Lluís, C., Franco, R. (2005) Role of CD26-adenosine deaminase interaction in the T cell-mediated immunity. *Immunologia* **24**, 235–245 (<http://revista.immunologia.org/upload/articles/6/5/650.pdf>).
- Hershfield, M. S. (2005) New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur. J. Immunol.* **35**, 25–30.
- Ohta, A., Sitkovsky, M. (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* **414**, 916–920.
- Huang, S., Apasov, S., Koshiba, M., Sitkovsky, M. (1997) Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood* **90**, 1600–1610.
- Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Ongini, E., Borea, P. A. (2000) A(2A) adenosine receptors in human peripheral blood cells. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 2–11.
- Pacheco, R., Martinez-Navio, J. M., Lejeune, M., Climent, N., Oliva, H., Gatell, J. M., Gallart, T., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. (2005) CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 9583–9588.
- Panther, E., Corinti, S., Idzko, M., Herouy, Y., Napp, M., la Sala, A., Girolomoni, G., Norgauer, J. (2003) Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* **101**, 3985–3990.
- Panther, E., Idzko, M., Herouy, Y., Rheinien, H., Gebicke-Haerter, P. J., Mrowietz, U., Dichmann, S., Norgauer, J. (2001) Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J.* **15**, 1963–1970.
- Fossetta, J., Jackson, J., Deno, G., Fan, X., Du, X. K., Bober, L., Soude-Bermejo, A., de Bouteiller, O., Caux, C., Lunn, C., Lundell, D., Palmer, R. K. (2003) Pharmacological analysis of calcium responses mediated by the human A3 adenosine receptor in monocyte-derived dendritic cells and recombinant cells. *Mol. Pharmacol.* **63**, 342–350.
- Hofer, S., Ivarsson, L., Stoitzner, P., Auffinger, M., Rainer, C., Romani, N., Heufler, C. (2003) Adenosine slows migration of dendritic cells but does not affect other aspects of dendritic cell maturation. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 300–307.
- Schnurr, M., Toy, T., Shin, A., Hartmann, G., Rothenfusser, S., Soellner, J., Davis, I. D., Cebon, J., Maraskovsky, E. (2004) Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **103**, 1391–1397.
- Aandahl, E. M., Moretto, W. J., Haslett, P. A., Vang, T., Bryn, T., Tasken, K., Nixon, D. F. (2002) Inhibition of antigen-specific T cell proliferation and cytokine production by protein kinase A type I. *J. Immunol.* **169**, 802–808.
- Cone, R. E., Cochrane, R., Lingenheld, E. G., Clark, R. B. (1996) Elevation of intracellular cyclic AMP induces an anergic-like state in Th1 clones. *Cell. Immunol.* **173**, 246–251.
- Dong, R. P., Kameoka, J., Hegen, M., Tanaka, T., Xu, Y., Schlossman, S. F., Morimoto, C. (1996) Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *J. Immunol.* **156**, 1349–1355.
- Hashikawa, T., Hooker, S. W., Maj, J. G., Knott-Craig, C. J., Takedachi, M., Murakami, S., Thompson, L. F. (2004) Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. *FASEB J.* **18**, 131–133.
- Martinez-Navio, J. M., Climent, N., Pacheco, R., Garcia, F., Plana, M., Nomdedeu, M., Oliva, H., Rovira, C., Miralles, L., Gatell, J. M., Gallart, T., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. (2009) Immunological dysfunction in HIV-1-infected individuals by impairment of adenosine deaminase-induced co-stimulation of T-cell activation. *Immunology* **128**, 393–404.
- Climent, N., Martinez-Navio, J. M., Gil, C., Garcia, F., Rovira, C., Hurtado, C., Miralles, L., Gatell, J. M., Gallart, T., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. (2009) Adenosine deaminase enhances T-cell response elicited by dendritic cells loaded with inactivated HIV. *Immunol. Cell Biol.* **87**, 634–639.
- Ginés, S., Ciruela, F., Burgueno, J., Casado, V., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. (2001) Involvement of caveolin in ligand-induced recruitment and internalization of A(1) adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line. *Mol. Pharmacol.* **59**, 1314–1323.
- Franco, R., Canela, E. I., Bozal, J. (1986) Heterogeneous localization of some purine enzymes in subcellular fractions of rat brain and cerebellum. *Neurochem. Res.* **11**, 423–435.
- Ciruela, F., Saura, C., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. (1996) Adenosine deaminase affects ligand-induced signaling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett.* **380**, 219–223.
- Boyum, A. (1976) Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.* **5**, 9–15.

30. Hirschhorn, R. (1995) Adenosine deaminase deficiency: molecular basis and recent developments. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **76**, S219–S227.
31. Resta, R., Thompson, L. F. (1997) SCID: the role of adenosine deaminase deficiency. *Immunol. Today* **18**, 371–374.
32. Mirabet, M., Herrera, C., Cordero, O. J., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. (1999) Expression of A2B adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation. *J. Cell Sci.* **112**, 491–502.
33. Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Cattabriga, E., Pancaldi, C., Szabadkai, Y., Rizzuto, R., Klotz, K. N., Leung, E., Mac Lennan, S., Baraldi, P. G., Borea, P. A. (2005) Expression, pharmacological profile, and functional coupling of A2B receptors in a recombinant system and in peripheral blood cells using a novel selective antagonist radioligand, [3H]MRE 2029-F20. *Mol. Pharmacol.* **67**, 2137–2147.
34. Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Cattabriga, E., Avitabile, A., Gavioli, R., Fortini, C., Leung, E., Mac Lennan, S., Borea, P. A. (2004) Expression of A3 adenosine receptors in human lymphocytes: up-regulation in T cell activation. *Mol. Pharmacol.* **65**, 711–719.
35. Csóka, B., Himer, L., Selmečy, Z., Vizi, E. S., Pacher, P., Ledent, C., Deitch, E. A., Spolarics, Z., Nemeth, Z. H., Hasko, G. (2008) Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J.* **22**, 3491–3499.
36. Aran, J. M., Colomer, D., Matutes, E., Vives-Corrons, J. L., Franco, R. (1991) Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear blood cells: immunohistochemical localization using light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 1001–1008.
37. Martín, M., Aran, J. M., Colomer, D., Huguet, J., Centelles, J. J., Vives-Corrons, J. L., Franco, R. (1995) Surface adenosine deaminase. A novel B-cell marker in chronic lymphocytic leukemia. *Hum. Immunol.* **42**, 265–273.
38. Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S. F., Morimoto, C. (1993) Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* **261**, 466–469.
39. Saura, C., Ciruela, F., Casado, V., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. (1996) Adenosine deaminase interacts with A1 adenosine receptors in pig brain cortical membranes. *J. Neurochem.* **66**, 1675–1682.
40. Herrera, C., Casado, V., Ciruela, F., Schofield, P., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. (2001) Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol. Pharmacol.* **59**, 127–134.
41. Gracia, E., Cortes, A., Meana, J. J., Garcia-Sevilla, J., Herhsfield, M. S., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R., Casado, V. (2008) Human adenosine deaminase as an allosteric modulator of human A(1) adenosine receptor: abolishment of negative cooperativity for [H](R)-pia binding to the caudate nucleus. *J. Neurochem.* **107**, 161–170.
42. Ishii, T., Ohnuma, K., Murakami, A., Takasawa, N., Kobayashi, S., Dang, N. H., Schlossman, S. F., Morimoto, C. (2001) CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12138–12143.
43. Kobayashi, S., Ohnuma, K., Uchiyama, M., Iino, K., Iwata, S., Dang, N. H., Morimoto, C. (2004) Association of CD26 with CD45RA outside lipid rafts attenuates cord blood T-cell activation. *Blood* **103**, 1002–1010.
44. Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B., Robson, S. C. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1257–1265.
45. Mandapathil, M., Hilldorfer, B., Szczepanski, M. J., Czystowska, M., Szajnlik, M., Ren, J., Lang, S., Jackson, E. K., Gorelik, E., Whiteside, T. L. (2010) Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 7176–7186.
46. Vanham, G., Kestens, L., De Meester, I., Vingerhoets, J., Penne, G., Vanhoof, G., Scharpe, S., Heyligen, H., Bosmans, E., Ceuppens, J. L., et al. (1993) Decreased expression of the memory marker CD26 on both CD4+ and CD8+ T lymphocytes of HIV-infected subjects. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **6**, 749–757.
47. Blazquez, M. V., Madueno, J. A., Gonzalez, R., Jurado, R., Bachovchin, W. W., Pena, J., Munoz, E. (1992) Selective decrease of CD26 expression in T cells from HIV-1-infected individuals. *J. Immunol.* **149**, 3073–3077.
48. De Paoli, P., Zanussi, S., Simonelli, C., Bortolin, M. T., D'Andrea, M., Crepaldi, C., Talamini, R., Comar, M., Giacca, M., Tirelli, U. (1997) Effects of subcutaneous interleukin-2 therapy on CD4 subsets and in vitro cytokine production in HIV+ subjects. *J. Clin. Invest.* **100**, 2737–2743.
49. Valenzuela, A., Blanco, J., Callebaut, C., Jacotot, E., Lluís, C., Hovanessian, A. G., Franco, R. (1997) Adenosine deaminase binding to human CD26 is inhibited by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 and viral particles. *J. Immunol.* **158**, 3721–3729.
50. Robertson, S. J., Hasenkrug, K. J. (2006) The role of virus-induced regulatory T cells in immunopathology. *Springer Semin. Immunopathol.* **28**, 51–62.
51. Zeiser, R., Negrin, R. S. (2008) Interleukin-2 receptor downstream events in regulatory T cells: implications for the choice of immunosuppressive drug therapy. *Cell Cycle* **7**, 458–462.
52. Quezada, S. A., Peggs, K. S., Curran, M. A., Allison, J. P. (2006) CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* **116**, 1935–1945.
53. Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V., Bettelli, E. (2007) Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin. Immunol.* **19**, 362–371.
54. Oukka, M. (2008) Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Ann. Rheum. Dis.* **67** (Suppl. 3), iii26–iii29.
55. Seder, R. A., Darrah, P. A., Roederer, M. (2008) T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 247–258.

KEY WORDS:

dendritic cells · CD26 · T cell activation · Th1 · CD45RA/CD45RO · Foxp3

Resultats 3.3. La major producció d' α -Defensines 1-3 per les cèl·lules dendrítiques d'individus infectats pel VIH s'associa a una menor progressió de la malaltia.

Marta Rodríguez-García^{1,2R}, Núria Climent^{1,2}, Harold Oliva^{1,2}, Víctor Casanova^{3,4}, Rafael Franco^{3,4,5,6}, Agathe Leon^{2,7}, Jose' M. Gatell^{2,7}, Felipe García^{2,7}, Teresa Gallart^{1,2*}

1 Services of Immunology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain, 2 Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)-AIDS Research Group, and Catalanian Center for HIV Vaccines (HIVACAT), Barcelona, Spain, 3 Hospital Clínic de Barcelona, University of Barcelona School of Medicine, Barcelona, Spain, 4 Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Barcelona, Spain, 5 Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain, 6 Centro de Investigación Médica Aplicada, University of Navarra, Pamplona, Spain, 7 Infectious Diseases and AIDS Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.

Les defensines són pèptids antimicrobians endògens amb una potent activitat anti-VIH i efectes immunomoduladors. Recentment s'ha demostrat la capacitat de les cèl·lules dendrítiques immadures (iDCs) per a secretar aquests pèptids i la capacitat d'aquests per a modular la generació i maduració de les cèl·lules dendrítiques. Donat que les interaccions entre la dendrítica i el VIH són claus durant les primeres etapes de la infecció, en aquest treball s'ha estudiat el possible impacte de la producció d' α -defensines 1-3 en la progressió de la malaltia.

S'ha observat que la producció d' α -Defensines 1-3 es troba incrementada en les iDCs de pacients infectats amb el VIH, comparat amb donants sans. Aquestes diferències es deuen sobretot a l'increment observat en el grup de pacients controladors, mentre que els no controladors no mostraren diferències significatives amb els individus sans. Els nivells d' α -defensines 1-3 secretats per les iDCs es correlacionaren amb els nivells de CD4⁺ en pacients controladors, mentre que no es va observar aquesta correlació en pacients no controladors. A més, independentment del seu estat clínic, els pacients les iDCs dels quals mostraren més secreció d' α -defensines 1-3 mostraren també una menor progressió de la malaltia, mesurada com a absència de caigudes per sota dels 350 CD4⁺/mm³, menors increments de la càrrega viral i no iniciar tractament al llarg del temps. En clar contrast, els nivells plasmàtics d' α -defensines 1-3 no mostraren cap relació amb paràmetres immunològics o virològics.

Aquests resultats suggereixen que una elevada producció d' α -defensines 1-3 per part de les iDCs podria ser considerat un factor de protecció envers la progressió de la infecció per

VIH, suggerint implicacions diagnòstiques, terapèutiques o preventives. Aquest rol protector podria venir donat per la capacitat d'aquests pèptids d'inactivar els virions abans o durant la seva interacció amb les cèl·lules dendrítiques. Això afavoriria un millor processament viral i presentació antigènica a les cèl·lules T CD4⁺, disminuint la transmissió de la infecció a aquestes cèl·lules.

Increased α -Defensins 1-3 Production by Dendritic Cells in HIV-Infected Individuals Is Associated with Slower Disease Progression

Marta Rodríguez-García^{1,2*}, Núria Climent^{1,2,3}, Harold Oliva^{1,2,3}, Víctor Casanova^{3,4}, Rafael Franco^{3,4,5,6}, Agathe Leon^{2,7}, José M. Gatell^{2,7}, Felipe García^{2,7}, Teresa Gallart^{1,2*}

1 Services of Immunology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)-AIDS Research Group, and Catalanian Center for HIV Vaccines (HIVACAT), Barcelona, Spain, **3** Hospital Clínic de Barcelona, University of Barcelona School of Medicine, Barcelona, Spain, **4** Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Barcelona, Spain, **5** Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **6** Centro de Investigación Médica Aplicada, University of Navarra, Pamplona, Spain, **7** Infectious Diseases and AIDS Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

Background: Defensins are natural endogenous antimicrobial peptides with potent anti-HIV activity and immunomodulatory effects. We recently demonstrated that immature dendritic cells (DC) produce α -defensins1-3 and that α -defensins1-3 modulate DC generation and maturation. Since DC-HIV interaction plays a critical role during the first steps of HIV infection, we investigated the possible impact of α -defensins1-3 production by DC on disease progression.

Methodology/Principal Findings: Monocyte-derived DC (MDDC) were analyzed comparatively in healthy controls (HC) and HIV-infected patients, including untreated "elite" and "viremic" controllers, untreated viremic non-controllers and antiretroviral-treated patients. We found that production of α -defensins1-3 was significantly increased in MDDC from HIV-infected patients versus HC, and this increase was mainly due to that observed in controllers, while in non-controllers the increase was not statistically significant (controllers vs. HC, $p < 0.005$; controllers vs. non-controllers $p < 0.05$). Secreted α -defensins1-3 by immature MDDC positively correlated with CD4 T cell counts in controllers, but not in non-controllers. Moreover, independently of their clinical classification, HIV-infected patients with higher α -defensins1-3 secretion by immature MDDC showed slower disease progression, measured as no decrease in the number of CD4+ T-cells below 350 cell/mm³, lower increase of plasma viral load and no initiation of treatment over time. Plasma alpha-defensins1-3 levels lacked any relationship with immunologic and virologic parameters.

Conclusions/Significance: High production of α -defensins1-3 by immature DCs appears as a host protective factor against progression of HIV-1 infection, suggesting potential diagnostic, therapeutic and preventive implications. This protective effect may arise from the activity of α -defensins1-3 to damage the virions prior and/or after their internalization by immature DC, and hence favoring a more efficient viral processing and presentation to HIV-specific CD4+ T cells, without or with a minor rate of transmission of infectious HIV-1 virions.

Citation: Rodríguez-García M, Climent N, Oliva H, Casanova V, Franco R, et al. (2010) Increased α -Defensins 1-3 Production by Dendritic Cells in HIV-Infected Individuals Is Associated with Slower Disease Progression. PLoS ONE 5(2): e9436. doi:10.1371/journal.pone.0009436

Editor: Esper Georges Kallas, University of Sao Paulo, Brazil

Received: July 6, 2009; **Accepted:** January 20, 2010; **Published:** February 25, 2010

Copyright: © 2010 Rodríguez-García et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was mainly supported by Research Grants FIS2003-1200 and FIS2006-1259 (T.G.) from the Spanish Ministry of Health. Additional support was also received from the research grants SAF2005-05566 (J.M.G.) from the Spanish Ministry of Education and Science, FIPSE36536-2005 (T.G.), the Foundation for the Investigation and Prevention of AIDS in Spain, ISCIII-RETIC RD06/006 from the Spanish Cooperative Network of AIDS Research Groups from the Ministry of Health (J.M.G., F.G., T.G.), and FIPSE36750 (R.F.). "Prof. Maximo Soriano Foundation" contributed in the financial support of the PhD studies of H.A. This Foundation honors the memory of Maximo Soriano, a full Professor of Medicine of the Faculty of Medicine of the University of Barcelona. It is totally academic and aimed to promote biomedical and clinical research in the field of infectious diseases. M.R.-G. is the recipient of a research award "Emili Letang" (Hospital Clínic, Barcelona). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: TGALLART@clinic.ub.es

‡ Current address: The Ragon Institute of Massachusetts General Hospital, Massachusetts Institute of Technology, and Harvard, Boston, Massachusetts, United States of America

‡ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Defensins are natural endogenous antimicrobial peptides with potent anti-HIV-1 activity [1,2]. According to structural characteristics, two subfamilies of defensins exist in humans, α - and β -defensins, both with anti-HIV activity [3]. Neutrophils are the

main cellular source for α -defensins1-3, which are also designated human neutrophil peptides (HNP1-3) [4], although other leukocyte subsets also produce them [2,5–7]. Apart from their direct anti-HIV-1 effect [5,8–10], α -defensins1-3 display multiple immunostimulatory activities [11], including chemoattraction of naive T cells and immature dendritic cells (imDCs) [12], induction of cytokine

and chemokine production [13–15] and modulation of the expression of HIV receptors and coreceptors [16].

Recently, we demonstrated that immature (im) monocyte-derived DC (MDDC) from healthy individuals produce α -defensins1-3 [17] and that α -defensins1-3 are able to modulate the maturation and differentiation process of MDDC [18]. MDDC are a valid and widely used *in vitro*-generated model of myeloid DCs [19–23].

Myeloid or classical DC are key cells for the generation and regulation of the adaptive immune T-cell responses. They are the most potent professional antigen-presenting cells, unique in their capacity to induce the antigen-specific activation of naïve CD4 and CD8 T cells *in vivo* and *in vitro*, as well as in their ability to induce the response of CD8 T cells via MHC-class I molecules to exogenous non-infectious pathogens, a process called cross-priming or cross-presentation [24–28]. Immature myeloid DCs are cells specialized in internalizing exogenous components that reside in the skin, mucosal territories and other non-lymphoid tissues, where they act as sentinels to detect invading pathogens and foreign antigens. Once they engulf a pathogen or an antigen in an inflammatory microenvironment, undergo a process of maturation and migration to proximal lymphoid tissues, where they appear as the interdigitating DC in the T-cell areas, and contact with antigen-specific T cells and induce their activation [24–28]. Immature myeloid DC such as Langerhans cells in the mucosal epithelium and interstitial DC in the subepithelial mucosal tissues are thought to be the first cell types that contact with HIV-1, which exploits the biology of DCs to spread the infection to HIV-1-specific and HIV-1-nonspecific CD4 T cells [29–31]. Nevertheless, DCs are required for induction of T-cell responses to intracellular pathogens [32], and the capacity of DCs loaded with infectious and non-infectious HIV-1 virions to activate naïve HIV-1-specific CD4 and CD8 T cells has been recently demonstrated *in vitro* [33]. Therefore, the initial contact of HIV-1 with DCs can result in opposite outcomes, either beneficial in inducing strong HIV-specific T-cell responses or deleterious in promoting the spread and dissemination of HIV-1 among HIV-specific and HIV-nonspecific CD4 T-cells, leading to the progressive depletion of CD4 T cells that characterize the natural history of chronic HIV-1 infection. In that setting, given the strong anti-HIV activity of α -defensins1-3, we hypothesized that a high production of α -defensins1-3 by immature DC could contribute to determine a beneficial outcome of the HIV-1-DC interaction that would involve increased and optimal HIV-1-specific T-cell responses, which in turn would retard the progression of the disease. To gain insight about this hypothesis, *in vitro* generated immature and mature MDDC were analyzed for their capacity to produce α -defensins 1-3 comparatively in healthy controls (HC) and HIV-infected patients, including untreated “elite” and “viremic” controllers, untreated viremic non-controllers and anti-retroviral-treated patients.

Materials and Methods

Study Subjects

1. Ethics statement. Patients and control subjects were recruited at the Hospital Clinic Universitari, Barcelona, after an informed consent, following the approved rules of the Clinical Research and Ethics Committee of our Institution. **2. Characteristics.** The study included healthy, non-infected controls (HC) and HIV-1-infected subjects. The HIV-1-infected individuals were classified as: elite controllers, with plasma viral loads (PVLs) below 50 RNA copies/ml in all the determinations in the absence of therapy; viremic controllers, with PVLs higher than 50 and lower than 5000 RNA copies/ml without therapy [34]; viremic non-controllers, patients with PVLs higher than 5000 RNA copies/ml without therapy; patients with antiretroviral therapy. All patients had CD4 T cell counts higher than 450 cell/mm³. The characteristics of the patients are shown in table 1.

Generation of Monocyte-Derived Dendritic Cells (MDDC)

MDDCs were generated from human monocytes as previously reported [15,17,35,36] from volunteer healthy donors or HIV-1-infected patients. Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated immediately after venous blood extraction by standard Ficoll density gradient centrifugation, and then incubated in cell culture dishes for 2 h at 37°C, resuspended at a concentration of 3 million PBMC per ml in serum-free X-VIVO15 culture medium (BioWhittaker, Cambrex) supplemented with 1% of AB human serum. Adherent cells ($\geq 95\%$ CD14+) were washed (3x) in pre-warmed (at 37°C) serum-free X-VIVO10 medium (BioWhittaker, Cambrex), and then differentiated to immature MDDC in a cell culture for 5 days in a total volume of 6 ml of complete DC medium, consisting of serum-free X-VIVO15 (BioWhittaker, Cambrex), containing a final concentration of 1,000 units/ml IL-4 (Strathmann Biotec AG, Hamburg, Germany) and 1,000 units/ml of GM-CSF (Peprotech, London, UK). IL-4 and GM-CSF at the same indicated concentration were added at days 0, 3 and 5. Complete X-VIVO-15 medium was also supplemented with 1% human AB serum, 50 μ g/ml gentamycin (Braun B.) and 2.5 μ g/ml fungizone (Bristol-Myers Squibb). To obtain mature MDDC, a cocktail of proinflammatory cytokines [17,18], containing IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (1000 U/ml) and TNF- α (1000 U/ml) (Strathmann Biotec AG) was added on day 5, and the cell culture prolonged for two days. The purity and immunophenotype of immature and mature MDDC was assessed by flow cytometry analysis using commercially labeled monoclonal antibodies (mAbs) against surface markers (See below, “Flow Cytometry”).

Real Time RT-PCR

The expression of α -defensins1-3 mRNA was evaluated by real time RT-PCR in immature and mature MDDC as previously

Table 1. Characteristics of the patients included in the study.

Characteristic	ELITE (n = 4)	VC (n = 15)	VNC (n = 11)	HAART (n = 9)
Sex (male/female)	3/1	9/6	11/0	9/0
Geographic origin (Europe/Other)	3/1	12/3	9/2	8/1
Age Mean (min-max)	47.5 (41–63)	37.6 (26–54)	36.2 (28–59)	41.1 (26–56)
CD4 T cell counts (cell/micr)	803 \pm 275.6	741 \pm 114	595 \pm 170	780 \pm 225
HIV load (log copies/ml)	1.69 \pm 0	3.11 \pm 0.41	4.23 \pm 0.36	2.41 \pm 1.11

doi:10.1371/journal.pone.0009436.t001

described[17]. Total RNA was extracted with Trizol Reagent (Invitrogen Corporation, Paisley, Scotland), and cDNA generated as reported. The cDNAs were amplified using LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I kit (Roche, Penzberg, Germany). Real-time PCR was carried out for 45 cycles using the LightCycler instrument (Roche) and the specific primers (Sigma-Aldrich) described previously[17]. PBMC were used as a positive control[37]. To calculate relative levels of α -defensins1-3 mRNA, β -2-microglobulin mRNA levels were used as an endogenous control[36,38] to normalize mRNA quantities. Relative mRNA levels were calculated using this formula[39]: Relative mRNA expression = $2^{-(Ct\ of\ \alpha\text{-defensins}\ 1\text{-}3 - Ct\ of\ endogenous\ control)} \times 10^3$. All cDNA samples were amplified in duplicates.

ELISA

The levels of α -defensins1-3 in cell-free culture supernatants and plasmas were quantified using the commercial HNP 1-3 ELISA test Kit (Hycult biotechnology) following the manufacturer instructions. The supernatants of immature MDDCs were collected on day 5 of the cell culture of monocytes in the presence of IL-4 +GM-CSF, before adding the maturation cytokine cocktail. The supernatants of mature MDDC were collected two days after the addition of the maturation cocktail.

Flow Cytometry

The immunophenotype of immature and mature MDDCs was assessed by two-color flow cytometry using FITC- and PE-conjugated mAbs against CD14, CD80, CD83, CD86, CD11c, CD40 and HLA-DR (BD Biosciences). Also, CD3, CD19 and CD56 were used to assess the purity of the cell cultures, resulting to be lower than 2% of the total population. FITC- and PE-conjugated isotype-matched monoclonal antibodies of unknown specificity were used as negative controls.

Intracellular staining of α -defensins 1-3 was performed as described before with minor modifications [17]. Briefly, immature MDDCs were pretreated with monensin (Golgi Stop, BD Biosciences) for 8 h and surface stained with FITC-conjugated CD40 (BD Biosciences). MDDCs were then fixed and permeabilized with the Cytfix-Cytoperm Plus kit (BD Biosciences) for 20 min, incubated with biotinylated mouse mAb anti-human α -defensins 1-3 (Clone D21, Hycult Biotechnology, BD Bioscience) for 30 min and then with PE-conjugated streptavidin (1/1000, BD Biosciences) during 30 min. The negative control was FITC-conjugated isotype control (BD Biosciences) and biotin-conjugated mouse IgG1 isotype control (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA).

The cells were analyzed in a FACScan flow cytometer (Beckton Dickinson). Data obtained were analyzed with the FlowJo software (Tree Star, Inc. Ashland, OR). Expression of surface and intracellular markers was measured by the percentage of positive cells and the geometric mean fluorescence intensity.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the GraphPad Prism 5.0 software. The non-parametric tests U-Mann Whitney for the comparison of two groups or Kruskal-Wallis followed by Dunns post test for the comparison of more than two groups were used. For the analysis of the correlation the non-parametric test of Spearman was applied. The follow-up of patients for the analysis of mortality curves ended at the month when the event occurred or on April 15, 2009, whichever occurred first. The differences between the mortality curves were analyzed with the log-rank test. For all the tests used, a two sided P value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Increased α -Defensins1-3 Production by MDDC from HIV-Infected Subjects

To define the levels of α -defensins1-3 produced by immature and mature MDDC from HIV-negative healthy controls (HC) and HIV-1-infected patients, we first performed a comparative analysis of α -defensins1-3 secretion and mRNA relative expression between HC (n = 15) and HIV-infected patients (n = 39). Secreted levels in the culture supernatants were assessed by ELISA and mRNA expression by real time RT-PCR.

The immunophenotype of immature and mature MDDC was assessed in all individuals. Fig. 1A shows a typical representative flow cytometry analysis from a HC subject and an HIV-1-infected patient. As expected from our previous studies[17,18,36,40] with MDDC from HC, generated in the same conditions as in the current study, after 5 days of cell culture in the presence of GM-CSF and IL-4, monocytes had differentiated into immature MDDCs (imMDDC); these were mostly CD14-negative ($\geq 92\%$) and virtually all positive ($\geq 98\%$) for HLA-DR and also mostly positive for CD40, CD11c and CD86, while they lacked expression of CD80 and CD83, markers of mature DC immunophenotype. Maturation was induced by two additional days of culture in the presence of the maturation-cytokine cocktail (IL-1 β +IL-6+TNF- α). In accord with our previous studies mentioned above[17,18,36,40], the immunophenotype of mature MDDC (mMDDC) was characterized by an increase in the expression intensity of HLA-DR, CD40, CD86 and CD11c, and in the expression of CD80 and CD83 in a notable proportion of cells. The up-regulation of these markers is a typical feature of DC maturation and was observed in all the individuals included in the study.

As shown in Fig. 1B and 1C, we found that imMDDCs from HIV-negative HC produced higher levels of α -defensins1-3 than mature mMDDCs, in terms of both mRNA relative expression (Fig. 1B; $p < 0.02$) and levels secreted in the supernatants (Fig. 1C; $p < 0.04$). In most cases, α -defensins1-3 mRNA levels in mMDDCs from HC were undetectable or barely detectable. These findings in HC confirm our previous results with a smaller group of healthy individuals [17]. In HIV-infected patients, the production of α -defensins1-3 by imMDDC was also higher than in mMDDC as measured by both mRNA relative expression (Fig. 1B; $p < 0.0001$) and secreted levels in the supernatants (Fig. 1C; $p < 0.005$). The comparison between HC and HIV-infected patients showed that the production of α -defensins1-3 was significantly higher in HIV-infected patients than in HC subjects as assessed by both mRNA expression (Fig. 1B; $p < 0.005$) and secreted levels in the supernatants (Fig. 1C; $p < 0.0001$). Among HIV-1-infected patients, there was a higher number of individuals with detectable levels of mRNA in mMDDCs compared to HCs, but these levels were clearly lower than those found in imMDDCs (Fig. 1B, $p < 0.0001$).

Additionally, to confirm that the α -defensins1-3 secreted in the supernatants were constitutively produced by imMDDCs, intracellular expression of α -defensins1-3 was analyzed by flow cytometry (Fig. 1D). Immature MDDCs from HCs and HIV-infected patients were treated with monensin for 8 h to accumulate the α -defensins1-3 inside the cell. Flow cytometry analysis after monensin treatment revealed that $5.3 \pm 2.1\%$ of imMDDC from HCs contained intracellular α -defensins1-3, an expected finding given our previous study with healthy individuals [17]. In imMDDC from HIV-infected patients, the analysis of the intracellular expression of α -defensins1-3 showed a significant increase in the percentage of positive cells ($24 \pm 4.8\%$; figure 1D) as well as in the geometric mean intensity compared to HCs ($P < 0.02$; figure 1E). This higher expression of intracellular α -defensins1-3 in imMDDC of HIV-

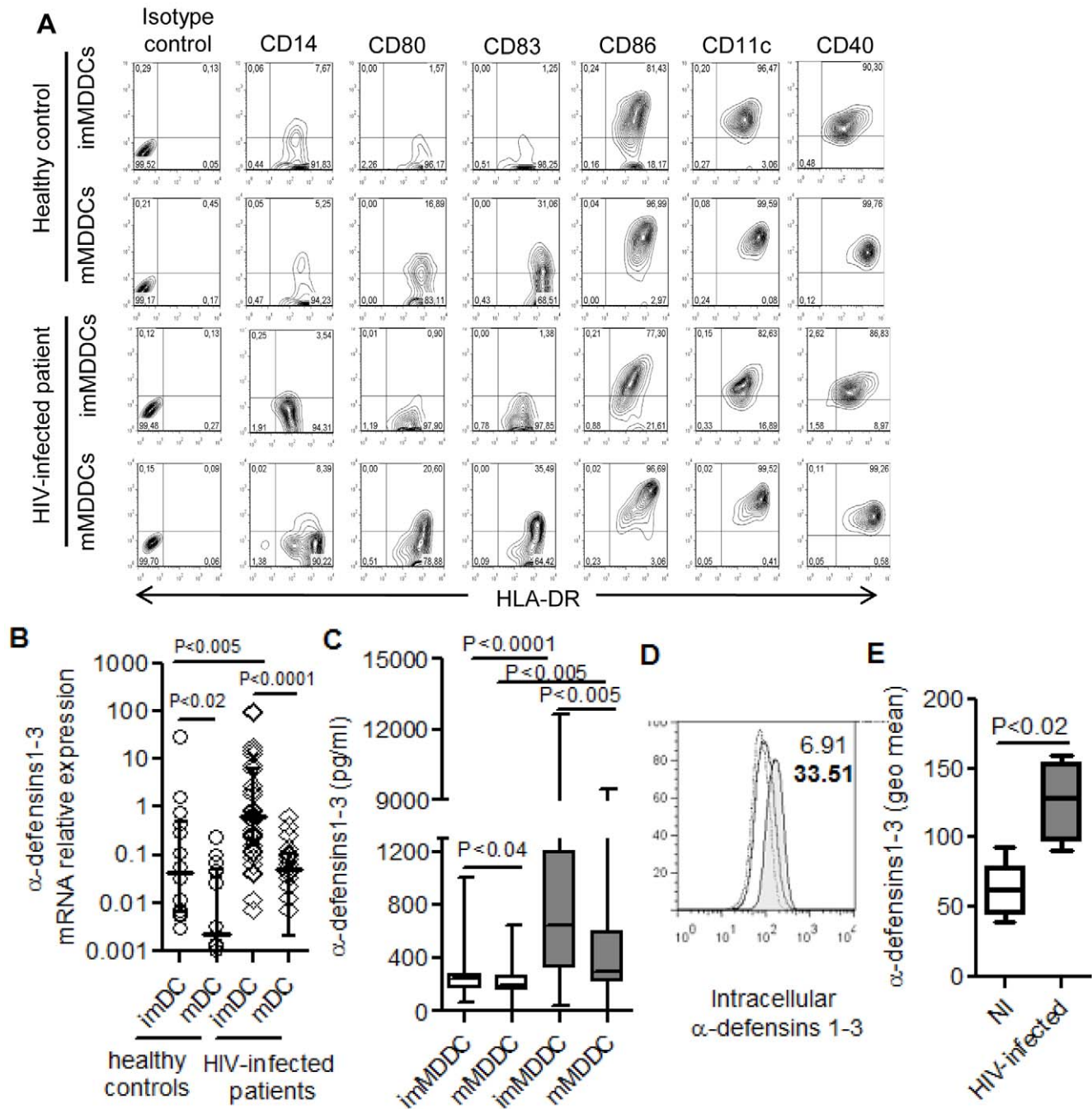


Figure 1. Production of α -defensins 1-3 by immature (im) and mature (m) MDDCs. (A) Immature and mature MDDC immunophenotype from one representative healthy control individual and one HIV-infected subject. X-axis represents HLA-DR expression and Y-axis represents the surface markers indicated. The percentage of positive cells are shown in each quadrant. (B) Relative expression of α -defensins 1-3 mRNA by real time RT-PCR in healthy control individuals ($n=15$; open circles) and HIV-infected subjects ($n=39$; open rhombus). Dots represent each patient and horizontal lines represent median \pm interquartile ranges. Undetectable samples from mMDDC in HC and HIV-infected patients are not represented in the figure. (C) Levels of α -defensins 1-3 detected in MDDC culture supernatants from healthy non-infected controls ($n=15$; white boxes) and HIV-infected subjects ($n=39$; grey boxes). Boxes represent interquartile ranges, horizontal lines inside each box indicate the median and whiskers indicate maximum and minimum values. (D) Intracellular staining and flow cytometry analysis of α -defensins 1-3 in immature MDDCs. MDDCs were treated with monensin for 8h and double-stained for CD40 and α -defensins 1-3. CD40 positive cells were selected and the histogram corresponds to positive cells for intracellular α -defensins 1-3. Histogram represents the isotype control (dots line), healthy control (open line) and HIV-infected subject (filled histogram). Numbers indicate the percent of positive cells for healthy control (normal number) or HIV-infected patient (bold numbers). Representative result of four different healthy controls and four HIV-infected patients. (E) Geometric mean fluorescence intensity for intracellular α -defensins 1-3 in non-infected individuals ($n=4$; white box) and HIV-infected subjects ($n=4$; grey box). Boxes represent interquartile ranges, horizontal lines inside each box indicate the median and whiskers indicate maximum and minimum values.

doi:10.1371/journal.pone.0009436.g001

infected patients compared to HC is in agreement with the higher levels of RNA expression and α -defensins1-3 secretion.

Since in both HIV-infected patients and HC subjects, imMDDC were the main α -defensins1-3-producing cells as compared to mMDDC, all the following analyses were done using imMDDC.

Increased α -Defensins1-3 Production by imMDDC in Controller versus Non-Controller HIV-Infected Patients

Given the increased production of α -defensins1-3 in the HIV-infected group, we next analyzed comparatively the different subgroups of HIV-infected subjects. These subgroups included (i) “elite controllers” with PVL persistently <50 RNA copies/ml; (ii) “viremic controllers” with PVL between 50 and 5000 RNA copies/ml; (iii) untreated chronic HIV-infected viremic subjects with PVL >5000 RNA copies/ml; and (iv) chronic HIV-infected patients receiving HAART.

The comparison between controllers (elite + “viremic” controllers) and non-controllers (untreated viremic + treated patients) showed a significantly higher secretion of α -defensins1-3 by imMDDC from those individuals able to spontaneously control the infection than in subjects with no control of the infection (fig. 2A; $p<0.05$). We also found that the secretion of α -defensins1-3 in the two controller groups was significantly higher than in HC subjects. In the non-controller groups this secretion remained slightly increased compared to HC but without statistical significance (Fig. 2B).

These data collectively indicate that α -defensins1-3 secretion by imMDDC is clearly increased in HIV-infected individuals who spontaneously control the infection.

Secreted Levels of α -Defensins1-3 by imMDDC Correlated with CD4 T Cell Counts but Not with PVL

We next examined the possible relationship between α -defensins1-3 secretion by imMDDC and two markers of disease

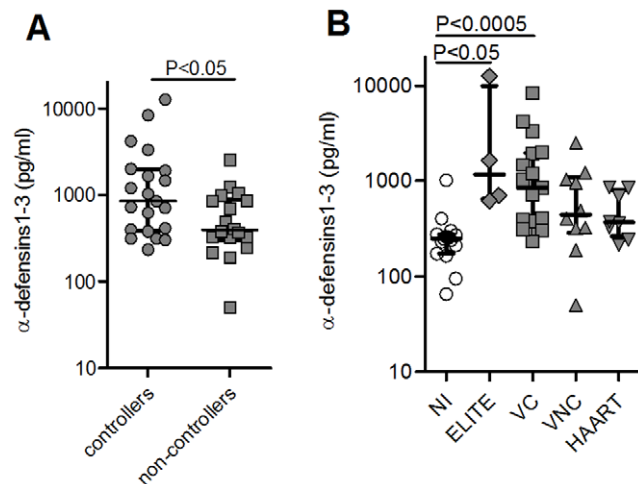


Figure 2. Levels of α -defensins 1-3 produced by imMDDC from HIV-infected individuals. (A) Comparison between the secreted levels of α -defensins 1-3 by imMDDC from HIV-controllers (elite controllers and viremic controllers; $n=19$) and HIV non-controllers (viremic non-controllers and patients with HAART; $n=20$). (B) Secreted levels of α -defensins 1-3 by imMDDC from healthy non-infected (NI; $n=15$), elite controllers (ELITE; $n=4$), viremic controllers (VC; $n=15$), viremic non-controllers (VNC; $n=11$) and patients receiving HAART (HAART; $n=9$). Dots indicate each patient and lines represent median \pm interquartile ranges.

doi:10.1371/journal.pone.0009436.g002

progression: CD4 T cell count and PVL. For this comparison we employed CD4 T cell counts and PVL found on the same date of blood extraction for generation of imMDDC.

In the whole cohort of HIV-infected patients, secreted α -defensins1-3 by imMDDC did not correlate with CD4 T cell counts (Fig. 3A). However, a positive correlation was found when the patients with HAART were eliminated from the analysis (Fig. 3B; Spearman $r=0.47$; $p<0.009$). In dividing the whole cohort between controllers and non-controllers, the correlation was only maintained in controllers (Fig. 3C; Spearman $r=0.58$; $p<0.009$), but not in non-controllers (Fig. 3D).

No correlation was found between PVL and levels of α -defensins1-3 secreted by imMDDC (Fig. 4A), even eliminating untreated patients from the analysis (fig. 4B) or separating controllers (Fig. 4C) from non-controllers (Fig. 4D).

Plasma Levels of α -Defensins1-3 Showed No Differences between Controllers and Non-Controllers HIV-Infected Patients

Given the lack of correlation between secreted α -defensins1-3 by imMDDC and PVL, we wanted to study whether plasma levels of α -defensins1-3, which are thought to be mainly neutrophil-derived [41], could show some relationship with immunologic and virologic parameters.

The plasma levels of α -defensins1-3 were determined using frozen plasma from 35 patients. No significant differences between the different groups of HIV-1-infected patients were found in the plasma levels of α -defensins1-3 (Fig. 5A). It is worth noting the different profile between plasma α -defensins1-3 levels and the levels secreted in the supernatant by imMDDC (Fig. 2C).

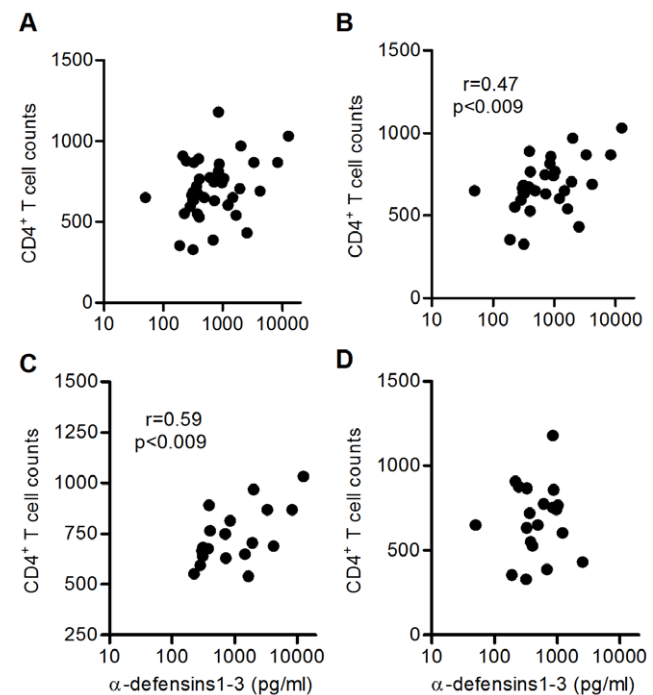


Figure 3. Positive correlation between secreted levels of α -defensins 1-3 by imMDDC and CD4 T cell counts. (A) HIV-infected patients ($n=39$), (B) patients not receiving HAART ($n=30$), (C) controllers (elite and viremic controllers; $n=19$), and (D) non-controllers (viremic non-controllers and patients with HAART; $n=20$). Spearman correlation test was applied.

doi:10.1371/journal.pone.0009436.g003

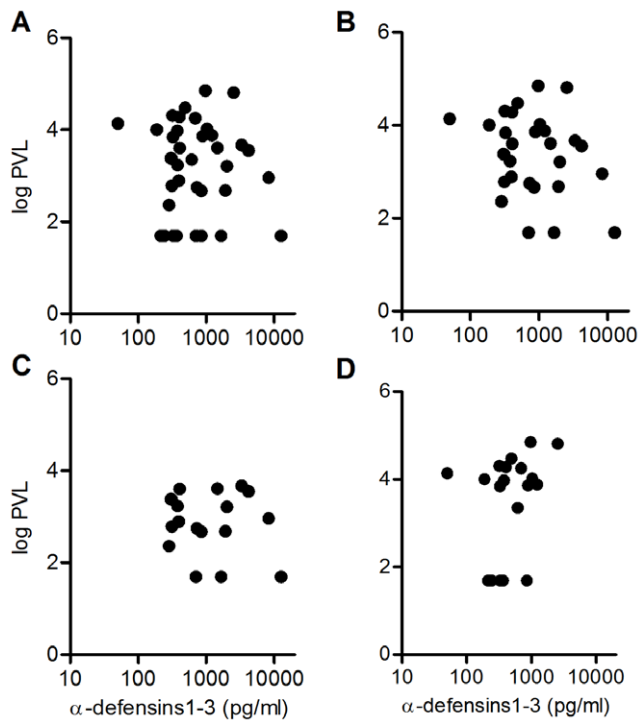


Figure 4. No correlation between secreted levels of α -defensins 1-3 by imMDDC and plasmatic viral load (PVL). (A) HIV-infected patients ($n=39$), (B) patients not receiving HAART ($n=30$), (C) controllers (elite and viremic controllers; $n=19$), and (D) non-controllers (viremic non-controllers and patients with HAART; $n=20$). Spearman correlation test was applied. doi:10.1371/journal.pone.0009436.g004

Furthermore, the analysis of the possible relationship between plasma levels of α -defensins1-3 and CD4 T cell counts or PVL lacked any correlation (Fig. 5B and Fig 5C), even after eliminating the patients with HAART or separating controllers from non-controllers for the analysis (data not shown).

To test the possible influence of the evolution of the disease in the levels of α -defensins1-3 in plasma, two samples separated in time were analyzed for every patient. The results of this analysis are shown in Fig. 5D. No significant differences were observed between plasma levels of α -defensins 1-3 in the two different determinations in patients that remained controllers (Fig. 5D, white boxes). Similarly, no significant differences were found in those patients that were controllers in the first determination but lost viremic control in the second one (Fig. 5D, grey pointed boxes), controller patients in the first determination with disease progression and receiving HAART in the second one (Fig. 5D; grey boxes), and patients receiving HAART during both determinations (Fig. 5D; grey lined boxes).

These data indicate that the differences found in the levels of α -defensins1-3 secreted by imMDDC were independent of plasma levels of these molecules.

Higher Secretion of α -Defensins1-3 by imMDDC from HIV-Infected Patients Was Associated with Slower Disease Progression

To analyze the possible association of secreted levels of α -defensins1-3 by imMDDC from HIV-infected patients with the risk of disease progression, the untreated patients were separated in two groups: those with levels of secretion over the median of the

whole group (650 pg/ml) (hereafter “high secretors”) and those with levels below this median value (hereafter “low secretors”). The median was utilized instead of the mean because it is less influenced by extreme values. Decrease in the number of CD4 T cells, increase in the PVL, and initiation of treatment were considered as indicators of disease progression and were analyzed over time by applying the log-rank test. The percent of patients with a decrease in the number of CD4 T cells below 350 counts over time was analyzed. This decrease in the number of CD4 T cells constitute a critical point to consider treatment according to current guidelines [42,43]. As shown in fig. 6A, 45% of low α -defensins1-3-secretor patients suffered this CD4 T-cell decrease, while it did not occur in the high α -defensins1-3-secretor patients ($p<0.035$; HR = 8.9).

In addition, an increase in PVL greater than 0.5 log occurred in all low α -defensins1-3-secretor patients, versus 65% of high secretors (fig. 6B; $p<0.04$; HR = 2.67). Furthermore, 31% of low secretor patients without treatment at the beginning of the study initiated HAART during the follow-up, while none of the high α -defensins1-3-secretors initiated treatment (fig. 6C; $p<0.05$; HR = 10).

Taken together these data indicate that those individuals with higher secretion of α -defensins1-3 by imMDDC had a lower risk of disease progression.

Discussion

In this study we have investigated the production of α -defensins1-3 by immature DC of HIV-infected patients and their possible impact on the disease progression rate. As far as we know, no other studies have approached this issue. Our results revealed that immature DC from HIV-infected patients produced higher levels of α -defensins1-3 than the non-infected control group and these levels were associated with a better control of HIV infection and slower disease progression.

Although the anti-HIV activity of α -defensins1-3 has been clearly demonstrated *in vitro* [5,8–10,15,44], their possible protective role during HIV infection *in vivo* remains uncertain. Very few studies [5,45–50] have analyzed α -defensins1-3 at different anatomical sites in low risk healthy controls and HIV-infected subjects to try to determine the physiological and pathological levels of these molecules. For our study we used MDDC, a valid model of *in vivo* myeloid DC [20,22,23]. Due to their mucosal localization, myeloid DC *in vivo* are thought to be one of the first cells that encounter the HIV and, after migration to the lymph nodes, would mediate the transmission of HIV-1 virions to CD4 T cells, the main source of HIV-1 replication and dissemination [30]. These *in vivo* myeloid DC might be one of the key cells involved in early HIV infection, and therefore their capacity to produce and release α -defensins1-3 by DC may have physiological relevance.

Our HIV-infected patients included controllers and non-controllers to study the behavior of α -defensins1-3 secretion during opposite situations. The study of controller patients, especially elite controllers, is of particular relevance since these individuals demonstrate that natural control of HIV replication in the absence of antiretroviral therapy is possible [51]. Therefore, the characterization of the protective factors that contribute to this controller state will provide valuable information for new therapeutic approaches.

We found that immature DC from individuals that spontaneously control the infection (i.e. elite controllers and “viremic” controllers) produced higher levels of α -defensins1-3 than the non-controller group (i.e. viremic and treated patients). This higher production occurred in a constitutive manner, in the absence of

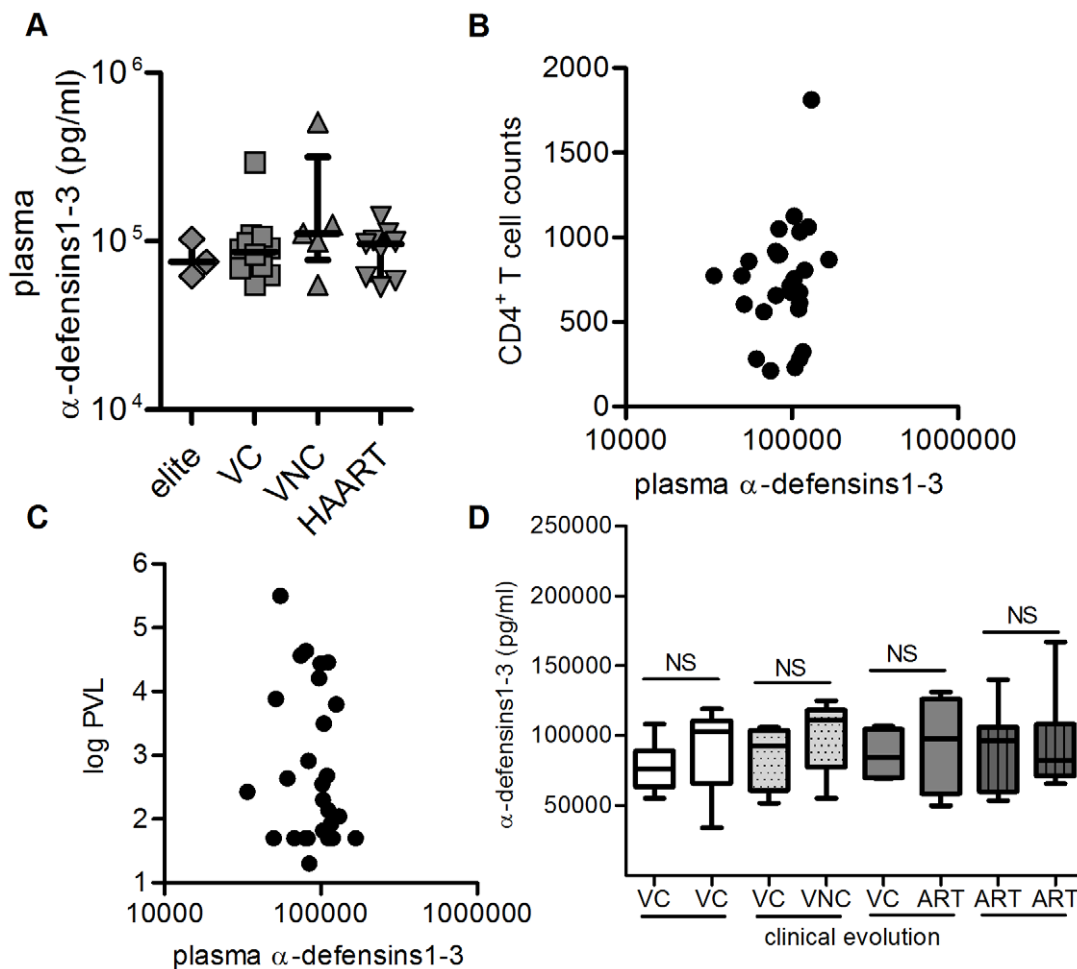


Figure 5. Analysis of plasma levels of α -defensins 1-3. (A) Plasma levels of α -defensins 1-3 detected in the different groups of HIV-infected patients, elite controllers (ELITE; $n=3$), viremic controllers (VC; $n=10$), viremic non-controllers (VNC; $n=5$) and patients receiving HAART (HAART; $n=9$). Dots indicate each patient and lines represent median \pm interquartile ranges. (B) Correlation between CD4 T cell counts and plasma levels of α -defensins 1-3. (C) Correlation between PVL and plasma levels of α -defensins 1-3. (D) Plasma levels of α -defensins 1-3 in two different determinations over time in patients that remained controllers (VC-VC; white boxes; $n=13$), patients that were controllers in the first determination but lost viremic control in the second one (VC-VNC; grey pointed boxes; $n=5$), controller patients in the first determination with disease progression and HAART in the second one (VC-ART; grey boxes; $n=8$) and patients receiving HAART during both determinations (ART-ART; grey lined boxes; $n=9$). Boxes represent interquartile ranges, horizontal lines inside each box indicate the median and whiskers indicate maximum and minimum values. Mann-Whitney test was applied for the statistical analysis of every pair and the differences were not significant (NS). doi:10.1371/journal.pone.0009436.g005

any *in vitro* stimulation, a characteristic of innate immune mechanisms[52,53]. Patients with high viremia and patients with undetectable viremia due to antiretroviral therapy produced similar levels of α -defensins1-3, indicating that low PVL alone was not responsible for the increased levels of secreted α -defensins1-3 in controllers. It is worth noting that all selected patients were matched to have conserved levels of CD4 T cells, so the differences observed were not attributable to distinct degrees of immunodeficiency.

We also found that secreted levels of α -defensins1-3 by imMDDC positively correlated with CD4 T cell counts, a parameter of disease progression. However, this correlation was only found in untreated patients and especially in the controller group, but not in non-controllers, even though all selected patients had similar CD4 T cell counts, providing evidence of a relationship between higher α -defensins1-3 production by DC and better immunological state. Interestingly, no correlation was found between PVL and secreted α -defensins1-3 by MDDC. In agree-

ment with our results, in other studies no correlation was found between PVL and α -defensins1-3 expression in lymph nodes[48] or PVL and levels of α -defensins1-3 in breast milk[46].

It should be noted that the analysis of plasma levels of α -defensins1-3 did not show differences between groups of patients. High levels of plasma α -defensins1-3 in humans have only been found during acute infectious processes, such as sepsis, bacterial meningitis or intrauterine infections [54]. Furthermore, we did not observe any correlation between plasma levels of α -defensins1-3 and CD4 T cell counts or PVL. This is not contradictory with our results with MDDC since α -defensins1-3 detected in plasma are mainly secreted by neutrophils[41]. The possible association between plasma levels of α -defensins1-3 and neutrophil activation was not analyzed in our study, but it has been previously found in pregnant and post-partum women [55]. Furthermore, Baroncelli *et al* [45], reported a marked increased in α -defensins1-3 plasma levels only two weeks after SIV post-infection of macaques, which coincided with the peak of viral replication, but following the acute

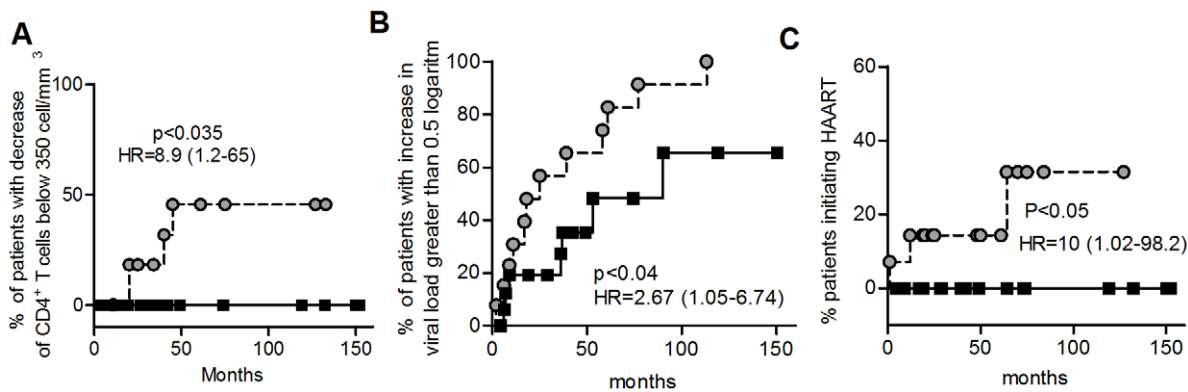


Figure 6. Levels of α -defensins 1-3 secreted by imMDDC were associated with indicators of disease progression. Patients without treatment at the moment of blood extraction for the differentiation of MDDC were divided in two groups according to their secreted levels of α -defensins 1-3 by imMDDC. Levels higher than the median (650 pg/ml) of the whole group of patients (black squares; $n=18$) and secreted levels lower than the median (grey circles; $n=12$). (A) Percentage of patients with a decrease in the number of CD4 T cells below 350 cell/mm^3 during follow up time (months). (B) Percentage of patients with an increase in PVL greater than 0.5 logarithms and (C) percentage of patients without HAART at the moment of determination of α -defensins 1-3 levels but started treatment later during the follow up. P values and hazard ratio (HR) with 95% confidence interval values are represented in the figure. Log-Rank test was used to determine statistical differences between curves. doi:10.1371/journal.pone.0009436.g006

phase of infection the levels of α -defensins1-3 decreased. Therefore, it would be conceivable that no differences were found in the plasma levels of α -defensins1-3 in our chronically-infected patients.

The results found in the analysis of disease progression markers over time further support that a higher production of α -defensins1-3 by immature DC acts as a protective host factor against disease progression. Indeed, regardless their clinical classification, HIV-1-infected patients with higher α -defensins1-3 secretion by immature MDDC showed a delayed disease progression, measured as no decrease in the number of CD4+ T-cells below 350 cell/mm^3 , lower increase in PVL and no initiation of treatment. The association with a decrease in CD4 T cells below 350 cell/mm^3 is especially relevant since this CD4 T-cell count constitutes a critical point to decide the starting of treatment[42,43]. The possibility of a genetic predisposition for a higher production of α -defensins1-3 deserves further studies. In fact, the genes encoding for α -defensins1-3 map in a cluster on chromosome 8p23.1 and have been demonstrated to vary in their copy number between individuals[56–59]. In this line, recent studies reported higher copy number of the β -defensins HBD-2 and HBD-3 mRNA in oral mucosa from exposed seronegative (ESN) than healthy controls [60] and lower copy number of the gene DEFBI04 in HIV-infected than ESN children[61].

In vivo, different immature myeloid DC subsets, such as Langerhans cells and interstitial DC, are found positioned in mucosal territories where the natural HIV-1 infection and dissemination occurs. The production of α -defensins1-3 by these *in vivo* myeloid DC subsets has not been investigated, an issue that deserves further investigation. Even though the levels of α -defensins1-3 secreted by imMDDC did not reach the described concentration for direct inactivation of the virus [8], there is the possibility that the amount of α -defensins1-3 produced by these *in vivo* myeloid DC subsets is higher than that produced by our imMDDC. In this regard, it is worth noting that we have recently compared directly isolated circulating myeloid DC (CD1c+ CD19-) and *in vitro* generated imMDDC of the same donors for secretion of α -defensins1-3, and we found that the former secreted a 10-fold higher amount than the latter (M Escribese et al, manuscript in preparation). On the other hand, it is also plausible that *in vivo* the

virus would be internalized by immature DC and be localized in intracellular compartments where the concentration of defensins might be locally higher than the levels secreted by imMDDC. Moreover, the reported concentration necessary for direct inactivation of the virus [8] was determined *in vitro* using CD4 T cells for the assays. As it is well known, compared to CD4 T cells, immature myeloid DCs are poorly permissive to HIV-1- replication and therefore it is likely that the concentration of α -defensins1-3 necessary to inhibit the productive infection of DCs is lower than the concentration previously reported to be required using CD4 T cells.

It would be conceivable that a high production of α -defensins1-3 by immature DC could act by damaging the virus prior or after its internalization. This would favor a more efficient viral processing and presentation to CD4+ T cells with a minor rate of infectious HIV transmission. In addition, α -defensins1-3 have important immunoregulatory properties[2,12,13,15,18], that might modulate HIV replication and immune cell responses in a complex manner, influencing the natural history of HIV infection. Further studies with larger cohorts of HIV-1-infected patients are required to confirm our observations.

In conclusion, we demonstrate that DC from HIV-infected patients that spontaneously control the infection produced higher levels of α -defensins1-3, which positively correlated with CD4 T cell counts and were associated with slower progression. Our results open a new line of investigation and future studies will be needed to determine the possible value of α -defensins1-3 as a diagnostic or therapeutic tool.

Acknowledgments

We thank Dr. Daniel Kavanagh for helpful suggestions in revising the manuscript. We thank C. Rovira and L. Miralles for their invaluable technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TG. Performed the experiments: MRG VC. Analyzed the data: MRG NC HO VC RF AL JMG FG TG. Contributed reagents/materials/analysis tools: MRG NC HO VC RF AL JMG FG TG. Wrote the paper: MRG TG.

References

- Chang TL, Klotman ME (2004) Defensins: natural anti-HIV peptides. *AIDS Rev* 6: 161–168.
- Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ (2004) Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* 22: 181–215.
- Klotman ME, Chang TL (2006) Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 6: 447–456.
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, et al. (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76: 1427–1435.
- Mackiewicz CE, Yuan J, Tran P, Diaz L, Mack E, et al. (2003) alpha-Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *AIDS* 17: F23–F32.
- Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, et al. (2000) The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 96: 3086–3093.
- Chalifour A, Jeannin P, Gauchat JF, Blaecke A, Malissard M, et al. (2004) Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 104: 1778–1783.
- Chang TL, Francois F, Mosoian A, Klotman ME (2003) CAF-mediated human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transcriptional inhibition is distinct from alpha-defensin-1 HIV inhibition. *J Virol* 77: 6777–6784.
- Chang TL, Vargas J, Jr., DelPortillo A, Klotman ME (2005) Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *J Clin Invest* 115: 765–773.
- Zhang L, Yu W, He T, Yu J, Caffrey RE, et al. (2002) Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* 298: 995–1000.
- Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 710–720.
- Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ (2000) Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 68: 9–14.
- Chaly YV, Paleolog EM, Kolesnikova TS, Tikhonov II, Petratchenko EV, et al. (2000) Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur Cytokine Netw* 11: 257–266.
- Vaschetto R, Grinstein J, Del Sorbo L, Khine AA, Voglis S, et al. (2007) Role of human neutrophil peptides in the initial interaction between lung epithelial cells and CD4+ lymphocytes. *J Leukoc Biol* 81: 1022–1031.
- Guo CJ, Tan N, Song L, Douglas SD, Ho WZ (2004) Alpha-defensins inhibit HIV infection of macrophages through upregulation of CC-chemokines. *AIDS* 18: 1217–1218.
- Furci L, Sironi F, Tolazzi M, Vassena L, Lusso P (2007) {alpha}-defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4. *Blood* 109: 2928–2935.
- Rodriguez-Garcia M, Oliva H, Climent N, Garcia F, Gatell JM, et al. (2007) Human immature monocyte-derived dendritic cells produce and secrete alpha-defensins 1-3. *J Leukoc Biol* 82: 1143–1146.
- Rodriguez-Garcia M, Oliva H, Climent N, Escobedo MM, Garcia F, et al. (2009) Impact of alpha-defensins1-3 on the maturation and differentiation of human monocyte-derived DCs. Concentration-dependent opposite dual effects. *Clin Immunol* 131: 374–384.
- Lee AW, Truong T, Bickham K, Fonteneau JF, Larsson M, et al. (2002) A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 20 Suppl 4: A8–A22.
- Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C (2007) Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26: 519–531.
- Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C (2008) Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol* 20: 52–60.
- Rinaldo CR (2009) Dendritic cell-based human immunodeficiency virus vaccine. *J Intern Med* 265: 138–158.
- Steinman RM, Banchereau J (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449: 419–426.
- Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245–252.
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20: 621–667.
- Larsson M, Fonteneau JF, Bhardwaj N (2003) Cross-presentation of cell-associated antigens by dendritic cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 276: 261–275.
- Lanzavecchia A, Sallusto F (2001) Regulation of T cell immunity by dendritic cells 21. *Cell* 106: 263–266.
- Wu L, Liu YJ (2007) Development of Dendritic-Cell Lineages. *Immunity* 26: 741–750.
- McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, et al. (2003) Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300: 1295–1297.
- Wu L, KewalRamani VN (2006) Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 6: 859–868.
- Yu HJ, Reuter MA, McDonald D (2008) HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS Pathog* 4: e1000134.
- Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los SK, et al. (2002) In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17: 211–220.
- Lubong Sabado R, Kavanagh DG, Kaufmann DE, Fru K, Babcock E, et al. (2009) In Vitro Priming Recapitulates In Vivo HIV-1 Specific T Cell Responses, Revealing Rapid Loss of Virus Reactive CD4+ T Cells in Acute HIV-1 Infection. *PLoS ONE* 4: e4256.
- Garcia F, Plana M, Soriano A, Vidal C, Arnedo M, et al. (2001) Predictors of progression in chronically infected naive patients with plasma viraemia below 5000 copies/ml and CD4 T lymphocytes greater than 500×10(6)/L. *AIDS* 15: 131–133.
- Garcia F, Lejeune M, Climent N, Gil C, Alcami J, et al. (2005) Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. *J Infect Dis* 191: 1680–1685.
- Pacheco R, Oliva H, Martinez-Navio JM, Climent N, Ciruela F, et al. (2006) Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. *J Immunol* 177: 6695–6704.
- Fang XM, Shu Q, Chen QX, Book M, Sahl HG, et al. (2003) Differential expression of alpha- and beta-defensins in human peripheral blood. *Eur J Clin Invest* 33: 82–87.
- Izaguirre A, Barnes BJ, Amrute S, Yeow WS, Megjugorac N, et al. (2003) Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 74: 1125–1138.
- O'Garra A, Howard M (1992) IL-10 production by CD5 B cells. *Ann N Y Acad Sci* 651: 182–199.
- Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, et al. (2005) CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9583–9588.
- Ganz T (1987) Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 55: 568–571.
- Kitahata MM, Gange SJ, Abraham AG, Merriman B, Saag MS, et al. (2009) Effect of Early versus Deferred Antiretroviral Therapy for HIV on Survival. *N Engl J Med* 360: 1815–1826.
- When To Start Consortium, Sterne JA, May M, Costagliola D, de Wolf F, Phillips AN, et al. (2009) Timing of initiation of antiretroviral therapy in AIDS-free HIV-1-infected patients: a collaborative analysis of 18 HIV cohort studies. *Lancet* 373: 1352–1363.
- Cole AM, Cole AL (2008) Antimicrobial polypeptides are key anti-HIV-1 effector molecules of cervicovaginal host defense. *Am J Reprod Immunol* 59: 27–34.
- Baroncelli S, Negri DR, Rovetto C, Belli R, Ciccozzi M, et al. (2007) Characterization of alpha-defensins plasma levels in Macaca fascicularis and correlations with virological parameters during SHIV89.6Pcy11 experimental infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23: 287–296.
- Baroncelli S, Andreotti M, Guidotti G, Pirillo MF, Ceffa S, et al. (2008) Tumor necrosis factor-alpha, Interleukin-10, and alpha-defensins in plasma and breast milk of HIV-infected highly active antiretroviral therapy-treated and untreated pregnant women in Mozambique. *J Acquir Immune Defic Syndr* 47: 647–649.
- Folkvord JM, Arnon C, Connick E (2005) Lymphoid follicles are sites of heightened human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication and reduced antiretroviral effector mechanisms. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21: 363–370.
- Folkvord JM, McCarter MD, Ryder J, Meditz AL, Forster JE, et al. (2006) alpha-Defensins 1, 2, and 3 are expressed by granulocytes in lymphoid tissues of HIV-1-seropositive and -seronegative individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 42: 529–536.
- Levinson P, Kaul R, Kimani J, Ngugi E, Moses S, et al. (2009) Levels of innate immune factors in genital fluids: association of alpha defensins and LL-37 with genital infections and increased HIV acquisition. *AIDS* 23: 309–317.
- Trabattoni D, Caputo SL, Maffei G, Vichi F, Biasin M, et al. (2004) Human alpha defensin in HIV-exposed but uninfected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 35: 455–463.
- Deeks SG, Walker BD (2007) Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 27: 406–416.
- Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, et al. (2001) Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet* 357: 1149–1153.
- Vernazza PL, Eron JJ, Fiscus SA, Cohen MS (1999) Sexual transmission of HIV: infectiousness and prevention. *AIDS* 13: 155–166.
- Panyutich AV, Panyutich EA, Krapivin VA, Baturevich EA, Ganz T (1993) Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J Lab Clin Med* 122: 202–207.
- Okazaki T, Ota Y, Yuki N, Hayashida A, Shoda A, et al. (2007) Plasma levels of alpha-defensins 1-3 are an indicator of neutrophil activation in pregnant and post-partum women. *J Obstet Gynaecol Res* 33: 645–650.

56. Aldred PM, Hollox EJ, Armour JA (2005) Copy number polymorphism and expression level variation of the human alpha-defensin genes DEFA1 and DEFA3. *Hum Mol Genet* 14: 2045–2052.
57. Ballana E, Gonzalez JR, Bosch N, Estivill X (2007) Inter-population variability of DEFA3 gene absence: correlation with haplotype structure and population variability. *BMC Genomics* 8: 14.
58. Groth M, Szafiranski K, Taudien S, Huse K, Mueller O, et al. (2008) High-resolution mapping of the 8p23.1 beta-defensin cluster reveals strictly concordant copy number variation of all genes. *Hum Mutat* 29: 1247–1254.
59. Linzmeier RM, Ganz T (2005) Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23. *Genomics* 86: 423–430.
60. Zapata W, Rodriguez B, Weber J, Estrada H, Quinones-Mateu ME, et al. (2008) Increased levels of human beta-defensins mRNA in sexually HIV-1 exposed but uninfected individuals. *Curr HIV Res* 6: 531–538.
61. Milanese M, Segat L, Arraes LC, Garzino-Demo A, Crovella S (2009) Copy number variation of defensin genes and HIV infection in Brazilian children. *J Acquir Immune Defic Syndr* 50: 331–333.

Resultats 3.4. Un elevat nombre de còpies del gen *DEFA1A3* i una elevada secreció d' d' α -Defensines 1-3 s'associa amb protecció davant la infecció per VIH.

Víctor Casanova¹; Isaac Naval-Macabuhay¹; Felipe Garcia^{2,4}; Agathe Leon^{2,4}; Emma Fernandez²; Laia Miralles²; Cristina Rovira²; Josefa Mallol¹, Peter-Joseph McCormick¹; Enric I Canela¹, José María Gatell^{2,4}; Teresa Gallart^{2,3,*}, Núria Climent^{2*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, Barcelona, Spain. ² IDIBAPS-AIDS Research Group, HIVACAT, Barcelona, Spain. ³ Service of Immunology, Hospital Clínic de Barcelona, Spain. ⁴ Infectious Diseases and AIDS Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.

Existeixen nombrosos mecanismes immunològics que són capaços d'oferir una certa resistència a la infecció per VIH, tot i que una resistència complerta és extremadament rara. No obstant això, existeixen individus que s'exposen repetidament al VIH i no en resulten infectats (individus exposats no infectats, EU). En aquest treball s'ha posat de manifest que els individus EU presenten un major nombre de còpies del gen *DEFA1A3* en comparació amb individus sans o infectats per VIH. Aquest gen codifica per a les α -defensines 1-3 (HNP1-3) que són pèptids antimicrobians amb una elevada activitat anti-VIH. El major nombre de còpies gèniques que presenten els EU es tradueix en una major secreció d'HNP1-3 per les cèl·lules dendrítiques immadures (iDCs) d'aquests individus. Tant el nombre de còpies com els nivells de secreció d'HNP1-3 per part de les iDCs correlacionen positivament amb la càrrega viral total a la que aquests s'exposen. A més, diferents CNV modulen decisivament les funcions de les iDCs. Així, les iDCs d'individus sans amb un nombre elevat de còpies del gen *DEFA1A3* (≥ 9) mostren una major maduració basal que les iDCs d'individus amb baixes còpies (≤ 4), mesurat per l'expressió de CD80 i CD83 i la secreció de citocines pro-inflamatòries com IL-8, IL-6 o IL-1 β o quimiocines com MCP-1. De forma conjunta, aquests resultats suggereixen que un elevat nombre de còpies del gen *DEFA1A3* i la concomitant major secreció d'HNP1-3 per part de les iDCs, serien claus per a generar potents respostes antivirals. La major presència d'aquests elements en la població EU podria indicar que aquests factors estarien decisivament implicats en la resistència natural d'aquests individus a la infecció per VIH.

Higher DEFA1A3 Gene Copy Number and α -Defensins 1-3 Secretion are Associated with HIV Protection.

Víctor Casanova¹; Isaac Naval-Macabuhay¹; Felipe Garcia^{2,4}; Agathe Leon^{2,4}; Emma Fernandez²; Laia Miralles²; Cristina Rovira²; Josefa Mallol¹, Peter-Joseph McCormick¹; Enric I Canela¹, José María Gatell^{2,4}; Teresa Gallart^{2,3,*}, Núria Climent^{2*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, Barcelona, Spain. ² IDIBAPS-AIDS Research Group, HIVACAT, Barcelona, Spain. ³ Service of Immunology, Hospital Clínic de Barcelona, Spain. ⁴ Infectious Diseases and AIDS Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.

* These authors contributed equally to this work

Abstract

α -defensins 1-3 (HNP1-3) are innate effector molecules with powerful anti-HIV and immunomodulator activities. Here we show that EU individuals display a higher *DEFA1A3* copy number variation (CNV), resulting in a higher HNP1-3 secretion in their immature dendritic cells (iDCs). Higher *DEFA1A3* CNV and levels of HNP1-3 in iDCs supernatants correlate with the amount of virus EU individuals are exposed to, which may suggest a protective role. Different CNV critically modulate iDCs functions, as observed with healthy individuals with high (≥ 9) who display a more mature DC status, including increased cytokine chemokine (IL-8, IL-6, IL-1 β and MCP-1) secretion than their lower (≤ 4) counterparts. These results indicate that high *DEFA1A3* CNV may be involved in the natural resistance to HIV-1 infection, suggesting a potential use of HNP1-3 on HIV-1 immunotherapy.

Introduction

Defensins are small, cysteine-rich cationic peptides with broad antimicrobial activities, including the capacity to inhibit HIV replication both *in vivo*¹⁻³ and *in vitro*⁴⁻⁸. According to structural characteristics, mammalian defensins are classified in α , β or θ subfamilies^{9,10}. In humans, α -defensins 1-3 are mainly produced by neutrophils, thus they are also known as human neutrophil peptides (HNP1-3)⁹. Other lymphocyte subsets (B, $\gamma\delta$ and NK-cells) together with monocytes/macrophages and immature dendritic cells (iDCs) secrete these innate effector molecules^{11,12}. HNP1-3 are powerful modulators of innate and adaptive immunity, capable of chemoattracting T-cells, iDCs and macrophages^{13,14}, increasing bacterial phagocytosis¹⁵ and influencing the maturation of DCs^{16,17}.

α and β -defensin genes cluster in adjacent loci, within a two-megabase region of human chromosome 8p23.1^{10,18}. The human α -defensin 1-3 genes (*DEFA1A3*) occur in cassettes of 19kb displaying copy number variation (CNV), ranging from 2 to 14 copies per diploid genome, being 6 the most frequent CNV in healthy Caucasian individuals²¹⁻²³. In cells where HNP1-3 production is constitutive, such as neutrophils, a correlation exists between *DEFA1A3* CNV and the HNP1-3 protein produced²⁰, suggesting a clear impact of different CNV on immune function.

Approximately 1% of the HIV-infected individuals are able to naturally control the infection without treatment²⁴, and particular individuals have been shown to remain healthy despite several HIV exposures (Exposed Uninfected, EU)²⁵. To date, homozygosity for CCR5 deletion $\Delta 32$ remains as the most powerful genetic trait conferring HIV-protection²⁶, while many other mechanisms such as HLA or KIR haplotypes²⁷, or IL-4, SFD-1 and TNF- α genetic variants²⁸⁻³⁰ and CCL3L1 CNV^{31,32} have been shown to influence this HIV resistance^{33,34}.

Dendritic cells (DCs) are pivotal to correctly instruct and polarize adaptive immunity towards particular pathogens, including chronic viral infections³⁵⁻³⁷. DCs are among the first cells to encounter HIV virions in a sexually-transmitted infection³⁸. These interactions result in a non-productive infection of DCs, which may be an HIV mechanism to reduce the awakening of innate immunity³⁹, facilitating the spreading of the infection to T-CD4⁺ cells upon DC migration to lymph nodes, in a *trans-infection* process⁴⁰.

Previous studies observed increased HNP1-3 secretion in CD8⁺ T-cells and cervovaginal cells (CVS) from HIV-infected individuals compared to healthy subjects^{41,42}. In addition, despite not being produced by CD8⁺ T-cells, HNP1-3 secretion was detected in the supernatants of stimulated CD8⁺ cultures from LTNP and healthy individuals but not from HIV-progressors^{43,44}. In accordance, previous work from our group showed that iDCs from HIV controllers secreted the highest HNP1-3 levels, which correlated with slower disease progression, suggesting a role on HIV-control⁴⁵. Additionally, the highly protected EU individuals showed increased HNP1-3 production both in constitutive and in stimulated CD8⁺ T and CVS cells, compared to HIV-infected patients⁴¹. This fact suggests that despite HIV exposure may trigger HNP1-3 secretion, other inherent or genetic mechanism provides EU individuals with increased HNP1-3 production capability, which could be related to their privileged HIV resistance. To further test this hypothesis, the *DEFAIA3* CNV from a healthy, EU and an HIV cohort were here addressed and correlated to their iDC-derived HNP1-3 production and global DC functionality, an issue never addressed before. This study provides clues pointing towards increased *DEFAIA3* CNV and HNP1-3 protein levels as critical effector molecules of the innate immunity which would act by strengthening while preserving

DC function from deleterious HIV “manipulation”, resulting in reduced HIV infectious transfer to T-cells and increased protective T-cell immunity.

Materials and Methods

Sample and Study Population

Blood samples were obtained from peripheral blood in EDTA-treated vacutainers (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) and processed immediately after extraction. 34 Exposed Uninfected (EU; n=34) individuals were enrolled in the study. They were recruited in a single center (Hospital Clínic de Barcelona, Spain) when their partners were diagnosed with HIV infection. Inclusion criteria were a history of ongoing unprotected sexual intercourse for at least 12 months; 5 episodes of unprotected sexual intercourse in the last 3 months, with at least 1 episode in the 4 weeks prior to study entry; and 1 HIV-1–infected patient per couple with a PVL > 2000 copies/mL. Individuals with multiple partners were excluded. HIV-1-infected (n=72) and HIV-1–uninfected (Healthy n= 69), individuals were recruited as a HIV and Healthy group.

The study received the approval of the Institutional Committee of Ethics and Clinical Investigation and all individuals gave informed written consent. The characteristics of the populations included in the study are shown in Table S1.

Monocyte-Derived Dendritic cell Generation

Monocyte-derived dendritic cells were obtained as described previously⁴⁵. Briefly, PBMCs were obtained immediately after blood extraction using the standard Ficoll gradient method⁴⁶. To obtain monocytes, PBMC were incubated for 2 h at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂ in 75cm² plastic flasks with DC-medium, consisting of serum free XVIVO-15 medium (Bio-Whittaker, Walkersville, MD, USA) supplemented

with 1% autologous serum, 50 µg/ml gentamycin (Braun B., Melsungen, Germany), 2.5 µg/ml fungizone (Bristol-Myers Squibb, Munchen, Germany) and, in the case of HIV-infected individuals, with 1 µM zidovudine (Retrovir from GlaxoSmithKline, Madrid, Spain) to avoid possible replication of endogenous HIV-1. To obtain immature DCs (iDCs) adherent monocytes were washed four times with pre-warmed serum free XVIVO-10 medium (Bio-Whittaker) and cultured during 5 days in DC-medium, supplemented at days 0 and 2 with human recombinant IL-4 and GM-CSF (1000UI/ml, each) (Prospec-Tany Technogene LTD, Rehovot, Israel).

Luminex Assay

The secretion of different cytokines and chemokines from healthy individuals was addressed in the supernatants of iDCs generated after 5 days of cell culture. Multiplex Luminex assays (Cytokine Human 25-Plex Panel, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were performed following the manufacturer instructions. The following 25 mediators were tested: Eotaxin, GM-CSF, IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8 (IL-8), IL-10, IL-12p40/p70, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- α , IFN- γ , CXCL10(IP-10), CCL2(MCP-1), CXCL9(MIG), CCL3(MIP1- α), CCL4(MIP-1 β), CCL5 (RANTES) and TNF- α .

ELISA

The levels of α -defensins 1-3 in iDCs supernatants or sera were determined using the commercial HNP1-3 Elisa test Kit (Hycult biotechnology) following the manufacturer instructions. ELISA plates were measured on a microtiter plate reader at 450nm.

DNA isolation and DEFA1A3 Copy number Variation assay.

DNA was obtained from 200 μ L blood samples using the QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturer's instructions.

The copy number variability of DEFA1A3 gene was assessed using the quantitative duplex real-time PCR assay qPCR Core kit (Eurogentec, Seraing, Belgium) on a VAA7 system (Applied Biosystems, Palo Alto, CA, USA). PCR reactions were performed with the DEFA1A3 and DEFB4 Taqman primers and probes previously reported²² purchased from Applied Biosystems. Briefly, 4 independent PCR reactions (replicates) were performed in duplo, thus involving DEFA1A3 and DEFB4 primers and probes and 100ng genomic DNA per sample. Reactions were carried on 96 well clear plates (Applied Biosystems). Additionally, the RNASE P Taqman primers and probe listed in table S2 (Applied Biosystems) were used as a non defensin-related reference gene.

The Δ Ct values (Ct DEFA1A3 – Ct Reference gene in the same sample) were processed with the Copy Caller software 1.0 (Applied Biosystems). To obtain the relative DEFA1A3 gene copy number, the most frequent sample copy number option available in the program was used, setting 6 as the most frequent DEFA1A3 CNV in Caucasian population, in accordance to previous studies^{21,22}.

Flow Citometry

iDCs phenotype was characterized by two-color flow cytometry using commercial labeled monoclonal antibodies against surface markers. The purity and expression of iDCs surface markers (CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD56⁻, HLA-DR⁺, HLA-ABC⁺, CD80^{low}, CD83^{low}, CD86⁺, CD1a⁺, CD11c⁺, CD40⁺, CD45RO⁺, CD45RA⁻) was found to be similar to the previously reported^{16,45}.

Intracellular staining of α -defensins 1-3 was performed as described before^{12,45}. Briefly, immature iDCs were pretreated with monensin (Golgi Stop, BD Biosciences) for 8 h and surface stained with FITC-conjugated CD40 (BD Biosciences). MDDCs were then fixed and permeabilized with the Cytofix-Cytoperm Plus kit (BD Biosciences) for 20 min, incubated with biotinylated mouse mAb anti-human α -defensins 1-3 (Clone D21, Hycult Biotechnology) for 30 min and then with PE-conjugated streptavidin (1/1000, BD Biosciences) during 30 min. The negative control was FITC-conjugated isotype control (BD Biosciences) and biotin-conjugated mouse IgG1 isotype control (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA).

Cells were analyzed in a FACScan flow cytometer (Beckton Dickinson). Data obtained were analyzed with the FlowJo software (Tree Star, Inc. Ashland, OR). Expression of surface and intracellular markers was measured by the percentage of positive cells and the geometric mean fluorescence intensity.

Fluorescence microscopy

After the intracellular staining of α -defensins 1-3 for flow cytometry described above, cells were adhered to a glass slide using the cytopsin (5min x300g). Cells were then fixed its nuclei stained with DAPI, using the Prolong-Gold with DAPI reagent (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were then observed on a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope for green, red and blue fluorescence and images acquired with a Nikon DS-V11 camera.

Results

The EU cohort shows increased *DEFA1A3* gene copy number.

To address copy number variation in the *DEFAIA3* genes, an accurate and well established duplex real time PCR was adopted^{22,23}. In accordance to previous studies²¹⁻²³ 6 copies was the most frequent *DEFAIA3* CNV in our 3 cohorts studied (Fig 1a). Interestingly, marked differences were observed at extreme high (10) or low (3) *DEFAIA3* copies. In one hand, no EU individuals with 3 copies were found, while the HIV group showed a higher frequency of these individuals than the EU group (0.06 vs 0.03-). On the other hand, the EU cohort showed increased frequencies of individuals with 10 copies compared to the healthy or the HIV group (0.06 vs 0.01; p=0.2 and p=0.038 respectively). Interestingly, not a single HIV-infected individual with 10 *DEFAIA3* CNV was found (Fig 1a). CNV medians of all cohorts were next compared, revealing that the EU cohort displays a statistically significant higher *DEFAIA3* CNV than the other 2 cohorts (7 vs 6 copies, respectively) (Fig 1b). In addition, the EU cohort displays higher frequencies of individuals with higher than the average CNV (CNV \geq 6) than the healthy or the HIV groups (0,88 vs 0,67 and 0,68 respectively).

iDCs from EU individuals show increased HNP1-3 secretion.

Having previously seen a higher *DEFAIA3* CNV in EU individuals, we next addressed whether this observation was translated to the protein level. iDCs from healthy, EU and HIV-infected individuals were obtained and its supernatants analyzed for HNP1-3 presence (Fig 2a). Interestingly, iDCs from the EU cohort showed the highest HNP1-3 secretion (724,7pg/ml as a median) being this increase statistically significant when compared to healthy individuals (404,6 pg/ml). iDCs from the HIV-infected cohort were not statistically different from the EU group, despite showing a lower median (661,3 pg/ml), but they did show a statistically significant increase in HNP1-3 secretion when compared to healthy individuals, in accordance with previous data from our group⁴⁵. Interestingly, HIV controllers also showed higher HNP1-3 secretion than HIV non-

controllers, as previously described⁴⁵ (data not shown). We next wanted to compare our iDCs results with serum samples, in which HNP1-3 content is believed to be mainly neutrophil-derived^{47,48}. HNP1-3 levels in serum were considerably higher than those on iDCs supernatants, as previously reported^{45,49}. Remarkably, EU individuals were, showing the highest HNP1-3 levels (median=116,0 ng/ml), despite this difference was not statistically significant compared to the healthy group (100,7 ng/ml) (Fig 2b). In contrast, HNP1-3 content in sera from the HIV group was markedly reduced (37,45 ng/ml). To further characterize HNP1-3 secretion by iDCs from EU individuals, intracellular levels of these peptides were addressed. Intracellular flow cytometry revealed that approximately 10% of the CD40⁺ DC population expressed HNP1-3 (Fig 2c), and by analyzing the same sample through fluorescence microscopy, distribution all over the cytoplasm with some accumulations near the nucleus was revealed (Fig 2d).

Increased *DEFA1A3* CNV correlates with increased iDCs HNP1-3 secretion in healthy individuals.

To address whether iDCs from individuals with higher *DEFA1A3* CNV secreted higher amounts of HNP1-3, all individuals from the 3 cohorts were classified on the basis of their genomic *DEFA1A3* content into low (≤ 4), mid (5-8) or high (≥ 9) CNV, and levels of HNP1-3 peptides on iDCs supernatants were addressed (Fig 3a). Given the scarce numbers of healthy donors with extreme *DEFA1A3* CNV and the codominant segregation of these genes²¹, we addressed these individuals' relatives for *DEFA1A3* CNV, in order to further characterize extreme CNV populations. A clear relationship was found on *DEFA1A3* CNV between individuals of the same families. (Supplemental fig 1). Healthy individuals with high CNV showed a trend to secrete almost 3-fold higher HNP1-3 than their low counterpart (884,5 vs 348,5 pg/ml as a median, respectively $p=0,1292$). The EU cohort showed the same behavior with high CNV

individuals expressing the highest HNP1-3 secretion (1432 pg/ml). In sharp contrast, HIV-infected individuals with low CNV showed the highest HNP1-3 secretion, followed by the mid and the high CNV groups (7291 vs 634,5 and 570,9 pg/ml, respectively) (Fig 3a). When HNP1-3 levels in the serum from the 3 cohorts was studied using the above mentioned classification (fig 3b), extreme inter-individual variability was observed, with high CNV healthy individuals showing the highest defensin levels (152,74 ng/ml). Interestingly, all HIV-infected CNV groups showed lower HNP1-3 secretion (ranging from 25,19 to 41,45 ng/ml as a median) than any other EU or healthy CNV groups. To further confirm all these observations, correlation analyses were performed between *DEFAIA3* CNV and HNP1-3 levels in iDCs supernatants (Fig 3c) or sera (Fig 3d) from all cohorts. While a positive correlation between *DEFAIA3* CNV and HNP1-3 content in both samples was found in healthy individuals, a negative trend between CNV and HNP1-3 in iDCs supernatants and total lack of correlation in sera was observed for HIV-infected subjects. Despite not observing any statistical significance on the EU cohort, the *DEFAIA3* CNV showed a trend to correlate with both iDCs and sera HNP1-3 levels (Fig 2c). Particular EU individuals are exposed to different amounts of virus, which depends on the viral load of their HIV-infected partner and the number of expositions to the virus. To address whether HNP1-3 secretion could be influenced by this variable, correlation analysis with the total exposed viral load (HIV-partner viral load*number of expositions) were performed. According to this, a strong positive correlation between the EU exposed viral load and HNP1-3 levels in iDCs supernatants was observed (fig 3e). Importantly, a positive correlation between *DEFAIA3* CNV and the total exposed viral load (fig 3f) was also found, which may indicate that the genetic background strongly influences the capacity to overcome highly infective HIV exposures. In addition, a trend to a positive

correlation was found between HNP1-3 levels in sera and the total exposed viral load (fig 3g). Taken together these results may indicate that basal HNP1-3 production is greatly dependent on *DEFAIA3* CNV, while a different situation arises under chronic infections such as HIV.

***DEFAIA3* CNV influences the function of immature and mature DCs in terms of cytokines and maturation markers.**

Previous studies from our group showed that HNP1-3 peptides are able to influence the function of human iDCs by increasing or decreasing maturation and cytokine secretion, in a concentration-dependent fashion¹⁶. Thus, we next addressed whether different *DEFAIA3* CNV could influence DC function. DCs from low (≤ 4), mid (5-8) or high (≥ 9) CNV healthy individuals were obtained and its cytokine secretion profiles assessed (Fig 4a). IL-8 secretion was found to increase along with higher CNV, observing great differences between low and high CNV individuals (7784 vs 16203 pg/ml as a median). As HNP1-3 are established inducers of IL-8^{50,51}, this result is consistent with the fact that higher *DEFAIA3* CNV implies higher HNP1-3 secretion. IL-6, IL-1RA and MCP-1 displayed a similar trend, with higher CNV groups generally showing increased cytokine secretion, but with high inter-individual variability. In contrast, mid (5-8) CNV groups showed higher TNF- α , IL-12, IFN- α , IL-15 and IL-1 β secretion than its low and high CNV counterparts. These latter results may suggest that the dual role of low or high HNP1-3 levels on the secretion of certain cytokines¹⁶, is ultimately affected by different CNV. We next addressed the levels of CCR5 ligands, which are relevant to block R5 HIV infection. Mid (5-8) CNV groups showed higher MIP1- α and β secretion than low or high CNV groups, without reaching statistical significance, while all CNV groups displayed similar levels of RANTES.

Given the importance of pro-inflammatory mediators on the maturation program of iDCs, we next addressed whether different *DEFA1A3* CNV could also influence the expression of DC maturation markers. iDCs and mDCs from low (≤ 4) and high (≥ 9) *DEFA1A3* CNV healthy donors were obtained and their levels of CD83 and CD80 assessed (fig 4b and c). iDCs from high *DEFA1A3* CNV showed increased expression of CD83 and CD80 compared to iDCs from low *DEFA1A3* CNV individuals (7,11 vs 9,7% and 2,47 vs 10,97% median expression, respectively). In addition, when mDCs were assessed, differences between low and high CNV groups were increased, the low CNV group expressing a median of 52,35% and 43,25% of CD83 and CD80 respectively, compared to the 74,18% and 68,85% of the high CNV group (fig 4 b, c).

Discussion

In this study the influence of *DEFA1A3* CNV on HNP1-3 production levels by dendritic cells and its relation to improved HIV protection has been addressed. *DEFA1A3* CNV from healthy, EU and HIV cohorts has been characterized, revealing clear differences. The privileged, highly protected EU individuals possess increased *DEFA1A3* CNV as a median, and in turn, their iDCs show an increased basal secretion of HNP1-3 peptides. Moreover, the EU cohort is particularly enriched with individuals with high CNVs, while reduced in individuals with the lowest CNVs. Results here obtained in iDCs from healthy individuals with high *DEFA1A3* CNV (≥ 9) points towards a relationship between increased *DEFA1A3* CNV and a higher activated or mature status of DCs, revealed as increased basal expression of CD80 and CD83 and secretion of certain pro-inflammatory cytokines, such as IL-8 or IL-6. These facts would ultimately lead towards stronger T-cell activation upon antigenic (viral) contact in high *DEFA1A3* CNV individual. Finally, the widely reported anti-HIV properties of HNP1-3 peptides^{6,8,11,52} would contribute to preserve the immune function by reducing viral replication.

Different studies have previously observed associations between elevated *DEFAIA3* CNV or HNP1-3 plasma levels and inflammatory pathologies such as crohn²³, SLE⁵³ or IBD⁵⁴. These observations suggest a link between increased HNP1-3 levels and inflammation. While clearly this may facilitate the onset of certain autoimmune diseases, it may also represent the triggering of potent innate immune responses upon HIV exposure which, together with other innate mechanisms⁵⁵, would limit the risk of infection. According to our observations, dendritic cells would play a central role in these effects, both by its APC function and by its tissue localization, close to sites of HIV exposure³⁸. In this regard, increased β -defensin mRNA (which are abundant in epithelia and mucosa) was detected in a EU cohort⁵⁶, suggesting a role in HIV protection. In addition, we observe a strong correlation between the “total viral load” EU individuals are exposed to and their iDCs HNP1-3 secretion. This novel correlation is in accordance with others previously found between HNP1-3 levels in cervovaginal secretions and EU exposed viral load^{3,41} and underscores the importance of defensins levels at the site of HIV exposure. Importantly, we also observe a positive correlation between the total exposed viral load on EU and their *DEFAIA3* CNV. The presence of EU individuals exposed to elevated viral loads and displaying high *DEFAIA3* CNV, strongly suggests that in order to elude HIV, high levels of HNP1-3 are required, which would be facilitated by higher copies of *DEFAIA3* genes.

Previous studies from our group observed increased HNP1-3 production in iDCs from HIV-controllers compared to HIV-non controllers or healthy individuals⁴⁵. Interestingly, HNP1-3 levels did not correlate with plasmatic viral load, suggesting that the virus presence was not influencing HNP1-3 levels, at least during the asymptomatic phase of the infection. In contrast, HNP1-3 levels in iDCs did correlate with CD4⁺ T-cell counts in HIV-controllers, suggesting that a good immunological status of these

patients may be important for DCs to secrete HNP1-3. Here, clear differences are found in *DEFA1A3* CNV when comparing HIV and EU cohorts, HIV displaying higher frequencies of low CNV (≤ 4) individuals. However, unlike healthy and EU individuals, HNP1-3 production in iDCs does not correlate with these individuals' CNV. Unexpectedly, HIV patients with low *DEFA1A3* CNV (≤ 4) show increased iDCs HNP1-3 production. The fact that these individuals behave as HIV-controllers, points towards the implication of additional factors related with the HIV control.

Previous work from our group showed the influence of different concentrations of exogenous HNP1-3 peptides on DCs maturation and cytokine secretion ¹⁶. Low ($\leq 1\mu\text{g/ml}$) HNP1-3 doses increased the expression of HLA-DR and CD86 and the secretion of IL-12p40, TNF- α , IL-1 β and IL-10, while high doses (20 $\mu\text{g/ml}$) decreased this pattern, this latter effect being also observed in macrophages ⁶⁰. In contrast, IL-8 increased steadily with higher HNP1-3 doses. Here, we relate this dual role of different HNP1-3 concentrations to different *DEFA1A3* CNV from healthy individuals. Importantly, IL-8 and IL-6 secretion increase with higher CNVs, while other cytokines are increased at medium CNVs, which suggests that a regulatory feedback may start to operate ¹⁶. These cytokine secretion patterns may have a profound impact on the immune function. IL-8 not only attracts neutrophils to the sites of infection but also activates them to secrete DNA extracellular traps (NETs), which effectively bind pathogens, including the HIV, and exposes them to high doses of HNP1-3 ⁶¹⁻⁶³. IL-6 would also contribute to innate and adaptive immune activation and recruitment with increased levels of inflammation.

The HIV is known to disrupt many cellular mechanisms, in order to evade immune responses. DCs seem quite refractory to HIV productive infection, probably due to certain factors such as SAMHD1, TREX1, TRIM5 or APOBEC3A ⁶⁴⁻⁶⁶.

However, DCs may facilitate HIV spreading through CD4⁺ T cell *trans* infection⁴⁰. Thus, the HIV-1 may have evolved to deliberately avoid productive DC infection, as a mean not to awake innate antiviral responses and therefore ensure that the virions reach T CD4⁺ cells unharmed^{39,64}. We propose that DCs ability to secrete high doses of HNP1-3, which is related to high *DEFAIA3* CNV, is critical at inactivating HIV virions prior to DC contact, thus avoiding the HIV-mediated DC exploit. In addition, the already higher mature status of DCs with high *DEFAIA3* CNV, may indicate that a lower threshold is required to sense the HIV and to activate an efficient innate antiviral response, with increased IFN- α , IL-12 and IL-15 secretion. The fact that ex-vivo myeloid and plasmacytoid DCs also secretes HNP1-3⁶⁷ at higher levels than MDDCs and the recent observation that HNP1-3 and LL-37 are required to form complexes with genomic DNA which efficiently activate pDCs through TLR9⁶⁸, further underscores the importance of elevated HNP1-3 on preserving DC function, inducing type I Interferon and mediating the induction of appropriate innate and adaptive HIV immunoresponses.

Our findings here related to DC-expressed innate immune factors such as α -defensins provide a molecular basis for understanding how iDCs would adequately sense invasion by HIV. These suggest that particular experimental approaches could be implemented to improve HIV-1-T cell priming in prophylactic and therapeutic vaccination protocols. One approach would be the use of α -defensins as immunomodulators able to inactivate HIV while promoting proper iDC activation aiming to improve new therapeutic DC-based therapy.

Figure Legends

Fig 1. *DEFAIA3* Copy number variation in Healthy, EU and HIV-infected individuals. Genomic DNA from 69 healthy, 34 EU and 74 HIV-infected individuals was obtained and addressed for *DEFAIA3* CNV as described in Methods. (a) Frequency

distribution of *DEFAIA3* copy number in the different cohorts. (b) Box Plots indicating the median *DEFAIA3* CNV in the three different cohorts are shown, *P= 0,0170 Healthy vs EU, and *P = 0,0105 EU vs HIV. (c) Frequency distribution of individuals expressing 6 or more copies of the *DEFAIA3* gene in the three different cohorts, *P = 0,0193 Healthy vs EU and *P= 0,0260 EU vs HIV, two-sided chi-square test.

Fig 2. HNP1-3 secretion in iDCs from Healthy, EU and HIV-infected individuals.

Immature MDDCs were obtained as indicated in material and methods. (a) The HNP1-3 secretion from 5-day cell culture supernatants from 51 healthy, 24 EU and 22 HIV-infected individuals is represented. *P=0, 0135; **P =0, 0065. In (b), HNP1-3 concentration in serum from 59 healthy, 28 EU and 65 HIV-infected individuals is depicted. For each group the median is indicated by a thick line, and particular individuals represented with open symbols. (c) Intracellular HNP1-3 content on iMDDCs was addressed by flow cytometry. Zebra plots from a representative EU individual showing the isotype (upper panel) and HNP1-3 staining (lower panel) on CD40⁺ iMDDCs. The same samples were next observed by fluorescence microscopy (d). The isotype (upper panels) or intracellular HNP1-3 (red), membrane CD40 (green) and nucleus (DAPI, blue) are represented.

Fig 3. Correlations between CNV and HNP1-3 production by iDCs.

HNP1-3 levels in iDCs supernatants (a) or serum (b) from healthy, EU, and HIV individuals, classified as low (≤ 4), mid (5-8) or high (≥ 9) *DEFAIA3* CNV are depicted. Correlations between *DEFAIA3* CNV and HNP1-3 levels in iDCs supernatants (c) or serum (d) from Healthy, EU or HIV-infected individuals are shown. Correlations between HNP1-3 levels in iDCs supernatants (e), *DEFAIA3* CNV (f), or serum HNP1-3 levels (g) and the total viral load (HIV infected partner's VL* number of exposures) that EU individuals have been exposed to are depicted. P values were obtained with Pearson correlation.

Fig 4. Immunological profile of iDCs from low, mid or high *DEFA1A3* CNV healthy individuals. Immature MDDCs were obtained and up to 25 mediators addressed in the supernatants after 5 days cell culture. In (a) box plots showing levels of different cytokines on iDCs from 5 low (≤ 4), 20 mid (5-8) or 7 high (≥ 9) *DEFA1A3* CNV healthy individuals are depicted. Open symbols represents single individuals. The maturation status of iDCs or mDCs from low (≤ 4) and high (≥ 9) *DEFA1A3* CNV individuals according to CD83 (b) and CD80 (c) expression are represented. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

References

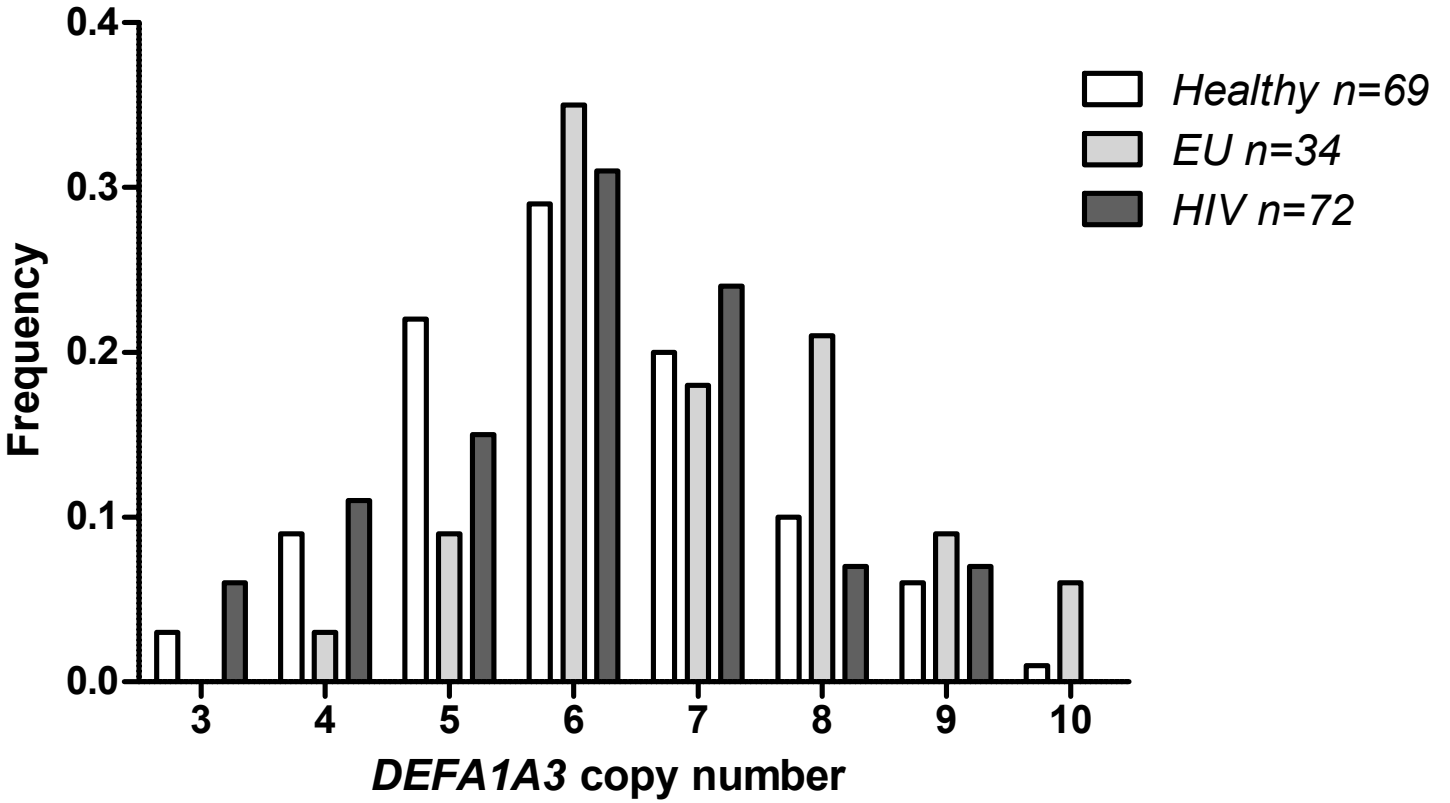
1. Kuhn, L. *et al.* Alpha-defensins in the prevention of HIV transmission among breastfed infants. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **39**, 138–142 (2005).
2. Venkataraman, N., Cole, A. L., Svoboda, P., Pohl, J. & Cole, A. M. Cationic polypeptides are required for anti-HIV-1 activity of human vaginal fluid. *J. Immunol.* **175**, 7560–7567 (2005).
3. Levinson, P. *et al.* HIV-neutralizing activity of cationic polypeptides in cervicovaginal secretions of women in HIV-serodiscordant relationships. *PLoS ONE* **7**, e31996 (2012).
4. Nakashima, H., Yamamoto, N., Masuda, M. & Fujii, N. Defensins inhibit HIV replication in vitro. *AIDS* **7**, 1129 (1993).
5. Mackewicz, C. E. *et al.* alpha-Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *AIDS* **17**, F23–32 (2003).
6. Chang, T. L., Vargas, J., Jr, DelPortillo, A. & Klotman, M. E. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *J. Clin. Invest.* **115**, 765–773 (2005).
7. Furci, L., Sironi, F., Tolazzi, M., Vassena, L. & Lusso, P. Alpha-defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4. *Blood* **109**, 2928–2935 (2007).
8. Demirkhanyan, L. H. *et al.* Multifaceted mechanisms of HIV-1 entry inhibition by human α -defensin. *The Journal of biological chemistry* (2012).doi:10.1074/jbc.M112.375949
9. Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 710–720 (2003).
10. Lehrer, R. I. & Lu, W. α -Defensins in human innate immunity. *Immunol. Rev.* **245**, 84–112 (2012).
11. Klotman, M. E. & Chang, T. L. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 447–456 (2006).
12. Rodríguez-García, M. *et al.* Human immature monocyte-derived dendritic cells produce and secrete alpha-defensins 1-3. *J. Leukoc. Biol* **82**, 1143–1146 (2007).
13. Yang, D., Chen, Q., Chertov, O. & Oppenheim, J. J. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 9–14 (2000).
14. Grigat, J., Soruri, A., Forssmann, U., Riggert, J. & Zwirner, J. Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. *J. Immunol.* **179**, 3958–3965 (2007).
15. Soehnlein, O. *et al.* Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J. Clin. Invest.* **118**, 3491–3502 (2008).

16. Rodríguez-García, M. *et al.* Impact of alpha-defensins1-3 on the maturation and differentiation of human monocyte-derived DCs. Concentration-dependent opposite dual effects. *Clin. Immunol* **131**, 374–384 (2009).
17. Presicce, P., Giannelli, S., Taddeo, A., Villa, M. L. & Della Bella, S. Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD91. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 941–948 (2009).
18. Liu, L., Zhao, C., Heng, H. H. & Ganz, T. The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics* **43**, 316–320 (1997).
19. Mars, W. M. *et al.* Inheritance of unequal numbers of the genes encoding the human neutrophil defensins HP-1 and HP-3. *J. Biol. Chem.* **270**, 30371–30376 (1995).
20. Linzmeier, R. M. & Ganz, T. Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23. *Genomics* **86**, 423–430 (2005).
21. Aldred, P. M. R., Hollox, E. J. & Armour, J. A. L. Copy number polymorphism and expression level variation of the human alpha-defensin genes DEFA1 and DEFA3. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2045–2052 (2005).
22. Nuytten, H. *et al.* Accurate determination of copy number variations (CNVs): application to the alpha- and beta-defensin CNVs. *J. Immunol. Methods* **344**, 35–44 (2009).
23. Jespersgaard, C. *et al.* Alpha-defensin DEFA1A3 gene copy number elevation in Danish Crohn's disease patients. *Dig. Dis. Sci.* **56**, 3517–3524 (2011).
24. Deeks, S. G. & Walker, B. D. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* **27**, 406–416 (2007).
25. Lederman, M. M. *et al.* Determinants of protection among HIV-exposed seronegative persons: an overview. *J. Infect. Dis.* **202 Suppl 3**, S333–338 (2010).
26. Allers, K. *et al.* Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation. *Blood* **117**, 2791–2799 (2011).
27. Boulet, S. *et al.* A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. *AIDS* **22**, 1487–1491 (2008).
28. Soriano, A. *et al.* Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression. *J. Infect. Dis.* **186**, 922–931 (2002).
29. Soriano, A. *et al.* Polymorphisms in the interleukin-4 receptor alpha chain gene influence susceptibility to HIV-1 infection and its progression to AIDS. *Immunogenetics* **57**, 644–654 (2005).
30. Veloso, S. *et al.* Effect of TNF-alpha genetic variants and CCR5 Delta 32 on the vulnerability to HIV-1 infection and disease progression in Caucasian Spaniards. *BMC Med. Genet.* **11**, 63 (2010).
31. Gonzalez, E. *et al.* The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* **307**, 1434–1440 (2005).
32. Liu, S., Yao, L., Ding, D. & Zhu, H. CCL3L1 copy number variation and susceptibility to HIV-1 infection: a meta-analysis. *PLoS ONE* **5**, e15778 (2010).
33. Restrepo, C. *et al.* Host factors involved in low susceptibility to HIV infection. *AIDS Rev* **13**, 30–40 (2011).
34. Piacentini, L., Fenizia, C., Naddeo, V. & Clerici, M. Not just sheer luck! Immune correlates of protection against HIV-1 infection. *Vaccine* **26**, 3002–3007 (2008).
35. Machmach, K. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells reduce HIV production in elite controllers. *J. Virol.* **86**, 4245–4252 (2012).
36. Cervantes-Barragan, L. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 3012–3017 (2012).

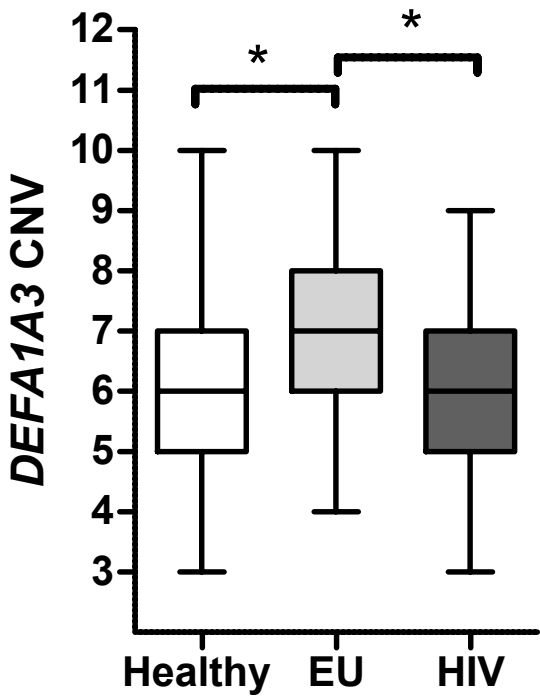
37. Lubong Sabado, R. *et al.* In vitro priming recapitulates in vivo HIV-1 specific T cell responses, revealing rapid loss of virus reactive CD4 T cells in acute HIV-1 infection. *PLoS ONE* **4**, e4256 (2009).
38. Hladik, F. & McElrath, M. J. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 447–457 (2008).
39. Manel, N. & Littman, D. R. Hiding in plain sight: how HIV evades innate immune responses. *Cell* **147**, 271–274 (2011).
40. McDonald, D. Dendritic Cells and HIV-1 Trans-Infection. *Viruses* **2**, 1704–1717 (2010).
41. Trabatttoni, D. *et al.* Human alpha defensin in HIV-exposed but uninfected individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **35**, 455–463 (2004).
42. D'Agostino, C. *et al.* In vivo release of alpha-defensins in plasma, neutrophils and CD8 T-lymphocytes of patients with HIV infection. *Curr. HIV Res.* **7**, 650–655 (2009).
43. Zhang, L. *et al.* Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* **298**, 995–1000 (2002).
44. Zhang, L., Lopez, P., He, T., Yu, W. & Ho, D. D. Retraction of an interpretation. *Science* **303**, 467 (2004).
45. Rodríguez-García, M. *et al.* Increased alpha-defensins 1-3 production by dendritic cells in HIV-infected individuals is associated with slower disease progression. *PLoS ONE* **5**, e9436 (2010).
46. Bøyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol Suppl* **5**, 9–15 (1976).
47. Ganz, T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **55**, 568–571 (1987).
48. Okazaki, T. *et al.* Plasma levels of alpha-defensins 1-3 are an indicator of neutrophil activation in pregnant and post-partum women. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **33**, 645–650 (2007).
49. Panyutich, A. V., Panyutich, E. A., Krapivin, V. A., Baturevich, E. A. & Ganz, T. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J. Lab. Clin. Med.* **122**, 202–207 (1993).
50. Khine, A. A. *et al.* Human neutrophil peptides induce interleukin-8 production through the P2Y6 signaling pathway. *Blood* **107**, 2936–2942 (2006).
51. Syeda, F. *et al.* Differential signaling mechanisms of HNP-induced IL-8 production in human lung epithelial cells and monocytes. *J. Cell. Physiol.* **214**, 820–827 (2008).
52. Seidel, A. *et al.* Cyclic and acyclic defensins inhibit human immunodeficiency virus type-1 replication by different mechanisms. *PLoS ONE* **5**, e9737 (2010).
53. Sthoeger, Z. M., Bezalel, S., Chapnik, N., Asher, I. & Froy, O. High alpha-defensin levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* **127**, 116–122 (2009).
54. Yamaguchi, N. *et al.* Concentrations of alpha- and beta-defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Res.* **58**, 192–197 (2009).
55. Tomescu, C., Abdulhaqq, S. & Montaner, L. J. Evidence for the innate immune response as a correlate of protection in human immunodeficiency virus (HIV)-1 highly exposed seronegative subjects (HESN). *Clin. Exp. Immunol.* **164**, 158–169 (2011).
56. Zapata, W. *et al.* Increased levels of human beta-defensins mRNA in sexually HIV-1 exposed but uninfected individuals. *Curr. HIV Res.* **6**, 531–538 (2008).
57. Ravet, S. *et al.* Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood* **109**, 4296–4305 (2007).
58. Tomescu, C. *et al.* Increased plasmacytoid dendritic cell maturation and natural killer cell activation in HIV-1 exposed, uninfected intravenous drug users. *AIDS* **24**, 2151–2160 (2010).
59. Ghadially, H. *et al.* Altered dendritic cell-natural killer interaction in Kenyan sex workers resistant to HIV-1 infection. *AIDS* **26**, 429–436 (2012).

60. Miles, K. *et al.* Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of alpha-defensins. *J. Immunol.* **183**, 2122–2132 (2009).
61. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
62. Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 577–582 (2007).
63. Saitoh, T. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* **12**, 109–116 (2012).
64. Manel, N. *et al.* A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* **467**, 214–217 (2010).
65. Luban, J. Innate Immune Sensing of HIV-1 by Dendritic Cells. *Cell Host Microbe* **12**, 408–418 (2012).
66. Berger, G. *et al.* APOBEC3A is a specific inhibitor of the early phases of HIV-1 infection in myeloid cells. *PLoS Pathog.* **7**, e1002221 (2011).
67. Escribese, M. M. *et al.* Alpha-defensins 1-3 release by dendritic cells is reduced by estrogen. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **9**, 118 (2011).
68. Lande, R. *et al.* Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* **3**, 73ra19 (2011).

a



b



c

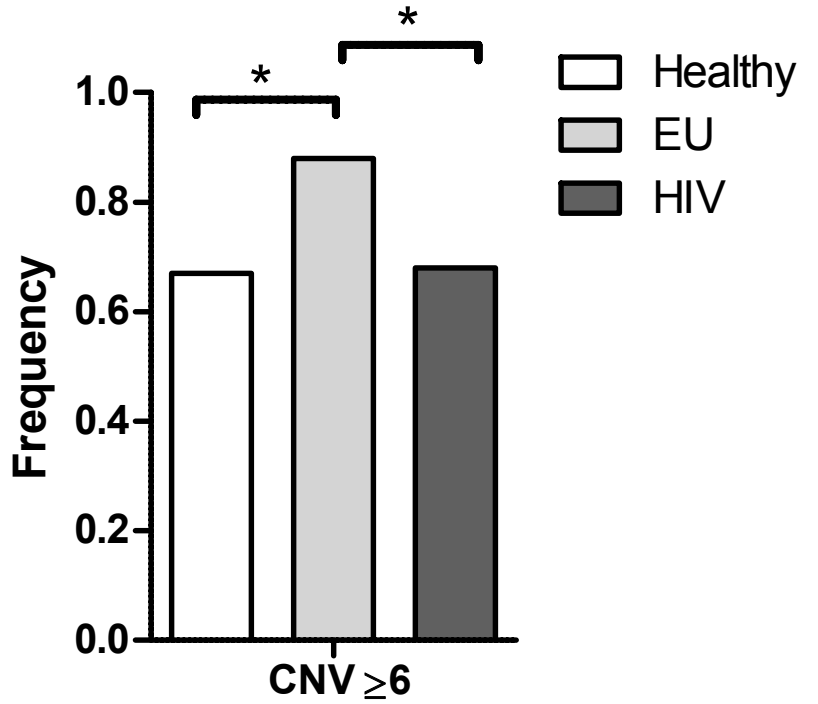
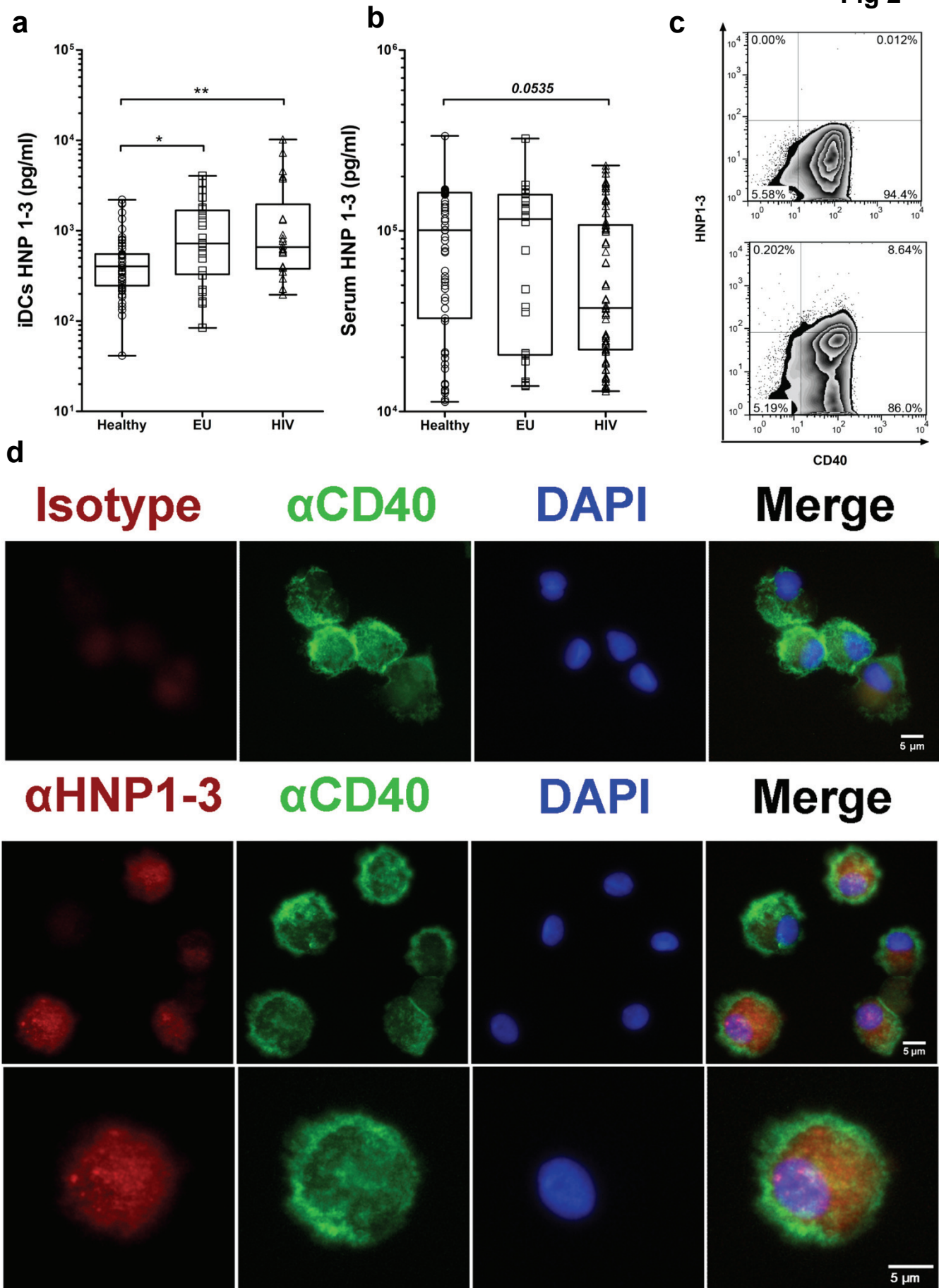
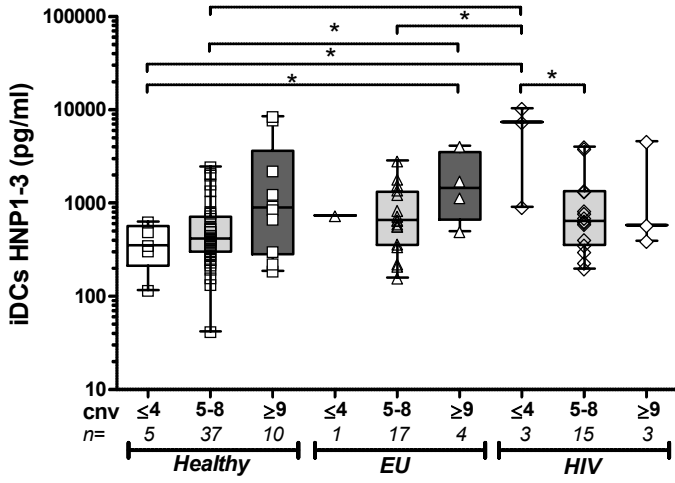


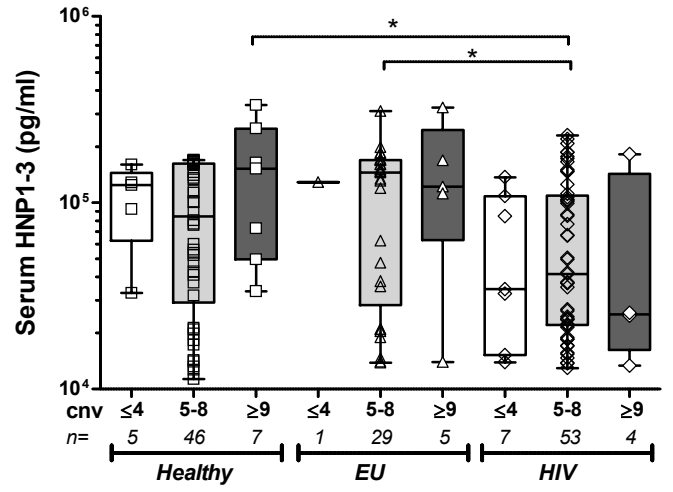
Fig 2



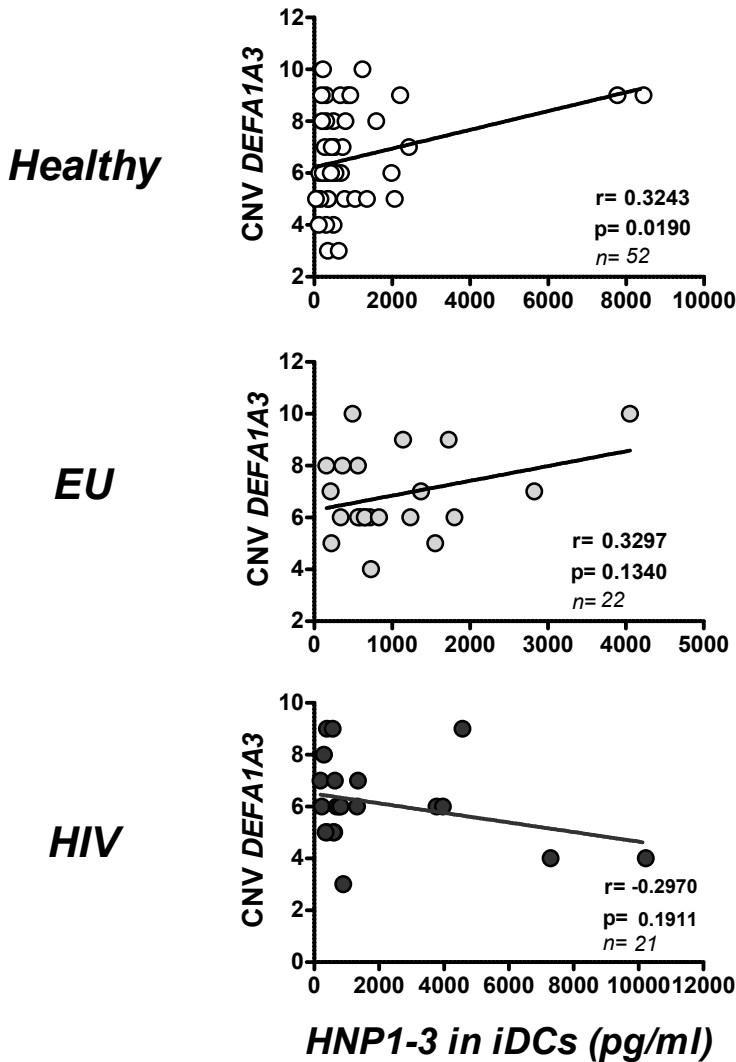
a



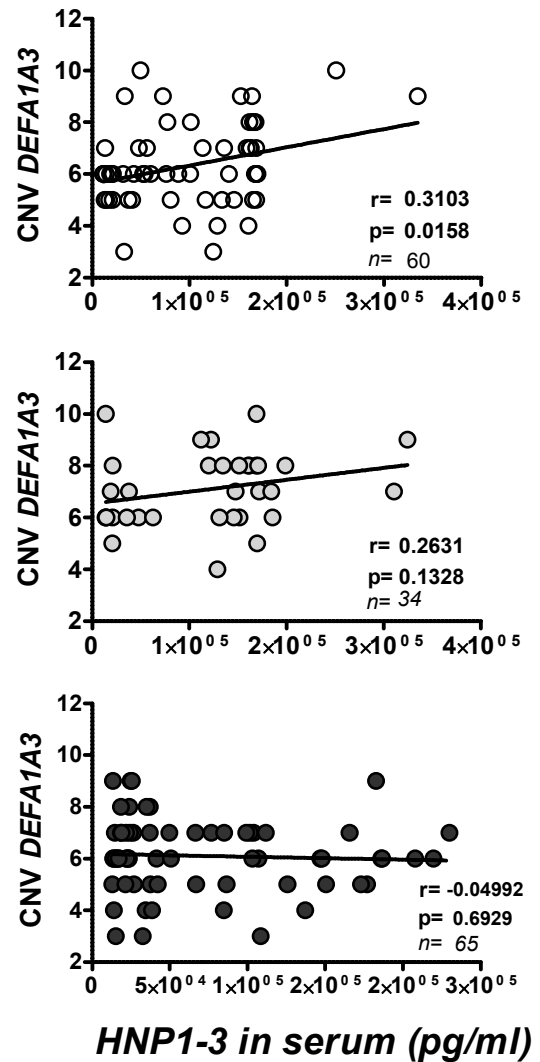
b



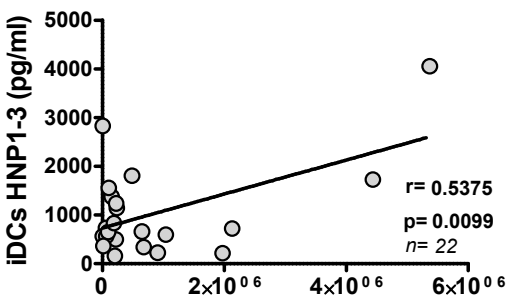
c



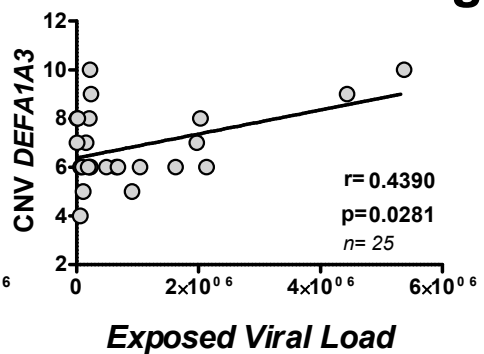
d



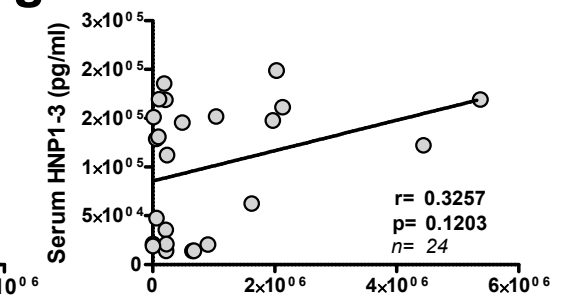
e



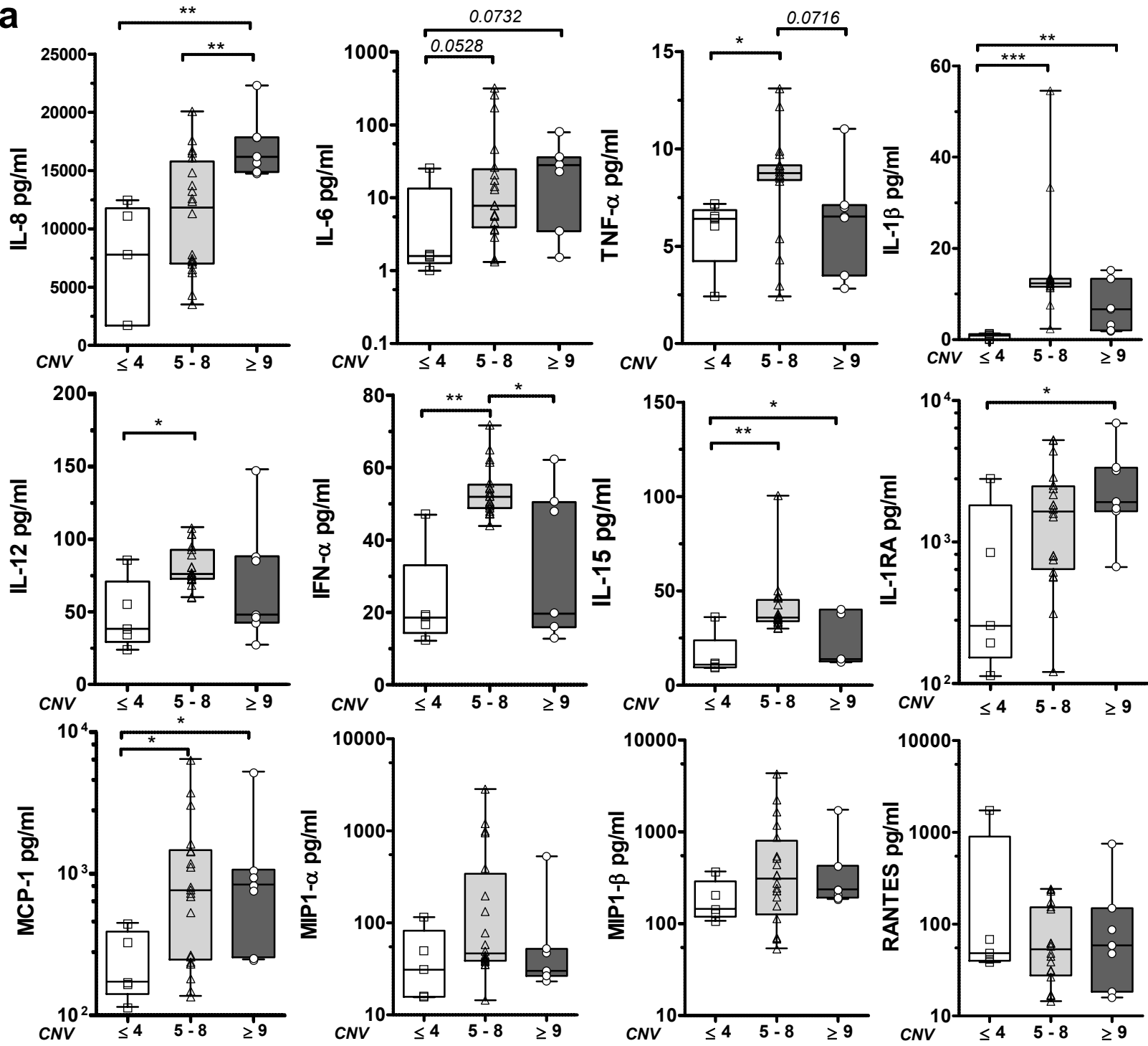
f



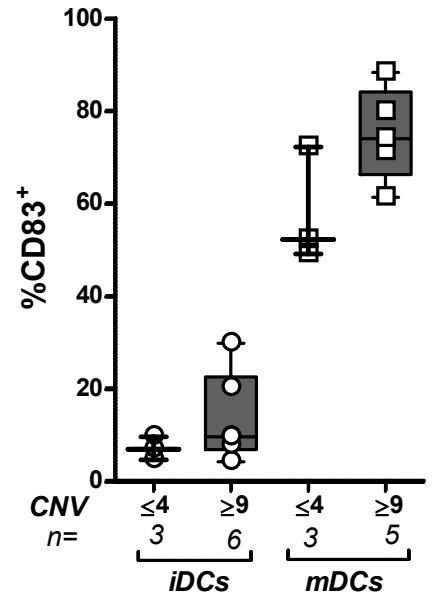
g



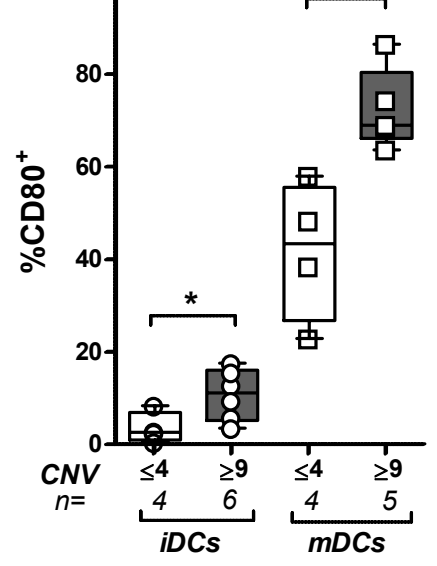
a



b



c



Enric I. Canela Campos i Rafael Franco Fernández

Grup de Neurobiologia Molecular

Av. Diagonal, 643

Edifici Prevosti, Planta -2

08028 Barcelona

La tesis doctoral de Víctor Casanova Güell **“L’Adenosina Desaminasa i les α -Defensines com a moduladors de respostes immunitàries front al VIH”** es presenta com a compendi de publicacions.

El manuscrit **“Adenosine Deaminase Enhances the Immunogenicity of Human Dendritic cells from Healthy and HIV-infected individuals”** ha estat acceptat a la revista *Plos One*, amb un factor d’impacte de 4.411. Aquest treball, s’ha realitzat en col·laboració amb la Dra. Núria Climent de l’*AIDS Research Group* de l’Hospital Clínic-IDIBAPS i el Dr. Julià Blanco de L’Institut d’Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IRSICAIXA-HIVACAT). El doctorand Victor Casanova ha realitzat la majoria del treball experimental amb la cohort d’individus sans, a excepció dels experiments de migració, realitzats per Isaac Naval, i els experiments d’apoptosi, on hi ha col·laborat Marta Massanella. Isaac Naval ha contribuït amb la pràctica totalitat d’experiments en mostres VIH. Víctor Casanova, conjuntament amb la Dra. Carme Lluís, i el Dr. PJ McCormick han treballat molt intensament en la redacció d’aquesta publicació.

El manuscrit **“Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory, and regulatory T cells”** ha estat publicat a *Journal of Leukocyte Biology* amb un factor d’impacte de 4.992. En aquest treball, realitzat en col·laboració amb el grup de la Dra. Teresa Gallart del’*AIDS Research Group* de l’Hospital Clínic-IDIBAPS, el doctorand Víctor Casanova, ha portat a terme la major part dels experiments de generació de cèl·lules memòria i de marcatge de cèl·lules reguladores $CD4^+CD25^{HI}Foxp3^+$ i ha col·laborat en els experiments realitzats amb l’ADA-Hg. Aquest treball també ha format part de la Tesi Doctoral de José María Martínez-Navío.

El manuscrit **“Increased α -Defensins 1-3 Production by Dendritic Cells in HIV-Infected Individuals Is Associated with Slower Disease Progression”** ha estat publicat a la revista *Plos One*, amb un factor d'impacte de 4.411. Aquest treball, ha estat realitzat en col·laboració amb el grup de la Dra. Teresa Gallart del *AIDS Research Group* de l'Hospital Clínic-IDIBAPS. El doctorand Victor Casanova ha contribuït amb la realització dels experiments de citometria intracel·lular. Aquest article també ha format part de la Tesi Doctoral de Marta Rodríguez-García.

El manuscrit **“Higher *DEFA1A3* Gene Copy Number and α -Defensins 1-3 Secretion are Associated with HIV Protection”** es troba en vies de preparació per a ser enviat per a la seva publicació. Aquest treball, s'ha realitzat en col·laboració amb la Dra. Núria Climent de l'*AIDS Research Group* de l'Hospital Clínic-IDIBAPS. El doctorand, Víctor Casanova, ha realitzat la pràctica totalitat dels experiments amb les mostres de la cohort d'individus sans i en part de la cohort d'individus VIH, incloent-hi la determinació dels nivells d'HNP1-3 i la determinació intracel·lular d'aquests pèptids mitjançant citometria de flux. Conjuntament amb la Dra. Núria Climent, Víctor Casanova ha contribuït molt activament en la redacció d'aquest article.

Barcelona, 20 de Novembre de 2012

Dr. Enric I. Canela Campos

Dr. Rafael Franco Fernández

Resum de Resultats i Discussió

Resum de resultats i discussió

4. RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIÓ.

4.1 Rellevància de l'ecto-ADA per a la funció de les cèl·lules dendrítiques humanes

La importància de l'ADA en el sistema immunitari es manifesta pel fet de que el seu dèficit congènit comporta una immunodeficiència severa combinada (SCID), caracteritzada per l'absència de limfòcits T i B (Cassani et al., 2008). El paper de l'ADA en el sistema immunitari es coneix des de fa dècades, però els mecanismes precisos pels quals actua no han estat del tot compresos. Després d'anys i nombrosos estudis, el que sí s'ha evidenciat es que l'activitat enzimàtica de l'ADA, tant citosòlica com extracel·lular, té un paper rellevant. Així, l'ADA és un enzim que no només forma part d'una via catabòlica responsable del metabolisme purínic (via totalment indispensable i ubiqua a tots els tipus cel·lulars), sinó que forma part d'una via de comunicació intercel·lular tot regulant els nivells extracel·lulars d'adenosina i modulant-ne la senyalització a través dels seus receptors (Franco et al., 2007). La part menys coneguda de l'acció de l'ADA en el sistema immunitari és la independent de la seva activitat enzimàtica. L'ADA extracel·lular (ecto-ADA) interacciona amb la membrana de les cèl·lules per unió als seus receptors, el CD26 (Kameoka et al., 1993; Dong et al., 1996) i els receptors d'adenosina A₁, A_{2A} i A_{2B} (Ciruela et al., 1996; Herrera et al., 2001; Gracia et al., 2011). Aquesta interacció, de forma independent a l'activitat desaminasa, modula la senyalització d'aquests receptors, mitjançant interaccions proteïna-proteïna (Ciruela et al., 1996; Herrera et al., 2001; Gracia et al., 2008, 2011). En aquest context, en el primer treball presentat en aquesta Tesi titulat "*Adenosine Deaminase Enhances the Immunogenicity of Human Dendritic cells from Healthy and HIV-infected individuals*" hem estudiat el paper de l'ecto-ADA en la funcionalitat de les cèl·lules dendrítiques immadures humanes (iDC).

Diversos estudis, incloent-hi resultats preliminars del nostre grup de recerca han descrit la presència dels quatre receptors d'adenosina en les iDC (Bours et al., 2006; Junger, 2011). A més, estudis previs del nostre grup de recerca varen demostrar també l'expressió de CD26 en la membrana d'aquestes cèl·lules (Pacheco et al., 2005). Per tant, les iDC expressen tots els receptors capaços d'unir ADA a la superfície cel·lular. No és sorprenent doncs, que s'hagi observat la presència d'aquest ecto-enzim en la membrana de les iDC, fet observat tant en models humans (Pacheco et al., 2005)

com en ratolí (Desrosiers et al., 2007). En les iDC humanes, es va observar una colocalització majoritària de l'ADA amb el receptor d'adenosina A_{2B} a la membrana plasmàtica (Pacheco et al., 2005). El fet que l'ADA de ratolí no és capaç d'unir-se al CD26 d'aquesta espècie ni al humà (Richard et al., 2002) i el fet de que les iDC de ratolí expressin ADA en la seva superfície, dona suport a la implicació dels receptors d'adenosina en la unió d'ADA en la membrana de les iDC. Per tal d'investigar les conseqüències funcionals d'aquesta unió, en aquest treball es va estudiar els efectes de l'addició d'ADA a cultius de iDC humanes. L'addició d'ADA a les iDC és capaç d'incrementar l'expressió de molècules co-estimuladores i la secreció de citocines i quimiocines que promouen respostes inflamatòries i de tipus Th-1. Aquests canvis es tradueixen en una major capacitat de les DC d'activar limfòcits T CD4⁺ de forma al·logènica. Globalment, aquests resultats posen de manifest que la interacció de l'ADA amb les DC en general promou una major immunogenicitat d'aquestes, facilitant els processos d'activació de respostes immunitàries.

Al tractar les iDC amb ADA hem observat un increment significatiu de citocines pro-inflamatòries/Th-1, en particular d'IL-6 i d'IL-12 i en menor mesura de TNF- α . Aquest increment també s'observa per diverses quimiocines com ara CCL2(MCP-1), CCL3(MIP1- α) CCL4(MIP-1 β) i CCL5(RANTES). A més s'ha observat un increment en l'expressió dels marcadors de maduració CD80, CD83, CD86 i CD40. Ambdós fets suggereixen que l'ADA indueix canvis en la direcció d'una major activació i maduració. No obstant, el fet que només s'observin increments en l'expressió de molècules coestimuladores com CD80, CD83, CD86 o CD40 però no en HLA de tipus I (ABC) o de tipus II (DR) podria ser indicatiu de que l'efecte de l'ADA contribueix a iniciar, més que no pas promoure per si sol, el programa de maduració d'aquesta cèl·lula. Aquest punt es veu reforçat davant els resultats que mostren com l'ADA incrementa lleugerament l'expressió de CCR7, un receptor de quimiocines que s'expressa preferentment en DC madures, i que facilita la seva migració cap a gangli limfàtic. No obstant, l'increment de CCR7 no és suficient per incrementar la migració de les dendrítiques cap a gradients de CCL19 i CCL21, els lligands de CCR7. Donat que aquesta migració succeeix en estadis avançats del programa de maduració de la cèl·lula dendrítica, l'ADA actuaria com a iniciador o facilitador del programa de maduració.

Per tal d'esbrinar quins mecanismes poden estar involucrats en l'acció de l'ADA, cal tenir en compte que l'ADA és capaç de degradar l'adenosina existent al medi extracel·lular, que actua reduint l'activació de diverses cèl·lules del sistema immunològic. Així, mitjançant la senyal a través dels seus receptors, principalment del tipus A₂, l'adenosina redueix l'activació i secreció de TNF- α de cèl·lules dendrítiques i macròfags humans en resposta a LPS (Panther et al., 2001, 2003; Buenestado et al., 2010). Per altre banda, al tractar DC derivades de moll d'os de ratolí amb adenosina o agonistes no selectius del seus receptors (NECA), s'observen respostes inflamatòries reduïdes a estímuls de LPS. A més, aquesta disminució no s'observa en animals *knockout* per al receptor d'adenosina A_{2B}, implicant-lo de forma decisiva en els efectes observats (Ben Addi et al., 2008; Wilson et al., 2009). El fet que l'ADA degradi de forma molt eficient aquest nucleòtid suggereix que en podria antagonitzar les funcions en aquelles cèl·lules on l'ADA es localitza a la superfície cel·lular. Per estudiar si els efectes observats en les iDC després de l'addició d'ADA es corresponien amb una possible degradació d'adenosina, es va inhibir l'activitat catalítica de l'ADA amb HgCl₂ (ADA-Hg), donant lloc a un enzim que manté la capacitat d'unir-se als seus receptors, però és incapaç de degradar adenosina (Ciruela et al., 1996; Herrera et al., 2001; Pacheco et al., 2005). Amb aquesta ADA-Hg es va observar que efectivament es reduïen els increments induïts per l'ADA en l'expressió de molècules coestimuladores i en la secreció de citocines i quimiocines pro-inflamatòries i de tipus Th-1, en comparació amb l'ADA activa. Cal destacar però que aquesta reducció no és total, i amb ADA-Hg encara s'observen increments significatius en l'expressió de CD80 i CD83 i en la secreció de nombroses citocines i quimiocines en comparació amb les dendrítiques sense tractar. Per tant, aquests resultats indiquen que l'acció enzimàtica de l'ADA és en part responsable, però no és l'única implicada en els efectes observats en la cèl·lula dendrítica.

El CD26 va ser la primera molècula identificada com a receptor capaç d'unir ADA (Kameoka et al., 1993; Dong et al., 1996, 1997). Tot i haver-se descrit com a un marcador d'activació limfocitari, el CD26 s'expressa en un elevat nombre de cèl·lules. Així la interacció CD26-ADA ha estat descrita en cèl·lules tant diferents com limfòcits T, B, monòcits (Aran et al., 1991) o cèl·lules endotelials (Eltzschig et al., 2006). Estudis

previs del grup van descriure la presència de CD26 a la membrana de DC humanes (Pacheco et al., 2005), tot i que amb una expressió relativament baixa. Donades les clares implicacions funcionals de les interaccions CD26-ADA (Gorrell et al., 2001; Franco et al., 2007; Van Linden y Eltzschig, 2007) i que aquestes podien tenir lloc de forma independent a l'activitat enzimàtica de l'ADA (Pacheco et al., 2005), hem estudiat la implicació del CD26 en els efectes d'ADA sobre les iDC. Per a fer-ho es va treballar amb l'anticòs monoclonal TA5.9, que reconeix l'epítol indispensable per a la unió de l'ADA a la molècula del CD26 (Blanco et al., 2000; Martinez-Navio et al., 2009) i que per tant, és capaç de bloquejar aquesta interacció. Així a l'afegir l'ADA a les iDC pre-incubades amb el TA5.9 es va observar una reducció important de l'efecte de l'ADA en quan a l'increment de CD80 i CD83 i en menor grau, una reducció de les principals citocines promogudes per l'ADA, demostrant la implicació de la unió a CD26 en part dels efectes mitjançats per l'ADA.

Per tant, la conjunció dels efectes deguts a l'activitat enzimàtica i a la unió de l'ADA als seus receptors són capaços d'induir els efectes observats en la maduració de les DC. La funció de l'ecto-ADA present a la membrana de la cèl·lula dendrítica seria, en últim terme, permetre una millor activació de les cèl·lules T en la immunosinapsi mitjançant una incrementada maduració de les cèl·lules dendrítiques. Efectivament, en aquest treball hem demostrat una major capacitat de les DC tractades amb ADA d'activar limfòcits T CD4⁺ de forma al·logènica. Per tant, l'ADA promou una major immunogenicitat de les DC, facilitant els processos d'activació de respostes immunitàries.

Duran el procés de revisió del nostre article, un altre grup de recerca ha corroborat la interacció de l'ADA amb el CD26 en DC humanes (Zhong et al., 2012). Aquest treball confirma la presència de CD26 en dendrítiques humanes, i que aquest s'expressa en molta menor mesura que en els limfòcits. Els autors de l'article, observen, en un model de co-cultiu al·logènic, que la presència d'ADA en les DC és capaç d'incrementar la proliferació limfocitària i avaluen el paper de l'adenosina i del CD26 en aquest procés. Així, suggereixen una implicació del CD26 per a ancorar ADA a la membrana de les dendrítiques i mitjançar la degradació d'adenosina extracel·lular. Gràcies a aquest fet l'ADA activaria la proliferació limfocitària. Aquest treball donaria

doncs suport a la observació realitzada en aquesta Tesi respecte al paper del CD26 a la cèl·lula dendrítica. A més, aquests resultats no serien incompatibles amb el paper prèviament descrit per als receptors d'adenosina. La baixa expressió relativa de CD26 en les cèl·lules dendrítiques però l'elevada presència d'ecto-ADA observada en les mateixes (Pacheco et al., 2005; Desrosiers et al., 2007) podria suggerir que els receptors d'adenosina actuarien com a llocs d'ancoratge alternatiu, un cop el CD26 es troba saturat d'ecto-ADA, o en cas que el CD26 no s'expressi. Aquest últim fet ja es va observar en línies cel·lulars T *Jurkat* i en limfòcits humans, on en una fracció de cèl·lules CD26⁻, també s'observava presència d'ecto-ADA, i aquesta co-localitzava amb els receptors A_{2B} (Cordero et al., 2001; Herrera et al., 2001).

4.2 Implicació dels efectes de l'ADA sobre les iDC per a la patogènia del VIH.

El VIH és conegut per la seva capacitat d'alterar múltiples mecanismes immunitaris amb la finalitat d'inutilitzar-los o bé, d'usar-los en el seu propi benefici: una major disseminació i replicació viral. Així, un exemple d'aquestes alteracions és la reducció de l'expressió de molècules coestimuladores en les iDC (Chaudhry et al., 2005), fet que redueix la capacitat estimuladora d'aquestes DC un cop es troben amb el virus. A més, el virus és capaç d'influir sobre el patró de citocines secretat per les DC, tot desviant-lo cap a una resposta de tipus Th-2 (Maggi et al., 1994; Klein et al., 1997; Buonaguro et al., 2009), inapropiada per a combatre efectivament al virus. Per altra banda, estudis previs del grup de recerca varen demostrar la capacitat de la proteïna de la envolta gp120 de desplaçar la unió de l'ADA al CD26 (Valenzuela et al., 1997; Blanco et al., 2000) fet que podria ser un altre mecanisme per a dificultar respostes immunitàries enfront al virus (Martinez-Navio et al., 2009). Recentment també s'ha observat una major presència de cèl·lules T reguladores en les respostes immunitàries enfront al VIH (Suchard et al., 2010; Shaw et al., 2011). A aquest fet se li ha de sumar que les Tregs de pacients VIH positius mostren nivells més elevats de CD39 (Nikolova et al., 2011; Schulze Zur Wiesch et al., 2011), ectoenzim que, de forma coordinada amb CD73, és capaç de generar adenosina i per tant, suprimir respostes immunitàries. Aquesta major expressió, a més, s'ha vist correlacionada amb la progressió de la infecció (Nikolova et al., 2011; Schulze Zur Wiesch et al., 2011).

En el grup de recerca de malalties infeccioses i SIDA de l'hospital Clínic de Barcelona, amb el que s'ha col·laborat estretament per realitzar aquesta Tesi, es du a terme una vacuna terapèutica consistent en la generació de DC *ex vivo* de pacients VIH asimptomàtics, la càrrega de les DC amb el propi virus del pacient inactivat per calor i la posterior maduració i injecció de les DC al mateix pacient. Aquesta estratègia està encaminada a potenciar les respostes immunitàries del propi pacient, tot evitant els efectes negatius d'elevades càrregues virals anteriorment esmentats. Els resultats positius d'aquesta teràpia (García et al., 2011) realcen la importància de preservar la funció de les DC per obtenir bones respostes immunitàries enfront al virus. Diversos estudis demostren a més, que no totes les alteracions en el sistema immunitari induïdes per les partícules virals reverteixen completament tot i anys de tractament antiretroviral (Hainaut et al., 2011; Méndez-Lagares et al., 2012) fet que realçaria el valor de teràpies cel·lulars per a reduir o intentar eliminar el màxim de partícules virals.

Dins d'aquest mateix treball hem pogut demostrar que la capacitat de l'ADA d'incrementar els marcadors de maduració de cèl·lules dendrítiques i la secreció de citocines pro-inflamatòries observada en els donants sans també es reproduïx en aquesta cohort de donants VIH positius. La única diferència és que l'increment observat en l'expressió de CD40 no resulta estadísticament significatiu. Aquests resultats suggereixen que la unió d'ADA, a la superfície de les iDC podria incrementar respostes immunitàries enfront al VIH en pacients asimptomàtics en bon estat immunològic. Quan es va estudiar si alguna de les característiques clíniques dels pacients estudiats correlacionava amb un major efecte de l'ADA, es va poder veure que a major càrrega viral del pacient, l'ADA incrementa més l'expressió de CD80. Donat que les partícules virals poden induir una certa activació i maduració basal de les DC (Fantuzzi et al., 2004; Fonteneau et al., 2004) i que precisament les DC CD80⁺ són les que expressen CD26 (Zhong et al., 2012), és possible que una major unió d'ADA al CD26 pugui estar implicada en aquests efectes.

És de destacar també els increments en la secreció d'IL-12 observats en les iDC d'aquests pacients, doncs aquesta citocina resulta clau per a la inducció de respostes de tipus Th-1, i la seva secreció es troba normalment reduïda per l'acció del VIH (Smed-

Sörensen et al., 2004). Per altra banda, és també important l'increment de les quimiocines CCL3, CCL4 i CCL5 observat en presència d'ADA. Les 3 són els lligands naturals del CCR5, correceptor d'entrada per a les soques R5 del VIH. S'ha descrit que la interacció dels lligands amb el CCR5 actua bloquejant la unió del virus a aquest receptor, impedit així l'entrada del virus a la cèl·lula (Cocchi et al., 1995; Berger et al., 1999). De fet, el CCR5 és una diana farmacològica en la que s'està treballant actualment, com ho demostra l'existència de varis fàrmacs dissenyats com a antagonistes del receptor (Lieberman-Blum et al., 2008; Maeda et al., 2012). Una altre quimiocina que es veu incrementada de forma important és la IL-8. A banda d'atraure neutròfils a focus inflamatoris, s'ha proposat que aquesta quimiocina podria també bloquejar la transcripció del VIH (Rollenhagen y Asin, 2010). De forma conjunta, aquests resultats podrien suggerir que l'ADA, a més d'incrementar la immunogenicitat de la cèl·lula dendrítica, podria actuar reduint de forma indirecte l'entrada viral. Els efectes descrits anteriorment, conjuntament amb estudis previs del grup mostrant que l'ADA és capaç d'incrementar la proliferació de limfòcits T en resposta a dendrítiques carregades d'antígens VIH (Climent et al., 2009), suggereix que l'ADA podria contribuir a millorar les respostes immunitàries enfront del VIH en un context de vacuna terapèutica dirigida a pacients en un bon estat immunològic.

4.3 Caracterització de l'efecte de l'ADA sobre l'activació i proliferació de limfòcits T Naïve.

L'ADA, a més de promoure una major maduració i immunogenicitat de les DC, també pot actuar sobre els limfòcits, modulant-ne l'activació durant la immunosinapsi. Estudis previs del grup de recerca ja varen demostrar la capacitat de l'ADA d'incrementar la proliferació de limfòcits T tant en activacions mitjançades per α -CD3 (Martín et al., 1995) com en models de co-cultius autòlegs entre cèl·lules dendrítiques i limfòcits T (Pacheco et al., 2005). És interessant destacar que aquests increments en proliferació limfocitària només es produïen en cas de la presència d'una senyal activadora principal per al limfòcit, i no per la sola presència de l'ADA, fet que suggeria que l'ADA es podia comportar com a senyal costimuladora (Martín et al., 1995; Pacheco et al., 2005), molt probablement degut a la seva interacció amb el CD26. Es va formular la hipòtesi de que l'ADA es podia ancorar a l'A_{2B} de la cèl·lula dendrítica i

actuar com a pont molecular entre l'A_{2B} de la dendrítica i el CD26 dels limfòcits durant la sinapsi immunològica (Pacheco et al., 2005). Aquests contactes podrien resultar en la major proliferació limfocitària i secreció de TNF- α , IL-6 i IFN- γ (Pacheco et al., 2005). Amb aquests precedents, en el segon treball presentat en aquesta Tesi, titulat "*Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory, and regulatory CD4⁺ T cells*" s'ha aprofundit en l'efecte de l'ADA sobre l'activació i proliferació de limfòcits T naïve. En particular s'ha estudiat l'activació dels limfòcits T CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD25⁻ (naïve) en resposta a cèl·lules dendrítiques autòlogues carregades amb dosis subòptimes de superantigen (SEA) en absència o presència d'ADA. L'addició d'ADA als co-cultius autòlegs incrementa l'expressió de marcadors d'activació com ara CD25 o CD45RO suggerint una major generació de cèl·lules efectores. A més, al llarg del temps, el nombre de cèl·lules amb un fenotip memòria (CD4⁺ CD25⁻ CD45RO⁺) també es veu augmentat. Aquests efectes s'observen també amb d'ADA-Hg enzimàticament inactiva, suggerint un important paper de la unió d'ADA als seus receptors en aquests efectes. L'ADA és capaç d'incrementar la secreció de diferents citocines (TNF- α , IL-6 i IFN- γ) al medi (Pacheco et al., 2005), i en aquesta Tesi s'observa que la IL-6, actuant de forma sinèrgica amb TNF- α i IFN- γ , contribueix als increments de cèl·lules efectores i memòria induïts per l'ADA. En aquests co-cultius, l'ADA potencia la generació de cèl·lules reguladores (Tregs) amb un fenotip CD4⁺ CD25^{HI} FOXP3⁺ per un procés on l'activitat enzimàtica de l'ADA s'hi veu implicada.

Totes aquestes observacions apunten cap a una situació on l'ancoratge de l'ADA a la membrana de les DC i dels limfòcits mitjançant la seva unió als receptor d'adenosina (principalment A_{2B}) i al CD26 respectivament (Pacheco et al., 2005) possibilitaria la consegüent senyal costimuladora. La petita cua citoplasmàtica del CD26, sense dominis coneguts de senyalització (Morimoto y Schlossman, 1998) revela la necessitat de la interacció del CD26 amb altres proteïnes senyalitzadores, com el CD45 (Ishii et al., 2001; Kobayashi et al., 2004). S'ha descrit que es requereix la presència del CD26 als *lipid rafts* per a promoure la senyal coestimuladora a través del CD45 i que aquesta senyal requereix l'associació amb la isoforma CD45RO. Per tant, en el nostre model de co-cultiu, on inicialment totes les cèl·lules són naïve i expressen la isoforma CD45RA i poca quantitat relativa de CD26, l'efecte de l'ADA seria efectiu

només un cop la cèl·lula T hagi estat activada mitjançant la presentació antigènica, i s'iniciï el canvi d'expressió de CD45RA a CD45RO. Aquesta suposició concorda amb el fet de que l'ADA actua de co-estimulador i amb la manca d'efectes d'ADA a curt termini en aquest model. També estaria d'acord amb el fet que els efectes de l'ADA en el model de co-cultiu usant cèl·lules T CD4⁺ naïve sigui relativament menor al observat en un model de co-cultiu amb limfòcits totals (Pacheco et al., 2005).

En aquesta Tesi s'ha demostrat que les citocines induïdes per l'ADA són importants per a explicar els efectes d'aquesta en l'increment de cèl·lules efectores i memòria. S'ha observat que la IL-6 és la principal implicada en aquest efecte, actuant en sinèrgia amb TNF- α i IFN- γ . Aquests resultats estan d'acord amb estudis on es destaca la importància de la IL-6 per a la generació de memòria immunològica (Longhi et al., 2008). A més, l'increment d'aquestes citocines de perfil Th-1 observat en presència d'ADA està d'acord amb el perfil de secreció de citocines induïda per ADA sobre les DC abans esmentada. Així, per exemple, en presència d'ADA, les iDC incrementen de forma important els nivells d'IL-12, claus per la polarització a Th-1. Així en els co-cultius s'observa un increment notable dels nivells d'IFN- γ , compatibles amb una presentació antigènica en presència d'IL-12. Per altra banda, l'ADA també incrementa els nivells d'IFN- γ en resposta a anticossos α -CD3 en absència de DC (Martinez-Navio et al., 2009), suggerint que la senyal via CD26 també està implicada en l'increment dels nivells de citocines secretades pels limfòcits.

És probable que les citocines que s'incrementen en presència d'ADA tinguin també un efecte sobre l'expressió de l'ADA i els seus receptors. En aquesta Tesi s'ha observat que la IL-6 sola i la combinació TNF- α , IL-6 i IFN- γ són capaces d'incrementar tant l'expressió de CD26 com d'ADA en els limfòcits T CD4⁺ activats, fet que podria suposar un *feedback* positiu per a l'activació de les respostes immunitàries de tipus Th-1. Això concorda amb estudis previs, on es va poder observar com la IL-2 i la IL-12 eren capaces d'incrementar tant l'expressió de CD26 com la de l'ADA en limfòcits T humans, mentre que el TNF- α no hi influïa, i la IL-4 reduïa aquesta expressió (Cordero et al., 2001). En un estudi recent s'observa una major expressió (i activitat) d'ADA en superfície de cèl·lules T CD4⁺ quan aquestes s'incubaven en presència d'IL-2, IL-12 o

IFN- γ , mentre que la IL-10 o la PGE₂ produïen resultats contraris (Mandapathil et al., 2012).

4.4 Paper de l'ADA en la generació de cèl·lules T Reguladores

En aquest segon treball presentat en aquesta Tesi s'ha posat també de manifest que l'ADA potencia la generació de cèl·lules reguladores (Tregs) amb un fenotip CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺, fet que es veu influenciat per l'activitat enzimàtica de l'ADA. Recentment s'ha establert un vincle entre l'adenosina i les cèl·lules reguladores. Així, les cèl·lules reguladores CD4⁺CD25^{hi}, expressen alts nivells de CD39, ecto-nucleotidasa que actua generant adenosina (Deaglio et al., 2007). Aquesta adenosina actuaria a través del receptor A_{2A} de les cèl·lules T efectores, contribuint així a inhibir les seves funcions (Csóka et al., 2008). L'ADA, al unir-se a la superfície cel·lular, podria afavorir la degradació d'adenosina, i per tant l'activació inicial de les cèl·lules T. Així, l'ADA facilitaria l'inici de les respostes immunitàries. Aquest fet vindria a més, incrementat per la secreció de citocines pro-inflamatòries com TNF- α o IL-6 induïda per l'ADA tant en la dendrítica com en els limfòcits. Aquestes citocines s'han demostrat capaces d'antagonitzar les funcions supressores de les Treg, permetent l'activació i presentació antigènica de les dendrítiques tot i la presència d'aquesta població reguladora (Pasare y Medzhitov, 2003; Shen y Goldstein, 2009).

Per altra banda, a més de la població de Tregs "natural" generada al tim, existeix una població de cèl·lules reguladores "induïdes" que es generen en perifèria, en resposta a la presentació antigènica (Bilate y Lafaille, 2012). Aquestes subpoblacions, tot i tenir el mateix propòsit final, poden diferir clarament en alguns aspectes de la seva biologia (Horwitz et al., 2008). Així, en aquesta Tesi, al treballar amb cèl·lules T CD4⁺ naïve, la població reguladora observada només pot correspondre a la induïda per l'activació per part de la dendrítica carregada amb SEA. S'ha demostrat que estímuls subòptims per a l'activació limfocitària, conjuntament amb senyals coestimuladores són especialment efectius en la generació d'aquesta població de Tregs, que són capaces de mantenir l'expressió del factor de transcripció FOXP3 estable durant més temps (Horwitz et al., 2008). En canvi, estímuls òptims o forts (de l'ordre de $\mu\text{g/ml}$ de CD3/CD28 o relacions 1:1 de cèl·lules T:CD3/CD28 *beads*) donen

lloc també a l'expressió de FoxP3, però aquesta és transitòria i es perd totalment en cas de re-estímul (Floess et al., 2007; Horwitz et al., 2008). En el cas d'aquesta Tesi, possiblement la conjunció d'estímul subòptim (SEA 100pg/ml, proporció dendrítiques:limfòcits 1:40) i les senyals coestimuladores de l'ADA afavoreixen la generació d'aquesta població amb fenotip regulador.

4.5 Implicacions del paper de l'ADA en l'activació limfocitària per a la patogènia del VIH.

És molt interessant destacar que en la cohort de pacients VIH estudiats s'observa que l'ADA pot potenciar la generació de cèl·lules T CD4⁺ efectores i memòria d'una manera semblant als individus sans. Cal destacar que aquesta cohort correspon a individus asimptomàtics, en bon estat immunològic, on les partícules virals no poden interferir de forma negativa en la interacció CD26/ADA (Valenzuela et al., 1997; Blanco et al., 2000; Martinez-Navio et al., 2009). La conjunció dels efectes de l'ADA sobre les DC descrits en apartats anteriors i el coestímul proporcionat a les cèl·lules T CD4⁺ pot ser molt important per potenciar respostes de tipus Th-1, les més apropiades per a combatre infeccions virals.

Pel que fa a la generació de cèl·lules T reguladores, estudis previs han demostrat una major freqüència de cèl·lules Tregs naturals en pacients infectats pel VIH, i que aquesta freqüència correlaciona amb majors càrregues virals i menors nombres de cèl·lules T CD4⁺, fet que suggereix que aquestes cèl·lules podrien estar implicades en la progressió de la malaltia (Suchard et al., 2010). En aquest sentit, l'acció de l'adenosina sembla decisiva per a la funció supressora de les Treg en el context d'infecció per VIH. Així s'ha observat una major expressió de CD39 en les Tregs de pacients infectats pel VIH, fet que correlaciona amb els marcadors de progressió de la infecció (Schulze Zur Wiesch et al., 2011; Nikolova et al., 2011). Així, no només la infecció pel VIH sembla generar més Tregs, sinó que aquestes serien capaces de generar més adenosina, que actuaria via els receptors A_{2A} per suprimir respostes immunitàries. La importància d'aquest mecanisme es demostra amb l'observació de que polimorfismes genètics en el CD39 que donen lloc a una menor activitat d'aquest ecto-enzim confereixen una menor progressió de la malaltia (Nikolova et al., 2011). En

aquesta Tesi hem observat que l'ADA, tot i incrementar la generació de cèl·lules amb fenotip regulador, és capaç d'incrementar les cèl·lules efectores en els pacients asimptomàtics d'una forma similar als individus sans. Això pot ser degut a la degradació de l'adenosina del co-cultiu per l'ADA. De fet, això ja s'ha observat en co-cultius amb dendrítiques carregades amb el virus inactivat i limfòcits totals autòlegs (Climent et al., 2009). L'acció enzimàtica de l'ADA i la interacció amb el CD26 de forma preferent en les cèl·lules efectores i memòria, serien els mecanismes pels que l'ADA seria realment decisiva com a ecto-enzim en respostes secundàries o de memòria davant antígens especialment poc immunogènics com el VIH. En conjunt (veure esquema 1) l'efecte de l'ADA sobre les DC contribuiria a un major poder co-estimulador d'aquestes cèl·lules, la interacció de l'ADA amb el CD26 dels limfòcits permetria el desencadenament de senyals coestimuladores i l'increment de la secreció de citocines pro-inflamatòries i de tipus Th-1 afavoriria la polarització cap a una resposta antiviral, en un ambient pro-inflamatori on l'acció de les cèl·lules Tregs es podria veure dificultada.

4.6 Les α -defensines 1-3 com a factor de resistència natural a la infecció per VIH.

Els anteriors apartats demostren com el conjunt d'efectes mitjançats per l'ADA estimulen respostes immunitàries adaptatives, principalment per cèl·lules T CD4⁺. No obstant, aquestes mateixes cèl·lules són la principal diana del VIH, i aquest mateix virus s'ha demostrat capaç d'alterar diversos mecanismes immunològics, com ara la interacció CD26-ADA, fet que limita un possible ús terapèutic de l'ADA a pacients asimptomàtics amb baixes càrregues virals.

Les respostes immunitàries innates, en canvi, podrien oferir més possibilitats d'actuar enfront el VIH abans de que aquest pugui establir una infecció que resulti incontrolable per al sistema immunològic. Les α -defensines 1-3 serien el prototip de mol·lècula efectora de la immunitat innata, de resposta ràpida i d'ampli espectre, que a més d'actuar directament sobre el VIH, facilitarien i incrementarien respostes adaptatives davant posteriors exposicions al mateix virus.

4.7 Paper de la secreció d' α -defensines per part de les iDCs com a factor implicat en una menor progressió de la infecció.

Estudis previs del grup de recerca de la unitat de malalties infeccioses i SIDA ja va demostrar la capacitat de iDCs derivades de monòcit per a produir i secretar α -defensines (Rodríguez-García et al., 2007). Cal destacar que aquesta producció era màxima en l'estat immadur d'aquestes cèl·lules, que és l'estat en el qual aquestes entren en contacte amb els possibles patògens o antígens foranis. Donada l'elevada activitat antiviral i anti-VIH de les α -defensines (Klotman y Chang, 2006), capaces d'inhibir pràcticament tots els mecanismes d'entrada del VIH (Demirkhanyan et al., 2012), es va determinar el paper de la secreció d' α -defensines per part de les iDCs com a factor implicat en una menor progressió de la infecció.

Així, en el treball titulat "*Increased α -defensins 1-3 production by dendritic cells in HIV-infected individuals is associated with slower disease progression*" es posa de manifest que les iDCs derivades de monòcits d'aquells pacients amb millor control de la infecció mostren nivells de secreció de α -defensines 1-3 (HNP1-3) més elevats que els de les iDCs derivades de grups de pacients on aquest control no es produeix. Cal destacar que la cohort de pacients infectats per VIH, independentment del seu grau de control, mostra una secreció d'HNP1-3 molt més elevada que la població no infectada. Finalment, els paràmetres clínics dels pacients amb una secreció d'HNP1-3 per sobre la mediana (>650pg/ml) mostren que aquests pacients tenen menys indicadors de progressió de la malaltia en comparació amb els pacients amb valors <650 pg/ml. Concretament, els pacients amb elevada secreció d'HNP1-3 no mostren caigudes dels nivells de CD4⁺ per sota de 350 cels/mm³, mostren un menor increment en la càrrega viral i cap d'ells ha necessitat iniciar HAART. Tots aquests factors han estat mesurats durant 150 mesos.

La rellevància *in vivo* del model de iDC derivada de monòcit en situacions d'inflamació, i la observació de que cèl·lules dendrítiques mieloides i plasmocitoides aïllades directament de sang secreten també HNP1-3 (Escribese et al., 2011) dóna peu a que les observacions *ex vivo* anteriorment esmentades puguin tenir lloc també *in vivo*. Donada la seva distribució tissular, les cèl·lules dendrítiques són de les primeres cèl·lules en establir contacte amb el VIH un cop aquest és capaç de superar les barreres físiques de les mucoses (Hladik y McElrath, 2008). Per tant es podria especular que una major secreció de defensines per part de la dendrítica davant el

primer contacte amb el virus podria facilitar la seva inactivació, o bé protegiria a la dendrítica de possibles alteracions funcionals degudes a l'acció del VIH. Aquest fet resultaria avantatjós, podent reduir els processos de *trans-infecció* mitjançats per la dendrítica i incrementant les possibilitats de generar respostes immunitàries davant el virus. A més és important destacar que aquestes respostes també es veurien clarament influenciades, en funció a les diferents quantitats secretades de defensines. Així, tal i com estudis previs han demostrat, les defensines són capaces d'influir en el procés de maduració de la dendrítica (Rodríguez-García et al., 2009), així com en l'atracció de més cèl·lules immunitàries cap a focus inflamatoris (Grigat et al., 2007)

Els resultats del treball aquí presentat són els primers que vinculen la secreció d'HNP1-3 per part de la cèl·lula dendrítica a possibles mecanismes de control del VIH. Estudis previs ja havien destacat el fet de que la secreció d'aquests pèptids es troba incrementada en individus VIH positius, especialment controladors, però aquestes observacions s'havien basat sobretot en cultius de cèl·lules CD8⁺ (Zhang et al., 2002; D'Agostino et al., 2009) i en biòpsies de teixit cervicovaginal (Trabattoni et al., 2004).

És interessant destacar l'absència de correlacions entre la quantitat de defensines en el plasma amb marcadors de progressió de la malaltia, com ara els nivells de CD4⁺. A més, al contrari del que passa amb les iDCs, no s'observen diferències entre els diferents grups de pacients (controladors i no controladors) en quant als nivells d'HNP1-3 plasmàtics. S'ha de destacar la diferència entre la quantitat de HNP1-3 entre el plasma i les iDCs. Així la secreció per part de les dendrítiques de pacients està al voltant del ng/ml, mentre que en plasma fàcilment s'observa fins a 100 vegades aquesta quantitat. Això indicaria que les iDCs, principalment per la seva localització, però també per les quantitats que són capaces de produir no contribuirien als nivells d'HNP1-3 en plasma. De fet es considera que els nivells en aquesta localització estan molt més relacionats amb els neutròfils (Ganz, 1987). Per altra banda, en estudis en primats, s'ha observat que els nivells plasmàtics de defensines es troben incrementats en la fase aguda de la infecció per SIV, però baixen un cop la infecció esdevé crònica (Baroncelli et al., 2007). Donat que la cohort de pacients estudiats en aquest article es troba tota en la fase crònica de la malaltia, això podria explicar la manca de diferències en els nivells plasmàtics d'HNP1-3. Per tant, si bé es

podria argumentar que el fet d'observar nivells més elevats de secreció d'HNP1-3 en les dendrítiques de pacients podria venir donat per un major nivell basal d'estímul degut a la presència d'una infecció crònica, aquest fet no explicaria les diferències entre els diferents grups de pacients. El fet que precisament els grups de pacients amb més control natural i millor pronòstic sobre la infecció siguin els que tenen dendrítiques que secreten més defensines, suggereix que les defensines podrien formar part d'un dels mecanismes que permet a aquests pacients el control de la infecció.

4.8 Paper de diferents nombre de còpies del gen DEFA1A3 en la protecció davant la infecció per VIH.

Per una banda s'ha observat una correlació entre una major secreció de defensines per part de les iDCs i una menor progressió de la infecció per VIH (veure apartat anterior). Per un altra banda s'ha descrit l'existència de nombres de còpies variables a la regió cromosòmica (8p23.1) codificant per a les HNP1-3 (Aldred et al., 2005; Linzmeier y Ganz, 2005; Nuytten et al., 2009), la qual cosa magnifica la variabilitat possible en l'herència i expressió final d'aquests pèptids. Tenint en compte aquest dos fets, en el treball titulat "*Higher DEFA1A3 Gene Copy Number and α -Defensins 1-3 Secretion are Associated with HIV Protection*" es va determinar la influència de nombres variables de còpies del gen DEFA1A3 (DEFA1A3 CNV), codificant per a les HNP1-3, en la possible resistència o control del VIH. Per a realitzar aquest treball es va estudiar una cohort de individus exposats no infectats pel VIH, EU. Aquests individus es mantenen sans tot i repetides exposicions a càrregues virals infectives, representant doncs, una oportunitat única per a estudiar possibles mecanismes que facilitin la immunitat davant la infecció per VIH. Per tal de comparar els resultats obtinguts en aquesta cohort, es va incloure a l'estudi una cohort de donants sans, així com una cohort de pacients infectats pel VIH. Es va determinar el DEFA1A3 CNV en les tres cohorts incloses en l'estudi.

D'acord al descrit anteriorment a la bibliografia per a cohorts caucàsiques, el nombre més freqüent de còpies en les nostres cohorts és de 6 (Aldred et al., 2005; Nuytten et al., 2009; Jespersgaard et al., 2011). Cal destacar que s'observaren clares

diferències, estadísticament significatives, en les distribucions de freqüències entre les cohorts d'EU i pacients infectats pel VIH. Així, la cohort EU es troba enriquida en individus amb un nombre de còpies alt (9 i 10) mentre que aquesta freqüència es troba reduïda en pacients VIH, on de 72 individus cap mostrava un CNV =10. Paral·lelament, les iDCs de la cohort EU mostren una major secreció d'HNP1-3 que els individus sans, suggerint que un major *DEFA1A3* CNV es podria traduir en nivells més elevats de producció d'HNP1-3. Tant per la seva localització tissular, sent de les primeres cèl·lules a entrar en contacte amb el VIH (Hladik y McElrath, 2008), com la seva funció presentadora i la capacitat de secretar HNP1-3, les iDCs tindrien un paper central en les respostes antivirals. El fet que dendrítiques mieloides i plasmacitoides humanes siguin capaces de produir grans quantitats d'HNP1-3 (Escribese et al., 2011) dona suport a l'anterior hipòtesi.

La correlació positiva entre la secreció d'HNP1-3 per les iDCs i un major *DEFA1A3* CNV en individus sans i en individus EU, suggereix que diferències genètiques en quan al nombre de còpies de *DEFA1A3* influeixen clarament en la producció cel·lular basal o constitutiva d'HNP1-3. Els àmpliament descrits efectes anti-VIH mitjançats per les defensines (Chang et al., 2005; Klotman y Chang, 2006; Seidel et al., 2010; Demirkhanyan et al., 2012) donarien molta rellevància a la diferent capacitat de cada individu per a produir HNP1-3. Aquesta diferent capacitat, en conjunció amb altres factors genètics, podrien contribuir a la variabilitat observada en les respostes anti-VIH i en les diferents progressions de la malaltia o, inclús, la resistència a aquesta. Tant és així, que en aquest treball també s'observa una correlació positiva entre la quantitat d'HNP1-3 produïda per les iDCs o el *DEFA1A3* CNV dels individus EU i la càrrega viral total a la que aquests individus s'exposen. Aquestes dues correlacions magnifiquen la importància de secretar uns nivells alts d'HNP1-3 per part de les iDCs, que vindrien determinats, en part i de forma causal, per el CNV del gen *DEFA1A3*. Estudis previs en altres cohorts d'EU, havien observat una correlació positiva entre els nivells d'HNP1-3 en secrecions cervovaginals i la càrrega viral a la que els individus d'aquestes cohorts s'exposaven (Trabattoni et al., 2004; Levinson et al., 2012). Aquestes dades, de forma conjunta destaquen la importància d'elevats nivells d'HNP1-

3 en les vies d'entrada del virus com a factors de protecció així com el origen genètic d'aquestes diferències determinat per les CNV del gen *DEFA1A3*.

En clar contrast amb les dades anteriors, en aquest treball no s'observa una correlació entre el *DEFA1A3* CNV i els nivells d'HNP1-3 en les iDCs de donants VIH positius. Aquest fet es podria deure a l'activació immunitària que s'observa de forma crònica en aquests individus, o bé, als efectes de la persistència d'antígens o partícules virals durant llargs períodes de temps. Per altra banda, els individus infectats mostren nivells molt més baixos d'HNP1-3 en sèrum que les cohorts EU o sana. La presència d'HNP1-3 en sèrum es creu que està molt més relacionada amb els neutròfils (Ganz, 1987), donat que són molt abundants i els més grans productors d'HNP1-3. Aquestes cèl·lules podrien veure accelerada la seva apoptosi o migració a teixits en cas d'infecció (Pitrak et al., 1996; Elbim et al., 2009), fet que podria explicar les diferències observades. Tal com s'ha comentat anteriorment, la producció d'HNP1-3 per les iDCs es més gran en aquells pacients VIH que millor controlen la malaltia (*controllers*). A més, aquests nivells es veien relacionats amb els nivells de CD4⁺ circulants, indicadors de bon estat immunològic. Aquests mecanismes podrien contribuir a preservar la funció immunològica d'aquests pacients, fet que podria resultar en majors respostes efectores innates primer, i adaptatives després. Aquestes potents respostes s'han evidenciat en cohorts d'individus EU (Ravet et al., 2007; Tomescu et al., 2010; Ghadially et al., 2012). Aquests mecanismes podrien contribuir a preservar una major secreció d'HNP1-3 per part de les dendrítiques.

Treballs previs del grup de recerca de la unitat de malalties infeccioses i SIDA varen demostrar la peculiar influència de diferents dosis d'HNP1-3 exògenes sobre els processos de maduració i secreció de citocines de la cèl·lula dendrítica (Rodríguez-García et al., 2009). Així, dosis baixes d'HNP1-3 ($\leq 1\mu\text{g/ml}$) eren capaces d'incrementar la secreció de IL-12p40, TNF- α , IL-1 β i IL-10 i l'expressió d'HLA-DR i CD86 en la cèl·lula dendrítica, fenotip compatible amb una major maduració d'aquestes. En canvi, dosis altes (20 $\mu\text{g/ml}$) produïen els efectes contraris en els marcadors descrits, fet que també s'havia observat en altres estudis, aquest cop en macròfags (Miles et al., 2009). En canvi, la secreció d'IL-8 s'incrementava d'acord amb dosis creixents d'HNP1-3. En aquest treball s'observen també aquests efectes duals sobre la secreció de varies

citocines, però aquest cop es relaciona amb el *DEFA1A3* CNV. Així, citocines com la IL-8 i la IL-6 mostren una major secreció d'acord amb un nombre major de còpies de *DEFA1A3*. La clara relació entre HNP1-3 i inducció d'IL-8 (Khine et al., 2006; Syeda et al., 2008), podria ser un indicador indirecte que confirma que aquests individus, efectivament, secreten més HNP1-3. En canvi, altres citocines, mostren una major secreció en aquells individus amb CNV mitjans (5-8), suggerint que un possible *feedback* regulador pugui començar a operar a nivells de còpies altes, fet que disminuiria la secreció d'aquestes citocines. Aquestes diferències en quant als nivells de citocines entre individus amb diferents CNV pot tenir unes fortes implicacions funcionals. L'increment general en la secreció de citocines observat entre els individus de CNV baix i de CNV alt, pot tenir un paper en la major expressió de CD80 i CD83 observat en aquest últim grup d'individus. Aquesta major expressió, indicativa d'un major estat basal de maduració pot influenciar en gran mesura la resposta d'aquestes cèl·lules a estímuls o antígens foranis. A més, els grans increments observats en el cas de la IL-8 podrien contribuir a reclutar i activar neutròfils als llocs d'inflamació, on aquests fagocitarien activament i alliberarien el material dels seus grànuls amb la finalitat de capturar i eliminar patògens o antígens estranys. Recentment, a més, s'ha descrit la capacitat d'aquests neutròfils de secretar DNA a l'espai extracel·lular, formant xarxes (*NETs*) que actuarien capturant patògens, tot impeding la seva disseminació (Brinkmann et al., 2004; Brinkmann y Zychlinsky, 2007). A més, donada la càrrega negativa del DNA, aquestes xarxes serien una forma excel·lent de concentrar pèptids antimicrobians com ara les HNP1-3, amb la funció de maximitzar la seva capacitat anti-microbiana. Aquesta funcionalitat resultaria efectiva davant el VIH (Saitoh et al., 2012). Els increments en citocines com la IL-6 contribuirien a incrementar els nivells d'inflamació i l'activació de més respostes efectores.

El VIH és un dels virus que mostra més capacitat per a evadir mecanismes immunitaris, i de fet els usa per a la seva replicació final. Les cèl·lules dendrítiques són un tipus cel·lular que resulta força refractari a la infecció productiva per aquest virus. Recentment s'han descrit certs enzims presents de forma especialment abundant en dendrítiques com ara SAMHD1, TREX, TRIM5 o APOBEC3A, que participarien en aquesta resistència a la infecció (Manel y Littman, 2011; Luban, 2012). Tot i això, les

dendrítiques poden ser usades pel VIH per a transmetre el virus a les cèl·lules T CD4⁺ en un procés anomenat *trans-infecció*. Per tant, el VIH pot haver evolucionat sota la pressió de no infectar les dendrítiques, com a forma de no ésser detectat per aquestes cèl·lules, i per tant, reduir les possibilitats de muntar una resposta antiviral, tot incrementant les possibilitats d'arribar en condicions infectives a les cèl·lules T CD4⁺ (Manel et al., 2010; Manel y Littman, 2011). En la secció de la Tesi aquí discutida, es proposa que la capacitat de les iDCs per secretar grans quantitat de HNP1-3, que vindria determinada pel *DEFA1A3* CNV, seria clau per inactivar els virions abans de que aquests puguin interactuar de forma deletèria amb les iDCs, i usar-les en el seu benefici. A més, l'estat més madur de les iDCs observat en aquells individus amb mitjanes o altes *DEFA1A3* CNV, indicaria que seria necessari un menor nivell d'activació de les iDCs d'aquests individus per a obtenir una resposta antiviral eficient amb majors nivells d'IFN- α , IL-12 o IL-15, com aquí s'ha observat.

Finalment, recentment s'ha descrit la capacitat de pèptids antimicrobians com la LL-37 o les HNP1-3 per a interactuar amb DNA genòmic, formant complexos insolubles, no degradables pels enzims abans esmentats (TREX). Aquests complexos resultarien claus per activar les pDCs via TLR9 (Lande et al., 2011), induint respostes antivirals amb altes secrecions d'IFN tipus I. Per tant elevats nivells d'HNP1-3 podrien ser claus per a facilitar aquest procés, i estimular respostes anti-VIH adequades, capaces de protegir a l'individu en cas d'exposició.

Recentment s'han observat associacions entre elevats *DEFA1A3* CNV o nivells plasmàtics elevats d'HNP1-3 amb certes patologies d'origen autoimmunitari com Crohn (Jespersgaard et al., 2011), lupus (Stoeger et al., 2009) o malaltia inflamatòria intestinal (Yamaguchi et al., 2009). Si bé aquestes associacions suggereixen que elevats nivells d'HNP1-3 podrien estar vinculats a un major risc de malalties autoimmunitàries, també es podrien relacionar amb la capacitat de muntar respostes immunitàries més potents davant l'encontre amb certs patògens, com ara el VIH.

4.9 L'ADA i les α -defensines 1-3 com a moduladors de la immunitat front al VIH. Visió de conjunt

El conjunt de resultats obtinguts en aquesta tesi, demostren que la presència d'ecto-ADA i d'elevades còpies del gen *DEFA1A3*, que es traduiria en una major secreció d'HNP1-3 per part de les iDCs, poden influir positivament en l'activació i l'efectivitat de respostes immunitàries davant el VIH. Els efectes anti-VIH de les HNP1-3 (Chang et al., 2005; Klotman y Chang, 2006; Seidel et al., 2010; Demirkhanyan et al., 2012) serien claus per a protegir de forma efectiva les iDCs davant contactes amb el VIH. Així, una efectiva inactivació viral evitaria els efectes nocius dels virions sobre la dendrítica i possibilitaria la correcta activació de respostes antivirals. A més, una elevada presència d'HNP1-3 atrauria més cèl·lules efectores (Grigat et al., 2007) al focus d'inflamació. Amb la funció de la cèl·lula dendrítica preservada, aquesta podria iniciar correctament el programa de maduració i la secreció de citocines pro-inflamatòries i de tipus Th-1. És probable que aquest inici d'activació també resulti amb una major presència d'ecto-ADA a la membrana plasmàtica, tal i com s'ha observat en altres models cel·lulars (Cordero et al., 2001; Mandapathil et al., 2012). Aquesta presència facilitaria el procés de maduració de la cèl·lula dendrítica, tot incrementant la secreció de citocines i quimiocines de perfil Th-1 i pro-inflamatori. La prèvia inactivació dels virions per les HNP1-3, evitaria doncs que l'envolta viral afectés les interaccions CD26/ADA (Valenzuela et al., 1997; Blanco et al., 2000), fet que possibilitaria l'efecte coestimulador de l'ADA ancorat a la membrana de les DCs, sobre el CD26 de les cèl·lules T. Aquesta senyal, conjuntament amb la presentació antigènica, una major presència de molècules co-estimuladores en la dendrítica degut a l'efecte de l'ADA i de les HNP1-3, una major secreció de citocines pro-inflamatòries i pro-Th1 incrementarien la magnitud de les respostes efectores. És possible que degut a l'activitat enzimàtica de l'ADA, tant les funcions de les cèl·lules efectores com de les dendrítiques siguin menys susceptibles als efectes immunosupressors de l'adenosina (Mandapathil et al., 2010), fet que permetria una senyal activadora més perllongada en el temps. Aquest fet, podria suposar una major generació de cèl·lules amb fenotip memòria, importants per a posteriors exposicions al VIH. En aquestes respostes secundàries o de memòria hi estaria especialment implicat el CD26, d'expressió incrementada en aquesta població de cèl·lules T (Dong y Morimoto, 1996; Krakauer et al., 2006) i que facilitaria en gran mesura la re-activació cel·lular, incloent-hi la funció citotòxica de cèl·lules CD8⁺, en particular el subtipus "effector memory" (CD8⁺

CD26^{H1}) i NK (Matteucci et al., 2011; Hatano et al., 2012; Madueño et al., 1993; Bühling et al., 1994). Aquestes respostes podrien ser particularment efectives per al control o resistència al VIH (Hansen et al., 2011). La implicació dels dos mecanismes estudiats en aquesta tesi, la secreció d'HNP1-3 i la interacció CD26/ADA en la possible protecció o control de la infecció per VIH es posen de manifest pel fet que tots dos es troben particularment incrementats en poblacions EU. Això s'ha observat a nivell genètic i funcional per a les HNP1-3 en aquesta Tesi, i en quant al CD26, ha estat observat a nivell d'expressió en una cohort d'EU (Songok et al., 2010) i a nivell funcional pel nostre grup de recerca, mostrant que l'efecte de l'ADA pot incrementar respostes immunitàries enfront el VIH (Climent et al., 2009). La conjunció dels dos mecanismes, per tant, pot influir decisivament en l'assoliment de potents respostes immunitàries enfront del VIH. El fet que l'ADA bovina ja es trobi en forma farmacològica, i s'hagi usat en nombrosos casos d'SCID (Booth y Gaspar, 2009) conjuntament amb la possibilitat de síntesi química de versions sintètiques de defensines (Doss et al., 2012), obren la possibilitat a que aquests elements puguin complementar (a mode de co-adjuvant) vacunes terapèutiques basades en cèl·lules dendrítiques carregades amb antígens VIH. Aquesta estratègia podria afavorir tant els processos de maduració de les dendrítiques com les posteriors respostes cel·lulars enfront del VIH.

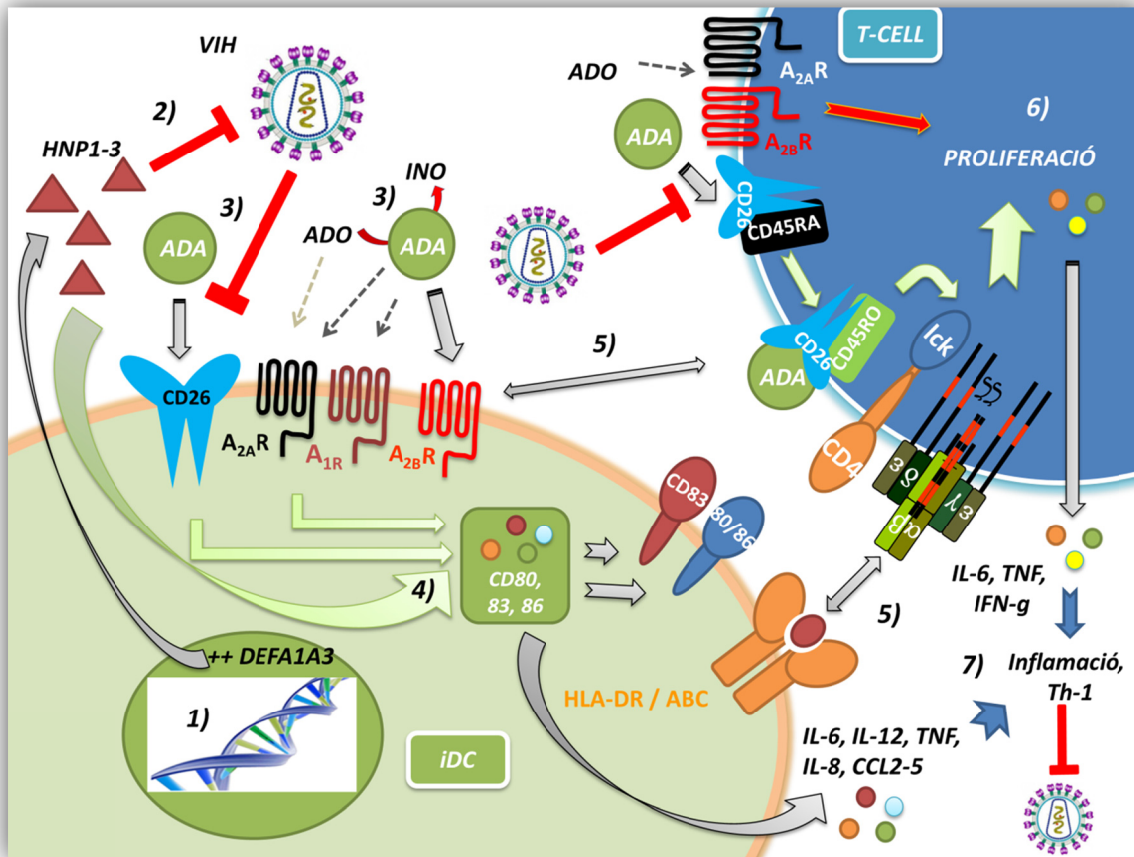


Figura 12. Model de l'acció de les HNP1-3 i l'ADA sobre les iDCs i les cèl·lules T.

En funció d'un nombre variable de còpies del gen *DEFA1A3* (1), les iDCs produiran més HNP1-3 en estat basal. 2) En cas d'exposició al VIH, altes dosis d'HNP1-3 poden inactivar el virus, facilitant la funció presentadora de la IdC. 4) La unió d'ADA als seus receptors a la iDC, preferiblement el CD26 i l'A₂B, conjuntament amb la degradació d'adenosina comportaria un increment de l'expressió de CD80, CD86 i CD83, concomitant a una major secreció de citocines i quimiocines pro-inflamatòries i de tipus Th-1. Quantitats elevades d'HNP1-3 també modularien la iDC en el mateix sentit. De forma conjunta, aquests events resultarien en un estat més madur de la cèl·lula dendrítica. Aquest estat afavoriria una major activació de les cèl·lules T en la immunosinapsi (5) fet que es veuria encara més accentuat per la interacció d'ADA amb el CD26 de la cèl·lula T, capaç de proveir senyals co-estimuladores mitjançant l'associació del CD26 amb CD45RO i la seva participació en la senyalització mitjançada pel TCR. Aquestes senyals resultarien en una major proliferació i secreció de citocines per part de la cèl·lula T (6). De forma conjunta amb les secretades per la iDC, aquestes citocines promourien processos inflamatoris, reclutant més cèl·lules del sistema immunitari i contribuint a una major activació de la resposta immunitària adaptativa, amb una clara polarització de tipus Th-1. Conjuntament amb la presència de les HNP1-3, aquest tipus de resposta immunitària seria la més adequada i eficient per combatre la infecció mitjançada pel VIH.

Conclusions

5. CONCLUSIONS

Conclusions que fan referència al Primer Objectiu General d'aquesta Tesi

(Analitzar el possible paper co-estimulador de l'ADA en la immunosinapsi produïda per interacció de cèl·lules T i cèl·lules dendrítiques de donants sans o pacients infectats pel VIH):

- L'ADA actua sobre les cèl·lules dendrítiques d'individus sans i de pacients infectats pel VIH, incrementant l'expressió de CD80, CD83, CD86, CD40 i CCR7, i l'alliberament de IL-12, IL-6, TNF- α , IL-8/CXCL8, MIP1- α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 i RANTES/CCL5, fet compatible amb una major maduració de la cèl·lula dendrítica.
- Tant l'activitat enzimàtica com la unió als seus receptors de membrana participen en els efectes mitjançats per l'ADA sobre la maduració de la cèl·lula dendrítica.
- L'ADA augmenta la capacitat de les cèl·lules dendrítiques d'activar limfòcits T al·logènics, fet que reflecteix una major immunogenicitat de les cèl·lules dendrítiques.
- En els co-cultius autòlegs de cèl·lules dendrítiques-limfòcits T, l'ADA potencia l'activació de cèl·lules T CD4⁺CD45RA⁺ naïve, incrementant la generació de cèl·lules CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ efectores, cèl·lules CD4⁺CD45RA⁻CD25⁻CD45RO⁺ memòria i cèl·lules CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺ reguladores. Aquests efectes s'observen tant en donants sans com en una cohort de pacients infectats pel VIH.
- La secreció d'IL-6, TNF- α i IFN- γ induïda per l'ADA contribueix de forma decisiva a la major generació de cèl·lules efectores i memòria observada en presència d'ADA.
- L'ADA potencia la generació de cèl·lules T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ reguladores per un mecanisme on hi influeix de forma important la seva activitat enzimàtica.

Globalment aquestes conclusions indiquen que l'ADA, interaccionant amb les cèl·lules dendrítiques i els limfòcits T, pot actuar com a molècula co-estimuladora en la

immunosinapsi, promovent la correcta polarització de les cèl·lules T inclús en individus amb un sistema immunitari compromès, com ara els pacients infectats per VIH.

--Conclusions que fan referència al Segon Objectiu General d'aquesta Tesi (*Estudiar la producció defensines per part de cèl·lules dendrítiques com a possible mecanisme innat de resistència a la infecció per VIH*):

- Les cèl·lules dendrítiques immadures de pacients capaços de controlar la infecció de forma natural (*controllers*) secreten nivells més elevats d' α -defensines 1-3 que les procedents de pacients que no mostren aquesta capacitat (*no controllers*) o que els individus sans.
- S'ha establert que alts nivells de secreció d' α -defensines 1-3 per cèl·lules dendrítiques immadures correlacionen amb l'expressió de marcadors clínics indicatius de menor progressió cap a SIDA.
- La cohort d'Individus exposats d'alt risc però no infectats mostra una major freqüència de còpies del gen *DEFA1A3* que la cohort d'individus sans o infectats pel VIH.
- Les cèl·lules dendrítiques immadures d'Individus exposats d'alt risc però no infectats (EU) mostren una major secreció d' α -defensines 1-3 que les d'individus infectats pel VIH o individus sans.
- La quantitat d' α -defensines 1-3 secretada per les iDCs dels individus exposats no infectats, així com el seu nombre de còpies del gen *DEFA1A3* correlacionen positivament amb la càrrega viral total a la qual aquests individus s'exposen. Aquest fet indicaria que elevades quantitats d' α -defensines 1-3 podrien estar implicades en la protecció davant elevades càrregues virals.
- Els individus amb un nombre de còpies elevat (≥ 9) del gen *DEFA1A3* mostren una major secreció de citocines pro-inflamatòries i expressió de marcadors de maduració de les cèl·lules dendrítiques fet que podria estar implicat en majors respostes immunitàries a antígens virals.

Globalment aquestes conclusions indiquen que les α -defensines 1-3 poden formar part dels mecanismes que confereixen resistència natural a la infecció per VIH.

Bibliografia

6. BIBLIOGRAFIA

Abbott, C.A., E. Baker, G.R. Sutherland, y G.W. McCaughan. 1994. Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. *Immunogenetics*. 40:331–338.

Abbott, C.A., G.W. McCaughan, y M.D. Gorrell. 1999. Two highly conserved glutamic acid residues in the predicted beta propeller domain of dipeptidyl peptidase IV are required for its enzyme activity. *FEBS Lett*. 458:278–284.

Abela, I.A., L. Berlinger, M. Schanz, L. Reynell, H.F. Günthard, P. Rusert, y A. Trkola. 2012. Cell-Cell Transmission Enables HIV-1 to Evade Inhibition by Potent CD4bs Directed Antibodies. *PLoS Pathog*. 8:e1002634.

Acosta-Rodriguez, E.V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, y F. Sallusto. 2007. 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*. 8:942–949.

Aertgeerts, K., S. Ye, M.G. Tennant, M.L. Kraus, J. Rogers, B.-C. Sang, R.J. Skene, D.R. Webb, y G.S. Prasad. 2004. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein Sci*. 13:412–421.

Agerberth, B., J. Charo, J. Werr, B. Olsson, F. Idali, L. Lindbom, R. Kiessling, H. Jörnvall, H. Wigzell, y G.H. Gudmundsson. 2000. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. 96:3086–3093.

Aldred, P.M.R., E.J. Hollox, y J.A.L. Armour. 2005. Copy number polymorphism and expression level variation of the human alpha-defensin genes DEFA1 and DEFA3. *Hum. Mol. Genet*. 14:2045–2052.

Aldrich, M.B., W. Chen, M.R. Blackburn, H. Martinez-Valdez, S.K. Datta, y R.E. Kellems. 2003. Impaired germinal center maturation in adenosine deaminase deficiency. *J. Immunol*. 171:5562–5570.

Allers, K., G. Hütter, J. Hofmann, C. Loddenkemper, K. Rieger, E. Thiel, y T. Schneider. 2011. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation. *Blood*. 117:2791–2799.

Apasov, S., J.F. Chen, P. Smith, y M. Sitkovsky. 2000. A(2A) receptor dependent and A(2A) receptor independent effects of extracellular adenosine on murine thymocytes in conditions of adenosine deaminase deficiency. *Blood*. 95:3859–3867.

Apasov, S.G., M.R. Blackburn, R.E. Kellems, P.T. Smith, y M.V. Sitkovsky. 2001. Adenosine deaminase deficiency increases thymic apoptosis and causes defective T cell receptor signaling. *J. Clin. Invest*. 108:131–141.

Aran, J.M., D. Colomer, E. Matutes, J.L. Vives-Corrons, y R. Franco. 1991. Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear blood cells: immunochemical localization using light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem*. 39:1001–1008.

Arnett, E., R.I. Lehrer, P. Pratikhya, W. Lu, y S. Seveau. 2011. Defensins enable macrophages to inhibit the intracellular proliferation of *Listeria monocytogenes*. *Cell. Microbiol*. 13:635–651.

Arnljots, K., O. Sørensen, K. Lollike, y N. Borregaard. 1998. Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia*. 12:1789–1795.

- Ayabe, T., D.P. Satchell, C.L. Wilson, W.C. Parks, M.E. Selsted, y A.J. Ouellette. 2000. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.* 1:113–118.
- Bailey, J.R., T.M. Williams, R.F. Siliciano, y J.N. Blankson. 2006. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J. Exp. Med.* 203:1357–1369.
- Ballana, E., J.R. González, N. Bosch, y X. Estivill. 2007. Inter-population variability of DEFA3 gene absence: correlation with haplotype structure and population variability. *BMC Genomics.* 8:14.
- Baroncelli, S., D.R.M. Negri, C. Rovetto, R. Belli, M. Ciccozzi, S. Catone, Z. Michelini, M. Borghi, P. Leone, Z. Fagrouch, J. Heeney, y A. Cara. 2007. Characterization of alpha-defensins plasma levels in *Macaca fascicularis* and correlations with virological parameters during SHIV89.6Pcy11 experimental infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 23:287–296.
- Barré-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, y L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 220:868–871.
- Basta, S., y A. Alatery. 2007. The cross-priming pathway: a portrait of an intricate immune system. *Scand. J. Immunol.* 65:311–319.
- Bauvois, B. 1988. A collagen-binding glycoprotein on the surface of mouse fibroblasts is identified as dipeptidyl peptidase IV. *Biochem. J.* 252:723–731.
- Bauvois, B., M. Djavaheri-Mergny, D. Rouillard, J. Dumont, y J. Wietzerbin. 2000. Regulation of CD26/DPPIV gene expression by interferons and retinoic acid in tumor B cells. *Oncogene.* 19:265–272.
- Befus, A.D., C. Mowat, M. Gilchrist, J. Hu, S. Solomon, y A. Bateman. 1999. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J. Immunol.* 163:947–953.
- Belz, G.T., y S.L. Nutt. 2012. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat. Rev. Immunol.* 12:101–113.
- Ben Addi, A., A. Lefort, X. Hua, F. Libert, D. Communi, C. Ledent, P. Macours, S.L. Tilley, J.-M. Boeynaems, y B. Robaye. 2008. Modulation of murine dendritic cell function by adenine nucleotides and adenosine: involvement of the A(2B) receptor. *Eur. J. Immunol.* 38:1610–1620.
- Bentley, R.W., J. Pearson, R.B. Gearry, M.L. Barclay, C. McKinney, T.R. Merriman, y R.L. Roberts. 2010. Association of higher DEFB4 genomic copy number with Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 105:354–359.
- Berger, E.A., P.M. Murphy, y J.M. Farber. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17:657–700.
- Berger, G., S. Durand, G. Fargier, X.-N. Nguyen, S. Cordeil, S. Bouaziz, D. Muriaux, J.-L. Darlix, y A. Cimarelli. 2011. APOBEC3A is a specific inhibitor of the early phases of HIV-1 infection in myeloid cells. *PLoS Pathog.* 7:e1002221.
- Betts, M.R., M.C. Nason, S.M. West, S.C. De Rosa, S.A. Migueles, J. Abraham, M.M. Lederman, J.M. Benito, P.A. Goepfert, M. Connors, M. Roederer, y R.A. Koup. 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood.* 107:4781–4789.

- Beyazit, Y., S. Koklu, A. Tas, T. Purnak, A. Sayilir, M. Kurt, T. Turhan, T. Celik, B. Suvak, S. Torun, y E. Akbal. 2012. Serum adenosine deaminase activity as a predictor of disease severity in ulcerative colitis. *J Crohns Colitis*. 6:102–107.
- Bianchi, M.E. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 81:1–5.
- Bielat, K., y G.L. Tritsch. 1989. Ecto-enzyme activity of human erythrocyte adenosine deaminase. *Mol. Cell. Biochem.* 86:135–142.
- Bilate, A.M., y J.J. Lafaille. 2012. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 30:733–758.
- Black, L.R., y C. Aiken. 2010. TRIM5alpha disrupts the structure of assembled HIV-1 capsid complexes in vitro. *J. Virol.* 84:6564–6569.
- Blackburn, M.R., S.K. Datta, M. Wakamiya, B.S. Vartabedian, y R.E. Kellems. 1996. Metabolic and immunologic consequences of limited adenosine deaminase expression in mice. *J. Biol. Chem.* 271:15203–15210.
- Blackburn, M.R., y R.E. Kellems. 2005. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Adv. Immunol.* 86:1–41.
- Blanco, J., A. Valenzuela, C. Herrera, C. Lluís, A.G. Hovanessian, y R. Franco. 2000. The HIV-1 gp120 inhibits the binding of adenosine deaminase to CD26 by a mechanism modulated by CD4 and CXCR4 expression. *FEBS Lett.* 477:123–128.
- Blazquez, M.V., J.A. Madueño, R. Gonzalez, R. Jurado, W.W. Bachovchin, J. Peña, y E. Muñoz. 1992. Selective decrease of CD26 expression in T cells from HIV-1-infected individuals. *J. Immunol.* 149:3073–3077.
- Bock, P.J., y D.M. Markovitz. 2001. Infection with HIV-2. *AIDS*. 15 Suppl 5:S35–45.
- Boesteanu, A.C., y P.D. Katsikis. 2009. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Semin. Immunol.* 21:69–77.
- Boonacker, E., y C.J.F. Van Noorden. 2003. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur. J. Cell Biol.* 82:53–73.
- Booth, C., y H.B. Gaspar. 2009. Pegademase bovine (PEG-ADA) for the treatment of infants and children with severe combined immunodeficiency (SCID). *Biologics*. 3:349–358.
- Borghesi, M.O., C. De Santis, W. Barcellini, L. Lopalco, C. Fain, A. Lazzarin, A.G. Siccardi, P.L. Meroni, C. Zanussi, y A. Beretta. 1993. Autoantibodies against beta 2-microglobulin-free HLA antigens in AIDS patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 6:1114–1119.
- Boulet, S., M. Kleyman, J.Y. Kim, P. Kanya, S. Sharafi, N. Simic, J. Bruneau, J.-P. Routy, C.M. Tsoukas, y N.F. Bernard. 2008. A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. *AIDS*. 22:1487–1491.
- Bours, M.J.L., E.L.R. Swennen, F. Di Virgilio, B.N. Cronstein, y P.C. Dagnelie. 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 112:358–404.

- Brezinschek, R.I., P.E. Lipsky, P. Galea, R. Vita, y N. Oppenheimer-Marks. 1995. Phenotypic characterization of CD4+ T cells that exhibit a transendothelial migratory capacity. *J. Immunol.* 154:3062–3077.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, y A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 303:1532–1535.
- Brinkmann, V., y A. Zychlinsky. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:577–582.
- Buckley, R.H., R.I. Schiff, S.E. Schiff, M.L. Markert, L.W. Williams, T.O. Harville, J.L. Roberts, y J.M. Puck. 1997. Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J. Pediatr.* 130:378–387.
- Buenestado, A., S. Grassin Delyle, I. Arnould, F. Besnard, E. Naline, S. Blouquit-Laye, A. Chapelier, J.F. Bellamy, y P. Devillier. 2010. The role of adenosine receptors in regulating production of tumour necrosis factor-alpha and chemokines by human lung macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 159:1304–1311.
- Bühling, F., U. Junker, D. Reinhold, K. Neubert, L. Jäger, y S. Ansorge. 1995. Functional role of CD26 on human B lymphocytes. *Immunol. Lett.* 45:47–51.
- Bühling, F., D. Kunz, D. Reinhold, A.J. Ulmer, M. Ernst, H.D. Flad, y S. Ansorge. 1994. Expression and functional role of dipeptidyl peptidase IV (CD26) on human natural killer cells. *Nat. Immun.* 13:270–279.
- Bunnik, E.M., Z. Euler, M.R.A. Welkers, B.D.M. Boeser-Nunnink, M.L. Grijzen, J.M. Prins, y H. Schuitemaker. 2010. Adaptation of HIV-1 envelope gp120 to humoral immunity at a population level. *Nat. Med.* 16:995–997.
- Buonaguro, L., M.L. Tornesello, R.C. Gallo, F.M. Marincola, G.K. Lewis, y F.M. Buonaguro. 2009. Th2 polarization in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects, as activated by HIV virus-like particles. *J. Virol.* 83:304–313.
- Burastero, S.E., D. Gaffi, L. Lopalco, G. Tambussi, B. Borgonovo, C. De Santis, C. Abecasis, P. Robbioni, A. Gasparri, A. Lazzarin, F. Celada, A.G. Siccardi, y A. Beretta. 1996. Autoantibodies to CD4 in HIV type 1-exposed seronegative individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 12:273–280.
- Buseyne, F., G. Janvier, J.P. Teglas, S. Ivanoff, M. Burgard, E. Bui, M.J. Mayaux, S. Blanche, C. Rouzioux, y Y. Rivière. 1998. Impact of heterozygosity for the chemokine receptor CCR5 32-bp-deleted allele on plasma virus load and CD4 T lymphocytes in perinatally human immunodeficiency virus-infected children at 8 years of age. *J. Infect. Dis.* 178:1019–1023.
- Butler, J.J., J.S. Mader, C.L. Watson, H. Zhang, J. Blay, y D.W. Hoskin. 2003. Adenosine inhibits activation-induced T cell expression of CD2 and CD28 co-stimulatory molecules: role of interleukin-2 and cyclic AMP signaling pathways. *J. Cell. Biochem.* 89:975–991.
- By, Y., J.-M. Durand-Gorde, J. Condo, P.-J. Lejeune, E. Fenouillet, R. Guieu, y J. Ruf. 2010. Monoclonal antibody-assisted stimulation of adenosine A2A receptors induces simultaneous downregulation of CXCR4 and CCR5 on CD4+ T-cells. *Human Immunology.* 71:1073–1076.
- Kakal, B., Y. Beyazit, S. Koklu, E. Akbal, I. Biyikoglu, y G. Yilmaz. 2010. Elevated adenosine deaminase levels in celiac disease. *J. Clin. Lab. Anal.* 24:323–326.
- Callahan, L.N., G. Roderiquez, M. Mallinson, y M.A. Norcross. 1992. Analysis of HIV-induced autoantibodies to cryptic epitopes on human CD4. *J. Immunol.* 149:2194–2202.

- Callebaut, C., B. Krust, E. Jacotot, y A.G. Hovanessian. 1993. T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4+ cells. *Science*. 262:2045–2050.
- Cameron, P.U., P.S. Freudenthal, J.M. Barker, S. Gezelter, K. Inaba, y R.M. Steinman. 1992. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science*. 257:383–387.
- Cao, W., D.B. Rosen, T. Ito, L. Bover, M. Bao, G. Watanabe, Z. Yao, L. Zhang, L.L. Lanier, y Y.-J. Liu. 2006. Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J. Exp. Med.* 203:1399–1405.
- Cao, Y., L. Qin, L. Zhang, J. Safrin, y D.D. Ho. 1995. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 332:201–208.
- Carter, C.C., A. Onafuwa-Nuga, L.A. McNamara, J. Riddell 4th, D. Bixby, M.R. Savona, y K.L. Collins. 2010. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat. Med.* 16:446–451.
- Carvalho, A. de O., y V.M. Gomes. 2011. Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. *Curr. Pharm. Des.* 17:4270–4293.
- Cassani, B., M. Mirolo, F. Cattaneo, U. Benninghoff, M. Hershfield, F. Carlucci, A. Tabucchi, C. Bordignon, M.G. Roncarolo, y A. Aiuti. 2008. Altered intracellular and extracellular signaling leads to impaired T-cell functions in ADA-SCID patients. *Blood*. 111:4209–4219.
- Chaly, Y.V., E.M. Paleolog, T.S. Kolesnikova, I.I. Tikhonov, E.V. Petratchenko, y N.N. Voitenok. 2000. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur. Cytokine Netw.* 11:257–266.
- Chang, T.L., J. Vargas Jr, A. DelPortillo, y M.E. Klotman. 2005. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *J. Clin. Invest.* 115:765–773.
- Chang, T.L.-Y., F. François, A. Mosoian, y M.E. Klotman. 2003. CAF-mediated human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transcriptional inhibition is distinct from alpha-defensin-1 HIV inhibition. *J. Virol.* 77:6777–6784.
- Charp, P.A., W.G. Rice, R.L. Raynor, E. Reimund, J.M. Kinkade Jr, T. Ganz, M.E. Selsted, R.I. Lehrer, y J.F. Kuo. 1988. Inhibition of protein kinase C by defensins, antibiotic peptides from human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 37:951–956.
- Chaudhry, A., S.R. Das, A. Hussain, S. Mayor, A. George, V. Bal, S. Jameel, y S. Rath. 2005. The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *J. Immunol.* 175:4566–4574.
- Chechik, B.E., W.P. Schrader, y J. Minowada. 1981. An immunomorphologic study of adenosine deaminase distribution in human thymus tissue, normal lymphocytes, and hematopoietic cell lines. *J. Immunol.* 126:1003–1007.
- Cheong, C., I. Matos, J.-H. Choi, D.B. Dandamudi, E. Shrestha, M.P. Longhi, K.L. Jeffrey, R.M. Anthony, C. Kluger, G. Nchinda, H. Koh, A. Rodriguez, J. Idoyaga, M. Pack, K. Velinzon, C.G. Park, y R.M. Steinman. 2010. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*. 143:416–429.

- Chertov, O., D.F. Michiel, L. Xu, J.M. Wang, K. Tani, W.J. Murphy, D.L. Longo, D.D. Taub, y J.J. Oppenheim. 1996. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 271:2935–2940.
- Chien, C.-H., L.-H. Huang, C.-Y. Chou, Y.-S. Chen, Y.-S. Han, G.-G. Chang, P.-H. Liang, y X. Chen. 2004. One site mutation disrupts dimer formation in human DPP-IV proteins. *J. Biol. Chem.* 279:52338–52345.
- Chittiprol, S., P. Satishchandra, R.S. Bhimasenarao, G.R. Rangaswamy, S.V. Sureshbabu, D.K. Subbakrishna, K.S. Satish, A. Desai, V. Ravi, y K.T. Shetty. 2007. Plasma adenosine deaminase activity among HIV1 Clade C seropositives: relation to CD4 T cell population and antiretroviral therapy. *Clin. Chim. Acta.* 377:133–137.
- Chiu, Y.-L., y W.C. Greene. 2008. The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu. Rev. Immunol.* 26:317–353.
- Chorro, L., y F. Geissmann. 2010. Development and homeostasis of «resident» myeloid cells: the case of the Langerhans cell. *Trends Immunol.* 31:438–445.
- Christopherson, K.W., 2nd, G. Hangoc, C.R. Mantel, y H.E. Broxmeyer. 2004. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science.* 305:1000–1003.
- Ciruela, F., C. Saura, E.I. Canela, J. Mallol, C. Lluís, y R. Franco. 1996. Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett.* 380:219–223.
- Climent, N., J.M. Martínez-Navio, C. Gil, F. García, C. Rovira, C. Hurtado, L. Miralles, J.M. Gatell, T. Gallart, J. Mallol, C. Lluís, y R. Franco. 2009. Adenosine deaminase enhances T-cell response elicited by dendritic cells loaded with inactivated HIV. *Immunol. Cell Biol.* 87:634–639.
- Cocchi, F., A.L. DeVico, A. Garzino-Demo, S.K. Arya, R.C. Gallo, y P. Lusso. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 270:1811–1815.
- Cohen, A., R. Hirschhorn, S.D. Horowitz, A. Rubinstein, S.H. Polmar, R. Hong, y D.W. Martin Jr. 1978. Deoxyadenosine triphosphate as a potentially toxic metabolite in adenosine deaminase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:472–476.
- Cohen, M.V., y J.M. Downey. 2008. Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Res. Cardiol.* 103:203–215.
- Colobran, R., E. Pedrosa, L. Carretero-Iglesia, y M. Juan. 2010. Copy number variation in chemokine superfamily: the complex scene of CCL3L-CCL4L genes in health and disease. *Clin. Exp. Immunol.* 162:41–52.
- Connor, R.I., K.E. Sheridan, D. Ceradini, S. Choe, y N.R. Landau. 1997. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J. Exp. Med.* 185:621–628.
- Cordero, O.J., F.J. Salgado, C.M. Fernández-Alonso, C. Herrera, C. Lluís, R. Franco, y M. Nogueira. 2001. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 70:920–930.
- Cordero, O.J., F.J. Salgado, y M. Nogueira. 2009. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 58:1723–1747.

- Cordero, O.J., F.J. Salgado, J.E. Viñuela, y M. Nogueira. 1997. Interleukin-12 enhances CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV function on human activated lymphocytes. *Immunobiology*. 197:522–533.
- Cowland, J.B., y N. Borregaard. 1999. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J. Leukoc. Biol.* 66:989–995.
- Craddock, N., M.E. Hurles, N. Cardin, R.D. Pearson, V. Plagnol, S. Robson, D. Vukcevic, C. Barnes, D.F. Conrad, E. Giannoulatou, C. Holmes, J.L. Marchini, K. Stirrups, M.D. Tobin, L.V. Wain, C. Yau, J. Aerts, T. Ahmad, T.D. Andrews, H. Arbury, A. Attwood, A. Auton, S.G. Ball, A.J. Balmforth, J.C. Barrett, I. Barroso, A. Barton, A.J. Bennett, S. Bhaskar, K. Blaszczak, J. Bowes, O.J. Brand, P.S. Braund, F. Bredin, G. Breen, M.J. Brown, I.N. Bruce, J. Bull, O.S. Burren, J. Burton, J. Byrnes, S. Caesar, C.M. Clee, A.J. Coffey, J.M.C. Connell, J.D. Cooper, A.F. Dominiczak, K. Downes, H.E. Drummond, D. Dudakia, A. Dunham, B. Ebbs, D. Eccles, S. Edkins, C. Edwards, A. Elliot, P. Emery, D.M. Evans, G. Evans, S. Eyre, A. Farmer, I.N. Ferrier, L. Feuk, T. Fitzgerald, E. Flynn, A. Forbes, L. Forty, J.A. Franklyn, R.M. Freathy, P. Gibbs, P. Gilbert, O. Gokumen, K. Gordon-Smith, E. Gray, E. Green, C.J. Groves, D. Grozeva, R. Gwilliam, A. Hall, N. Hammond, M. Hardy, P. Harrison, N. Hassanali, H. Hebaishi, S. Hines, A. Hinks, G.A. Hitman, L. Hocking, E. Howard, P. Howard, J.M.M. Howson, D. Hughes, S. Hunt, J.D. Isaacs, M. Jain, D.P. Jewell, T. Johnson, J.D. Jolley, I.R. Jones, et al. 2010. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 464:713–720.
- Cristalli, G., S. Costanzi, C. Lambertucci, G. Lupidi, S. Vittori, R. Volpini, y E. Camaioni. 2001. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev.* 21:105–128.
- Csóka, B., L. Himer, Z. Selmeczy, E.S. Vizi, P. Pacher, C. Ledent, E.A. Deitch, Z. Spolarics, Z.H. Németh, y G. Haskó. 2008. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J.* 22:3491–3499.
- D'Agostino, C., M. Lichtner, C.M. Mastroianni, G. Ceccarelli, M. Iannetta, S. Antonucci, V. Vullo, y A.P. Massetti. 2009. In vivo release of alpha-defensins in plasma, neutrophils and CD8 T-lymphocytes of patients with HIV infection. *Curr. HIV Res.* 7:650–655.
- Daher, K.A., M.E. Selsted, y R.I. Lehrer. 1986. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* 60:1068–1074.
- Dalglish, A.G., P.C. Beverley, P.R. Clapham, D.H. Crawford, M.F. Greaves, y R.A. Weiss. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 312:763–767.
- Dang, N.H., D.A. Hafler, S.F. Schlossman, y J.B. Breitmeyer. 1990. FcR-mediated crosslinking of Ta1 (CDw26) induces human T lymphocyte activation. *Cell. Immunol.* 125:42–57.
- David, F., A.M. Bernard, M. Pierres, y D. Marguet. 1993. Identification of serine 624, aspartic acid 702, and histidine 734 as the catalytic triad residues of mouse dipeptidyl-peptidase IV (CD26). A member of a novel family of nonclassical serine hydrolases. *J. Biol. Chem.* 268:17247–17252.
- Deacon, C.F., y J.J. Holst. 2006. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: a promising new therapeutic approach for the management of type 2 diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38:831–844.
- Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.-F. Chen, K. Enyooji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, y S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204:1257–1265.
- Deeks, S.G., y B.D. Walker. 2007. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. 27:406–416.

- Demirkhanyan, L.H., M. Marin, S. Padilla-Parra, C. Zhan, K. Miyauchi, M. Jean-Baptiste, G. Novitskiy, W. Lu, y G.B. Melikyan. 2012. Multifaceted mechanisms of HIV-1 entry inhibition by human α -defensin. *The Journal of biological chemistry*.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R.E. Sutton, C.M. Hill, C.B. Davis, S.C. Peiper, T.J. Schall, D.R. Littman, y N.R. Landau. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 381:661–666.
- Desrosiers, M.D., K.M. Cembrola, M.J. Fakir, L.A. Stephens, F.M. Jama, A. Shamel, W.Z. Mehal, P. Santamaria, y Y. Shi. 2007. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *J. Immunol*. 179:1884–1892.
- Ding, J., y T.L. Chang. 2012. TLR2 activation enhances HIV nuclear import and infection through T cell activation-independent and -dependent pathways. *J. Immunol*. 188:992–1001.
- Ding, J., A. Rapista, N. Teleshova, G. Mosoyan, G.A. Jarvis, M.E. Klotman, y T.L. Chang. 2010. Neisseria gonorrhoeae enhances HIV-1 infection of primary resting CD4+ T cells through TLR2 activation. *J. Immunol*. 184:2814–2824.
- Dinjens, W.N., J. ten Kate, E.P. van der Linden, J.T. Wijnen, P.M. Khan, y F.T. Bosman. 1989. Distribution of adenosine deaminase complexing protein (ADCP) in human tissues. *J. Histochem. Cytochem*. 37:1869–1875.
- Dolan, M.J., H. Kulkarni, J.F. Camargo, W. He, A. Smith, J.-M. Anaya, T. Miura, F.M. Hecht, M. Mamtani, F. Pereyra, V. Marconi, A. Mangano, L. Sen, R. Bologna, R.A. Clark, S.A. Anderson, J. Delmar, R.J. O’Connell, A. Lloyd, J. Martin, S.S. Ahuja, B.K. Agan, B.D. Walker, S.G. Deeks, y S.K. Ahuja. 2007. CCL3L1 and CCR5 influence cell-mediated immunity and affect HIV-AIDS pathogenesis via viral entry-independent mechanisms. *Nat. Immunol*. 8:1324–1336.
- Domingo, E., C. Escarmís, N. Sevilla, A. Moya, S.F. Elena, J. Quer, I.S. Novella, y J.J. Holland. 1996. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J*. 10:859–864.
- Dong, R.P., J. Kameoka, M. Hegen, T. Tanaka, Y. Xu, S.F. Schlossman, y C. Morimoto. 1996. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *J. Immunol*. 156:1349–1355.
- Dong, R.P., y C. Morimoto. 1996. Role of CD26 for CD4 memory T cell function and activation. *Hum. Cell*. 9:153–162.
- Dong, R.P., K. Tachibana, M. Hegen, Y. Munakata, D. Cho, S.F. Schlossman, y C. Morimoto. 1997. Determination of adenosine deaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation. *J. Immunol*. 159:6070–6076.
- Dong, R.P., K. Tachibana, M. Hegen, S. Scharpé, D. Cho, S.F. Schlossman, y C. Morimoto. 1998. Correlation of the epitopes defined by anti-CD26 mAbs and CD26 function. *Mol. Immunol*. 35:13–21.
- Doria-Rose, N.A., R.M. Klein, M.G. Daniels, S. O’Dell, M. Nason, A. Lapedes, T. Bhattacharya, S.A. Migueles, R.T. Wyatt, B.T. Korber, J.R. Mascola, y M. Connors. 2010. Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J. Virol*. 84:1631–1636.

- Doss, M., P. Ruchala, T. Tecle, D. Gantz, A. Verma, A. Hartshorn, E.C. Crouch, H. Luong, E.D. Micewicz, R.I. Lehrer, y K.L. Hartshorn. 2012. Hapivirins and diprovirins: novel θ -defensin analogs with potent activity against influenza A virus. *J. Immunol.* 188:2759–2768.
- Douek, D.C., J.M. Brenchley, M.R. Betts, D.R. Ambrozak, B.J. Hill, Y. Okamoto, J.P. Casazza, J. Kuruppu, K. Kunstman, S. Wolinsky, Z. Grossman, M. Dybul, A. Oxenius, D.A. Price, M. Connors, y R.A. Koup. 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature.* 417:95–98.
- Douek, D.C., L.J. Picker, y R.A. Koup. 2003. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* 21:265–304.
- Drucker, D.J. 2007. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 117:24–32.
- Drucker, D.J., y M.A. Nauck. 2006. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet.* 368:1696–1705.
- Duits, L.A., B. Ravensbergen, M. Rademaker, P.S. Hiemstra, y P.H. Nibbering. 2002. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology.* 106:517–525.
- Durinx, C., A.M. Lambeir, E. Bosmans, J.B. Falmagne, R. Berghmans, A. Haemers, S. Scharpé, y I. De Meester. 2000. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur. J. Biochem.* 267:5608–5613.
- Dzionic, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D.W. Buck, y J. Schmitz. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 165:6037–6046.
- Egerton, M., S.E. Koshlukova, M.W. Araujo, R.C. Patel, J. Dong, y J.A. Bruenn. 2000. Salivary histatin 5 and human neutrophil defensin 1 kill *Candida albicans* via shared pathways. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3310–3316.
- Eisenhauer, P.B., y R.I. Lehrer. 1992. Mouse neutrophils lack defensins. *Infect. Immun.* 60:3446–3447.
- Elbim, C., V. Monceaux, S. François, B. Hurtrel, M.-A. Gougerot-Pocidaló, y J. Estaquier. 2009. Increased neutrophil apoptosis in chronically SIV-infected macaques. *Retrovirology.* 6:29.
- Elgueta, R., M.J. Benson, V.C. de Vries, A. Wasiuk, Y. Guo, y R.J. Noelle. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* 229:152–172.
- Elliott, M.R., F.B. Chekeni, P.C. Trampont, E.R. Lazarowski, A. Kadl, S.F. Walk, D. Park, R.I. Woodson, M. Oostankovich, P. Sharma, J.J. Lysiak, T.K. Harden, N. Leitinger, y K.S. Ravichandran. 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* 461:282–286.
- Eltzschig, H.K., M. Faigle, S. Knapp, J. Karhausen, J. Ibla, P. Rosenberger, K.C. Odegard, P.C. Laussen, L.F. Thompson, y S.P. Colgan. 2006. Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood.* 108:1602–1610.
- Engel, M., T. Hoffmann, L. Wagner, M. Wermann, U. Heiser, R. Kiefersauer, R. Huber, W. Bode, H.-U. Demuth, y H. Brandstetter. 2003. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:5063–5068.

- Erdmann, A.A., Z.-G. Gao, U. Jung, J. Foley, T. Borenstein, K.A. Jacobson, y D.H. Fowler. 2005. Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion in vitro and IL-2-driven expansion in vivo. *Blood*. 105:4707–4714.
- Escribese, M.M., M. Rodríguez-García, R. Sperling, S.M. Engel, T. Gallart, y T.M. Moran. 2011. Alpha-defensins 1-3 release by dendritic cells is reduced by estrogen. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9:118.
- Fan, H., F.L. Tansi, W.A. Weihofen, C. Böttcher, J. Hu, J. Martinez, W. Saenger, y W. Reutter. 2012. Molecular mechanism and structural basis of interactions of dipeptidyl peptidase IV with adenosine deaminase and human immunodeficiency virus type-1 transcription transactivator. *Eur. J. Cell Biol.* 91:265–273.
- Fantuzzi, L., C. Purificato, K. Donato, F. Belardelli, y S. Gessani. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *J. Virol.* 78:9763–9772.
- Fauci, A.S. 2008. 25 years of HIV. *Nature*. 453:289–290.
- Ferre, S., F. Ciruela, J. Borycz, M. Solinas, D. Quarta, K. Antoniou, C. Quiroz, Z. Justinova, C. Lluís, R. Franco, y S.R. Goldberg. 2008. Adenosine A1-A2A receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. *Front. Biosci.* 13:2391–2399.
- Ferré, S., F. Ciruela, C. Quiroz, R. Luján, P. Popoli, R.A. Cunha, L.F. Agnati, K. Fuxe, A.S. Woods, C. Lluís, y R. Franco. 2007. Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. *ScientificWorldJournal*. 7:74–85.
- Fleischer, B. 1994. CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunol. Today*. 15:180–184.
- Floess, S., J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H.-D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, y J. Huehn. 2007. Epigenetic Control of the foxp3 Locus in Regulatory T Cells. *PLoS Biol.* 5:e38.
- Focosi, D., R.E. Kast, S. Galimberti, y M. Petrini. 2008. Conditioning response to granulocyte colony-stimulating factor via the dipeptidyl peptidase IV-adenosine deaminase complex. *J. Leukoc. Biol.* 84:331–337.
- Fonteneau, J.-F., M. Larsson, A.-S. Beignon, K. McKenna, I. Dasilva, A. Amara, Y.-J. Liu, J.D. Lifson, D.R. Littman, y N. Bhardwaj. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J. Virol.* 78:5223–5232.
- Fontenot, J.D., M.A. Gavin, y A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4:330–336.
- Förster, R., A.C. Davalos-Misilitz, y A. Rot. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 8:362–371.
- Förster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Müller, E. Wolf, y M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 99:23–33.
- Franco, R., J.M. Aran, D. Colomer, E. Matutes, y J.L. Vives-Corrons. 1990. Association of adenosine deaminase with erythrocyte and platelet plasma membrane: an immunological study using light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 38:653–658.

- Franco, R., E.I. Canela, y J. Bozal. 1986. Heterogeneous localization of some purine enzymes in subcellular fractions of rat brain and cerebellum. *Neurochem. Res.* 11:423–435.
- Franco, R., R. Pacheco, J.M. Gatell, T. Gallart, y C. Lluís. 2007. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Crit. Rev. Immunol.* 27:495–509.
- Frankel, A.D., y J.A. Young. 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67:1–25.
- Frerker, N., L. Wagner, R. Wolf, U. Heiser, T. Hoffmann, J.-U. Rahfeld, J. Schade, T. Karl, H.Y. Naim, M. Alfalah, H.-U. Demuth, y S. von Hörsten. 2007. Neuropeptide Y (NPY) cleaving enzymes: structural and functional homologues of dipeptidyl peptidase 4. *Peptides.* 28:257–268.
- Frost, S.D.W., T. Wrin, D.M. Smith, S.L. Kosakovsky Pond, Y. Liu, E. Paxinos, C. Chappey, J. Galovich, J. Beauchaine, C.J. Petropoulos, S.J. Little, y D.D. Richman. 2005. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:18514–18519.
- Fujii, S.-I., K. Liu, C. Smith, A.J. Bonito, y R.M. Steinman. 2004. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J. Exp. Med.* 199:1607–1618.
- Fülöp, V., Z. Böcskei, y L. Polgár. 1998. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell.* 94:161–170.
- Funderburg, N., M.M. Lederman, Z. Feng, M.G. Drage, J. Jadowsky, C.V. Harding, A. Weinberg, y S.F. Sieg. 2007. Human α -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:18631–18635.
- Furci, L., F. Sironi, M. Tolazzi, L. Vassena, y P. Lusso. 2007. Alpha-defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4. *Blood.* 109:2928–2935.
- Gakis, C. 1996. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur. Respir. J.* 9:632–633.
- Gallo, R.C., y L. Montagnier. 2003. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N. Engl. J. Med.* 349:2283–2285.
- Ganz, T. 1987. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 55:568–571.
- Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3:710–720.
- Ganz, T., M.E. Selsted, y R.I. Lehrer. 1986. Antimicrobial activity of phagocyte granule proteins. *Semin Respir Infect.* 1:107–117.
- Gao, X., T.R. O'Brien, T.M. Welzel, D. Marti, Y. Qi, J.J. Goedert, J. Phair, R. Pfeiffer, y M. Carrington. 2010. HLA-B alleles associate consistently with HIV heterosexual transmission, viral load, and progression to AIDS, but not susceptibility to infection. *AIDS.* 24:1835–1840.
- García, F., N. Climent, L. Assoumou, C. Gil, N. González, J. Alcamí, A. León, J. Romeu, J. Dalmau, J. Martínez-Picado, J. Lifson, B. Autran, D. Costagliola, B. Clotet, J.M. Gatell, M. Plana, y T. Gallart. 2011. A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 203:473–478.

- García, J.R., F. Jaumann, S. Schulz, A. Krause, J. Rodríguez-Jiménez, U. Forssmann, K. Adermann, E. Klüver, C. Vogelmeier, D. Becker, R. Hedrich, W.G. Forssmann, y R. Bals. 2001. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 306:257–264.
- García-Zamalloa, A., y J. Taboada-Gomez. 2012. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase and lymphocyte proportion in pleural fluid for tuberculous pleurisy in different prevalence scenarios. *PLoS ONE.* 7:e38729.
- Ghadially, H., Y. Keynan, J. Kimani, M. Kimani, T.B. Ball, F.A. Plummer, O. Mandelboim, y A.F.A. Meyers. 2012. Altered dendritic cell-natural killer interaction in Kenyan sex workers resistant to HIV-1 infection. *AIDS.* 26:429–436.
- Ghosh, D., E. Porter, B. Shen, S.K. Lee, D. Wilk, J. Drazba, S.P. Yadav, J.W. Crabb, T. Ganz, y C.L. Bevins. 2002. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat. Immunol.* 3:583–590.
- Ginhoux, F., F. Tacke, V. Angeli, M. Bogunovic, M. Loubeau, X.-M. Dai, E.R. Stanley, G.J. Randolph, y M. Merad. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol.* 7:265–273.
- Gliddon, D.R., y C.J. Howard. 2002. CD26 is expressed on a restricted subpopulation of dendritic cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* 32:1472–1481.
- Goldstone, D.C., V. Ennis-Adeniran, J.J. Hedden, H.C.T. Groom, G.I. Rice, E. Christodoulou, P.A. Walker, G. Kelly, L.F. Haire, M.W. Yap, L.P.S. de Carvalho, J.P. Stoye, Y.J. Crow, I.A. Taylor, y M. Webb. 2011. HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature.* 480:379–382.
- Gonzalez, E., H. Kulkarni, H. Bolivar, A. Mangano, R. Sanchez, G. Catano, R.J. Nibbs, B.I. Freedman, M.P. Quinones, M.J. Bamshad, K.K. Murthy, B.H. Rovin, W. Bradley, R.A. Clark, S.A. Anderson, R.J. O'connell, B.K. Agan, S.S. Ahuja, R. Bologna, L. Sen, M.J. Dolan, y S.K. Ahuja. 2005. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science.* 307:1434–1440.
- Gonzalez-Gronow, M., H.E. Grenett, M.R. Weber, G. Gawdi, y S.V. Pizzo. 2001. Interaction of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV initiates a signal transduction mechanism which regulates expression of matrix metalloproteinase-9 by prostate cancer cells. *Biochem. J.* 355:397–407.
- Gonzalez-Gronow, M., M.S. Hershfield, F.X. Arredondo-Vega, y S.V. Pizzo. 2004. Cell surface adenosine deaminase binds and stimulates plasminogen activation on 1-LN human prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 279:20993–20998.
- Gonzalez-Gronow, M., U.K. Misra, G. Gawdi, y S.V. Pizzo. 2005. Association of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV and Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 regulates invasion of human 1-LN prostate tumor cells. *J. Biol. Chem.* 280:27173–27178.
- Gorrell, M.D., V. Gysbers, y G.W. McCaughan. 2001. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 54:249–264.
- Gracia, E., A. Cortés, J.J. Meana, J. García-Sevilla, M.S. Hershfield, E.I. Canela, J. Mallol, C. Lluís, R. Franco, y V. Casadó. 2008. Human adenosine deaminase as an allosteric modulator of human A(1) adenosine receptor: abolishment of negative cooperativity for [H](R)-pia binding to the caudate nucleus. *J. Neurochem.* 107:161–170.

- Gracia, E., K. Pérez-Capote, E. Moreno, J. Barkešová, J. Mallol, C. Lluís, R. Franco, A. Cortés, V. Casadó, y E.I. Canela. 2011. A2A adenosine receptor ligand binding and signalling is allosterically modulated by adenosine deaminase. *Biochem. J.* 435:701–709.
- Grakoui, A., N.H. Shoukry, D.J. Woollard, J.-H. Han, H.L. Hanson, J. Ghayeb, K.K. Murthy, C.M. Rice, y C.M. Walker. 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science.* 302:659–662.
- Graneli-Piperno, A., V. Finkel, E. Delgado, y R.M. Steinman. 1999. Virus replication begins in dendritic cells during the transmission of HIV-1 from mature dendritic cells to T cells. *Curr. Biol.* 9:21–29.
- Greenwald, R.J., G.J. Freeman, y A.H. Sharpe. 2005. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 23:515–548.
- Grever, M.R. 2011. Hairy cell leukemia: a successful model for experimental therapeutics--pentostatin and new ideas. *Leuk. Lymphoma.* 52 Suppl 2:25–28.
- Grigat, J., A. Soruri, U. Forssmann, J. Riggert, y J. Zwirner. 2007. Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. *J. Immunol.* 179:3958–3965.
- Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, A.E. Sousa, R.M.M. Victorino, y W.E. Paul. 2002. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat. Med.* 8:319–323.
- Gruber, M., W. Scholz, y H.D. Flad. 1988. Influence of human T lymphocytes identified by antibodies to dipeptidyl peptidase IV on differentiation of human B lymphocytes stimulated with *Staphylococcus aureus* Cowan I and pokeweed mitogen. *Cell. Immunol.* 113:423–434.
- Guadalupe, M., E. Reay, S. Sankaran, T. Prindiville, J. Flamm, A. McNeil, y S. Dandekar. 2003. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 77:11708–11717.
- Guan, E., J. Wang, y M.A. Norcross. 2004. Amino-terminal processing of MIP-1beta/CCL4 by CD26/dipeptidyl-peptidase IV. *J. Cell. Biochem.* 92:53–64.
- Guermónprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Théry, y S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20:621–667.
- Guo, C.-J., N. Tan, L. Song, S.D. Douglas, y W.-Z. Ho. 2004. Alpha-defensins inhibit HIV infection of macrophages through upregulation of CC-chemokines. *AIDS.* 18:1217–1218.
- Gutheil, W.G., M. Subramanyam, G.R. Flentke, D.G. Sanford, E. Munoz, B.T. Huber, y W.W. Bachovchin. 1994. Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:6594–6598.
- Haase, A.T. 2005. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat. Rev. Immunol.* 5:783–792.
- Hainaut, M., V. Verscheure, M. Ducarme, L. Schandené, J. Levy, y F. Mascarit. 2011. Cellular immune responses in human immunodeficiency virus (HIV)-1-infected children: is immune restoration by highly active anti-retroviral therapy comparable to non-progression? *Clin. Exp. Immunol.* 165:77–84.

- Hansen, S.G., J.C. Ford, M.S. Lewis, A.B. Ventura, C.M. Hughes, L. Coyne-Johnson, N. Whizin, K. Oswald, R. Shoemaker, T. Swanson, A.W. Legasse, M.J. Chiuchiolo, C.L. Parks, M.K. Axthelm, J.A. Nelson, M.A. Jarvis, M. Piatak Jr, J.D. Lifson, y L.J. Picker. 2011. Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature*. 473:523–527.
- Harder, J., U. Meyer-Hoffert, K. Wehkamp, L. Schwichtenberg, y J.-M. Schröder. 2004. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J. Invest. Dermatol.* 123:522–529.
- Harris, R.S., K.N. Bishop, A.M. Sheehy, H.M. Craig, S.K. Petersen-Mahrt, I.N. Watt, M.S. Neuberger, y M.H. Malim. 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*. 113:803–809.
- Harris, R.S., y M.T. Liddament. 2004. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 4:868–877.
- Harwig, S.S., A.S. Park, y R.I. Lehrer. 1992. Characterization of defensin precursors in mature human neutrophils. *Blood*. 79:1532–1537.
- Hashikawa, T., S.W. Hooker, J.G. Maj, C.J. Knott-Craig, M. Takedachi, S. Murakami, y L.F. Thompson. 2004. Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. *FASEB J.* 18:131–133.
- Haskó, G., y B.N. Cronstein. 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 25:33–39.
- Haskó, G., D.G. Kuhel, J.F. Chen, M.A. Schwarzschild, E.A. Deitch, J.G. Mabley, A. Marton, y C. Szabó. 2000. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A_{2a} receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 14:2065–2074.
- Haskó, G., J. Linden, B. Cronstein, y P. Pacher. 2008. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 7:759–770.
- Haskó, G., C. Szabó, Z.H. Németh, V. Kvetan, S.M. Pastores, y E.S. Vizi. 1996. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J. Immunol.* 157:4634–4640.
- Hatano, R., K. Ohnuma, J. Yamamoto, N.H. Dang, y C. Morimoto. 2012. CD26-mediated costimulation in human CD8(+) T cells provokes effector function via proinflammatory cytokine production. *Immunology*.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman, y M.C. Nussenzweig. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 194:769–779.
- Haynes, B.F., J. Fleming, E.W. St Clair, H. Katinger, G. Stiegler, R. Kunert, J. Robinson, R.M. Searce, K. Plonk, H.F. Staats, T.L. Ortel, H.-X. Liao, y S.M. Alam. 2005. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science*. 308:1906–1908.
- Haynes, B.F., N.I. Nicely, y S.M. Alam. 2010. HIV-1 autoreactive antibodies: are they good or bad for HIV-1 prevention? *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17:543–545.
- Hegen, M., J. Kameoka, R.P. Dong, S.F. Schlossman, y C. Morimoto. 1997. Cross-linking of CD26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase. *Immunology*. 90:257–264.

- Hellmann, I., S.-Y. Lim, R.S. Gelman, y N.L. Letvin. 2011. Association of Activating KIR Copy Number Variation of NK Cells with Containment of SIV Replication in Rhesus Monkeys. *PLoS Pathog.* 7:e1002436.
- Herman, B.D., R.F. Schinazi, H. Zhang, J.H. Nettles, R. Stanton, M. Detorio, A. Obikhod, U. Pradère, S.J. Coats, J.W. Mellors, y N. Sluis-Cremer. 2012. Substrate mimicry: HIV-1 reverse transcriptase recognizes 6-modified-3'-azido-2',3'-dideoxyguanosine-5'-triphosphates as adenosine analogs. *Nucleic Acids Res.* 40:381–390.
- Herrera, C., V. Casadó, F. Ciruela, P. Schofield, J. Mallol, C. Lluís, y R. Franco. 2001a. Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol. Pharmacol.* 59:127–134.
- Herrera, C., C. Morimoto, J. Blanco, J. Mallol, F. Arenzana, C. Lluís, y R. Franco. 2001b. Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 276:19532–19539.
- Hershfield, M.S. 2003. Genotype is an important determinant of phenotype in adenosine deaminase deficiency. *Curr. Opin. Immunol.* 15:571–577.
- Hershfield, M.S., N.M. Kredich, D.R. Ownby, H. Ownby, y R. Buckley. 1979. In vivo inactivation of erythrocyte S-adenosylhomocysteine hydrolase by 2'-deoxyadenosine in adenosine deaminase-deficient patients. *J. Clin. Invest.* 63:807–811.
- Hersperger, A.R., F. Pereyra, M. Nason, K. Demers, P. Sheth, L.Y. Shin, C.M. Kovacs, B. Rodriguez, S.F. Sieg, L. Teixeira-Johnson, D. Gudonis, P.A. Goepfert, M.M. Lederman, I. Frank, G. Makedonas, R. Kaul, B.D. Walker, y M.R. Betts. 2010. Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathog.* 6:e1000917.
- Hill, C.P., J. Yee, M.E. Selsted, y D. Eisenberg. 1991. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science.* 251:1481–1485.
- Hinterberger, M., G. Wirnsberger, y L. Klein. 2011. B7/CD28 in central tolerance: costimulation promotes maturation of regulatory T cell precursors and prevents their clonal deletion. *Front Immunol.* 2:30.
- Hirschhorn, R. 1995. Adenosine deaminase deficiency: molecular basis and recent developments. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 76:S219–227.
- Hladik, F., y M.J. McElrath. 2008. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat. Rev. Immunol.* 8:447–457.
- Hoeffel, G., Y. Wang, M. Greter, P. See, P. Teo, B. Malleret, M. Leboeuf, D. Low, G. Oller, F. Almeida, S.H.Y. Choy, M. Grisotto, L. Renia, S.J. Conway, E.R. Stanley, J.K.Y. Chan, L.G. Ng, I.M. Samokhvalov, M. Merad, y F. Ginhoux. 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *The Journal of Experimental Medicine.*
- Hofer, S., L. Ivarsson, P. Stoitzner, M. Auffinger, C. Rainer, N. Romani, y C. Heufler. 2003. Adenosine slows migration of dendritic cells but does not affect other aspects of dendritic cell maturation. *J. Invest. Dermatol.* 121:300–307.
- Hollox, E.J., J.A.L. Armour, y J.C.K. Barber. 2003. Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am. J. Hum. Genet.* 73:591–600.
- Hollox, E.J., U. Huffmeier, P.L.J.M. Zeeuwen, R. Palla, J. Lascorz, D. Rodijk-Olthuis, P.C.M. van de Kerkhof, H. Traupe, G. de Jongh, M. den Heijer, A. Reis, J.A.L. Armour, y J. Schalkwijk. 2008. Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat. Genet.* 40:23–25.

- Hoover, D.M., K.R. Rajashankar, R. Blumenthal, A. Puri, J.J. Oppenheim, O. Chertov, y J. Lubkowski. 2000. The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J. Biol. Chem.* 275:32911–32918.
- Hopsu-Havu, V.K., y G.G. Glenner. 1966. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie.* 7:197–201.
- Hori, S., T. Nomura, y S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 299:1057–1061.
- Horwitz, D.A., S.G. Zheng, y J.D. Gray. 2008. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol.* 29:429–435.
- Hrecka, K., C. Hao, M. Gierszewska, S.K. Swanson, M. Kesik-Brodacka, S. Srivastava, L. Florens, M.P. Washburn, y J. Skowronski. 2011. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature.* 474:658–661.
- Hsieh, C.-S., H.-M. Lee, y C.-W.J. Lio. 2012. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 12:157–167.
- Hu, L., W. Song, I. Brill, J. Mulenga, S. Allen, E. Hunter, S. Shrestha, J. Tang, y R.A. Kaslow. 2012. Genetic variations and heterosexual HIV-1 infection: analysis of clustered genes encoding CC-motif chemokine ligands. *Genes Immun.* 13:202–205.
- Hubert, J.B., M. Burgard, E. Dussaix, C. Tamalet, C. Deveau, J. Le Chenadec, M.L. Chaix, E. Marchadier, J.L. Vildé, J.F. Delfraissy, L. Meyer, y Rouzioux. 2000. Natural history of serum HIV-1 RNA levels in 330 patients with a known date of infection. The SEROCO Study Group. *AIDS.* 14:123–131.
- Hühn, J., S. Ehrlich, B. Fleischer, y A. von Bonin. 2000. Molecular analysis of CD26-mediated signal transduction in T cells. *Immunol. Lett.* 72:127–132.
- Hunt, P.W. 2007. Role of immune activation in HIV pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep.* 4:42–47.
- Hunt, P.W., J. Brenchley, E. Sinclair, J.M. McCune, M. Roland, K. Page-Shafer, P. Hsue, B. Emu, M. Krone, H. Lampiris, D. Douek, J.N. Martin, y S.G. Deeks. 2008. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 197:126–133.
- Hütter, G., D. Nowak, M. Mossner, S. Ganepola, A. Müssig, K. Allers, T. Schneider, J. Hofmann, C. Kücherer, O. Blau, I.W. Blau, W.K. Hofmann, y E. Thiel. 2009. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 360:692–698.
- Ibegbu, C.C., Y.-X. Xu, D. Fillos, H. Radziewicz, A. Grakoui, y A.P. Kourtis. 2009. Differential expression of CD26 on virus-specific CD8(+) T cells during active, latent and resolved infection. *Immunology.* 126:346–353.
- Inaba, K., G. Schuler, M.D. Witmer, J. Valinsky, B. Atassi, y R.M. Steinman. 1986. Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. Distinct requirements for stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 164:605–613.
- Inaba, K., R.M. Steinman, W.C. Van Voorhis, y S. Muramatsu. 1983. Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:6041–6045.

- Ishii, T., K. Ohnuma, A. Murakami, N. Takasawa, S. Kobayashi, N.H. Dang, S.F. Schlossman, y C. Morimoto. 2001. CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:12138–12143.
- Isogai, E., H. Isogai, K. Okumura, H. Hori, H. Tsuruta, y Y. Kurebayashi. 2011. Tertiary structure-related activity of tick defensin (persulcatusin) in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. *Exp. Appl. Acarol.* 53:71–77.
- Ivanov, I.I., B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, y D.R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 126:1121–1133.
- Jacobson, K.A., y Z.-G. Gao. 2006. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 5:247–264.
- Jaffar, Z., M.E. Ferrini, L.A. Herritt, y K. Roberts. 2009. Cutting edge: lung mucosal Th17-mediated responses induce polymeric Ig receptor expression by the airway epithelium and elevate secretory IgA levels. *J. Immunol.* 182:4507–4511.
- Jäger, S., D.Y. Kim, J.F. Hultquist, K. Shindo, R.S. LaRue, E. Kwon, M. Li, B.D. Anderson, L. Yen, D. Stanley, C. Mahon, J. Kane, K. Franks-Skiba, P. Cimermancic, A. Burlingame, A. Sali, C.S. Craik, R.S. Harris, J.D. Gross, y N.J. Krogan. 2012. Vif hijacks CBF- β to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature.* 481:371–375.
- Jego, G., A.K. Palucka, J.-P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual, y J. Banchereau. 2003. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 19:225–234.
- Jespersgaard, C., P. Fode, M. Dybdahl, I. Vind, O.H. Nielsen, C. Csillag, P. Munkholm, B. Vainer, L. Riis, M. Elkjaer, N. Pedersen, E. Knudsen, y P.S. Andersen. 2011. Alpha-defensin DEFA1A3 gene copy number elevation in Danish Crohn's disease patients. *Dig. Dis. Sci.* 56:3517–3524.
- Jin, G., H.I. Kawsar, S.A. Hirsch, C. Zeng, X. Jia, Z. Feng, S.K. Ghosh, Q.Y. Zheng, A. Zhou, T.M. McIntyre, y A. Weinberg. 2010. An Antimicrobial Peptide Regulates Tumor-Associated Macrophage Trafficking via the Chemokine Receptor CCR2, a Model for Tumorigenesis. *PLoS ONE.* 5:e10993.
- Junger, W.G. 2011. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 11:201–212.
- Kagan, B.L., M.E. Selsted, T. Ganz, y R.I. Lehrer. 1990. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:210–214.
- Kameoka, J., T. Tanaka, Y. Nojima, S.F. Schlossman, y C. Morimoto. 1993. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science.* 261:466–469.
- Kanda, N., M. Kamata, Y. Tada, T. Ishikawa, S. Sato, y S. Watanabe. 2011. Human β -defensin-2 enhances IFN- γ and IL-10 production and suppresses IL-17 production in T cells. *J. Leukoc. Biol.* 89:935–944.
- Kaya, S., E.S. Cetin, B.C. Aridogan, S. Arikan, y M. Demirci. 2007. Adenosine deaminase activity in serum of patients with hepatitis -- a useful tool in monitoring clinical status. *J Microbiol Immunol Infect.* 40:288–292.
- Keir, M.E., M.J. Butte, G.J. Freeman, y A.H. Sharpe. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26:677–704.

Kelly, M.A., M.M. Vestling, C.M. Murphy, S. Hua, T. Sumpter, y C. Fenselau. 1996. Primary structure of bovine adenosine deaminase. *J Pharm Biomed Anal.* 14:1513–1519.

Khare, S.D., Y. Kipnis, P. Greisen Jr, R. Takeuchi, Y. Ashani, M. Goldsmith, Y. Song, J.L. Gallaher, I. Silman, H. Leader, J.L. Sussman, B.L. Stoddard, D.S. Tawfik, y D. Baker. 2012. Computational redesign of a mononuclear zinc metalloenzyme for organophosphate hydrolysis. *Nat. Chem. Biol.* 8:294–300.

Khine, A.A., L. Del Sorbo, R. Vaschetto, S. Voglis, E. Tullis, A.S. Slutsky, G.P. Downey, y H. Zhang. 2006. Human neutrophil peptides induce interleukin-8 production through the P2Y6 signaling pathway. *Blood.* 107:2936–2942.

Khodadadi, I., M. Abdi, A. Ahmadi, M.S. Wahedi, S. Menbari, F. Lahoorpour, y R. Rahbari. 2011. Analysis of serum adenosine deaminase (ADA) and ADA1 and ADA2 isoenzyme activities in HIV positive and HIV-HBV co-infected patients. *Clin. Biochem.* 44:980–983.

Kiepiela, P., A.J. Leslie, I. Honeyborne, D. Ramduth, C. Thobakgale, S. Chetty, P. Rathnavalu, C. Moore, K.J. Pfafferott, L. Hilton, P. Zimbwa, S. Moore, T. Allen, C. Brander, M.M. Addo, M. Altfeld, I. James, S. Mallal, M. Bunce, L.D. Barber, J. Szinger, C. Day, P. Klenerman, J. Mullins, B. Korber, H.M. Coovadia, B.D. Walker, y P.J.R. Goulder. 2004. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature.* 432:769–775.

Kinoshita, T., T. Tada, y I. Nakanishi. 2008. Conformational change of adenosine deaminase during ligand-exchange in a crystal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373:53–57.

Klein, S.A., J.M. Dobbmeyer, T.S. Dobbmeyer, M. Pape, O.G. Ottmann, E.B. Helm, D. Hoelzer, y R. Rossol. 1997. Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *AIDS.* 11:1111–1118.

Klotman, M.E., y T.L. Chang. 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6:447–456.

Klotman, M.E., A. Rapista, N. Teleshova, A. Micsenyi, G.A. Jarvis, W. Lu, E. Porter, y T.L. Chang. 2008. Neisseria gonorrhoeae-induced human defensins 5 and 6 increase HIV infectivity: role in enhanced transmission. *J. Immunol.* 180:6176–6185.

Kobayashi, S., K. Ohnuma, M. Uchiyama, K. Iino, S. Iwata, N.H. Dang, y C. Morimoto. 2004. Association of CD26 with CD45RA outside lipid rafts attenuates cord blood T-cell activation. *Blood.* 103:1002–1010.

Kobie, J.J., P.R. Shah, L. Yang, J.A. Rebhahn, D.J. Fowell, y T.R. Mosmann. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J. Immunol.* 177:6780–6786.

Kolls, J.K., y S.A. Khader. 2010. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21:443–448.

Krakauer, M., P.S. Sorensen, y F. Sellebjerg. 2006. CD4(+) memory T cells with high CD26 surface expression are enriched for Th1 markers and correlate with clinical severity of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 181:157–164.

Laguet, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringeard, C. Chable-Bessia, E. Ségéral, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz, y M. Benkirane. 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature.* 474:654–657.

- Lahouassa, H., W. Daddacha, H. Hofmann, D. Ayinde, E.C. Logue, L. Dragin, N. Bloch, C. Maudet, M. Bertrand, T. Gramberg, G. Pancino, S. Priet, B. Canard, N. Laguette, M. Benkirane, C. Transy, N.R. Landau, B. Kim, y F. Margottin-Goguet. 2012. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* 13:223–228.
- Lambeir, A.-M., C. Durinx, S. Scharpé, y I. De Meester. 2003. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 40:209–294.
- Lambotin, M., S. Raghuraman, F. Stoll-Keller, T.F. Baumert, y H. Barth. 2010. A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:350–360.
- Lande, R., D. Ganguly, V. Facchinetti, L. Frasca, C. Conrad, J. Gregorio, S. Meller, G. Chamilos, R. Sebasigari, V. Ricciari, R. Bassett, H. Amuro, S. Fukuhara, T. Ito, Y.-J. Liu, y M. Gilliet. 2011. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 3:73ra19.
- Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, y F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 1:311–316.
- Laurence, A., y J.J. O’Shea. 2007. T(H)-17 differentiation: of mice and men. *Nat. Immunol.* 8:903–905.
- Lazaro, I., D. Nanche, N. Signoret, A.M. Bernard, D. Marguet, D. Klatzmann, T. Dragic, M. Alizon, y Q. Sattentau. 1994. Factors involved in entry of the human immunodeficiency virus type 1 into permissive cells: lack of evidence of a role for CD26. *J. Virol.* 68:6535–6546.
- Lehner, T., Y. Wang, J. Pido-Lopez, T. Whittall, L.A. Bergmeier, y K. Babaahmady. 2008. The emerging role of innate immunity in protection against HIV-1 infection. *Vaccine.* 26:2997–3001.
- Lehrer, R.I. 2004. Primate defensins. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:727–738.
- Lehrer, R.I., A. Barton, K.A. Daher, S.S. Harwig, T. Ganz, y M.E. Selsted. 1989. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin. Invest.* 84:553–561.
- Lehrer, R.I., y W. Lu. 2012. α -Defensins in human innate immunity. *Immunol. Rev.* 245:84–112.
- Lehrer, R.I., M.E. Selsted, D. Szklarek, y J. Fleischmann. 1983. Antibacterial activity of microbicidal cationic proteins 1 and 2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *Infect. Immun.* 42:10–14.
- Leoni, L.M., Q. Chao, H.B. Cottam, D. Genini, M. Rosenbach, C.J. Carrera, I. Budihardjo, X. Wang, y D.A. Carson. 1998. Induction of an apoptotic program in cell-free extracts by 2-chloro-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate and cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:9567–9571.
- Levinson, P., R.Y. Choi, A.L. Cole, T. Hirbod, S. Rhedin, B. Payne, B.L. Guthrie, R. Bosire, A.M. Cole, C. Farquhar, y K. Broliden. 2012. HIV-neutralizing activity of cationic polypeptides in cervicovaginal secretions of women in HIV-serodiscordant relationships. *PLoS ONE.* 7:e31996.
- Levinson, P., R. Kaul, J. Kimani, E. Ngugi, S. Moses, K.S. MacDonald, K. Broliden, y T. Hirbod. 2009. Levels of innate immune factors in genital fluids: association of alpha defensins and LL-37 with genital infections and increased HIV acquisition. *AIDS.* 23:309–317.

- Lieberman-Blum, S.S., H.B. Fung, y J.C. Bandres. 2008. Maraviroc: a CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection. *Clin Ther.* 30:1228–1250.
- Van Linden, A., y H.K. Eltzschig. 2007. Role of pulmonary adenosine during hypoxia: extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26. *Expert Opin Biol Ther.* 7:1437–1447.
- Linzmeier, R., D. Michaelson, L. Liu, y T. Ganz. 1993. The structure of neutrophil defensin genes. *FEBS Lett.* 321:267–273.
- Linzmeier, R.M., y T. Ganz. 2005. Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23. *Genomics.* 86:423–430.
- Linzmeier, R.M., y T. Ganz. 2006. Copy number polymorphisms are not a common feature of innate immune genes. *Genomics.* 88:122–126.
- Liu, L., C. Zhao, H.H. Heng, y T. Ganz. 1997. The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics.* 43:316–320.
- Liu, R., W.A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S.R. Martin, R. Horuk, M.E. MacDonald, H. Stuhlmann, R.A. Koup, y N.R. Landau. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 86:367–377.
- Longhi, M.P., K. Wright, S.N. Lauder, M.A. Nowell, G.W. Jones, A.J. Godkin, S.A. Jones, y A.M. Gallimore. 2008. Interleukin-6 Is Crucial for Recall of Influenza-Specific Memory CD4+ T Cells. *PLoS Pathog.* 4:e1000006.
- Lopalco, L., C. Barassi, C. Paolucci, D. Breda, D. Brunelli, M. Nguyen, J. Nouhin, T.T. Luong, L.X. Truong, M. Clerici, G. Calori, A. Lazzarin, G. Pancino, y S.E. Burastero. 2005. Predictive value of anti-cell and anti-human immunodeficiency virus (HIV) humoral responses in HIV-1-exposed seronegative cohorts of European and Asian origin. *J. Gen. Virol.* 86:339–348.
- Lopalco, L., y S.E. Burastero. 2008. HIV-1 and the self-nonsel self connection: how to sleep with the enemy and be much better off. *AIDS Rev.* 10:162–171.
- Luban, J. 2012. Innate Immune Sensing of HIV-1 by Dendritic Cells. *Cell Host Microbe.* 12:408–418.
- Ludwig, K., H. Fan, J. Dohers, M. Berger, W. Reutter, y C. Böttcher. 2004. 3D structure of the CD26-ADA complex obtained by cryo-EM and single particle analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:223–229.
- Lynn, D.J., y D.G. Bradley. 2007. Discovery of alpha-defensins in basal mammals. *Dev. Comp. Immunol.* 31:963–967.
- Macagno, A., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, y F. Sallusto. 2007. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol.* 28:227–233.
- Mackewicz, C.E., D.J. Blackbourn, y J.A. Levy. 1995. CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2308–2312.
- Mackewicz, C.E., J. Yuan, P. Tran, L. Diaz, E. Mack, M.E. Selsted, y J.A. Levy. 2003. alpha-Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *AIDS.* 17:F23–32.

- Madueño, J.A., E. Muñoz, V. Blazquez, R. Gonzalez, P. Aparicio, y J. Peña. 1993. The CD26 antigen is coupled to protein tyrosine phosphorylation and implicated in CD16-mediated lysis in natural killer cells. *Scand. J. Immunol.* 37:425–429.
- Maeda, K., D. Das, H. Nakata, y H. Mitsuya. 2012. CCR5 inhibitors: emergence, success, and challenges. *Expert Opin Emerg Drugs.* 17:135–145.
- Maggi, E., M. Mazzetti, A. Ravina, F. Annunziato, M. de Carli, M.P. Piccinni, R. Manetti, M. Carbonari, A.M. Pesce, y G. del Prete. 1994. Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science.* 265:244–248.
- Makedonas, G., J. Bruneau, M. Alary, C.M. Tsoukas, C.M. Lowndes, F. Lamothe, y N.F. Bernard. 2005. Comparison of HIV-specific CD8 T-cell responses among uninfected individuals exposed to HIV parenterally and mucosally. *AIDS.* 19:251–259.
- Mandapathil, M., B. Hilldorfer, M.J. Szczepanski, M. Czystowska, M. Szajnik, J. Ren, S. Lang, E.K. Jackson, E. Gorelik, y T.L. Whiteside. 2010. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* 285:7176–7186.
- Mandapathil, M., M. Szczepanski, M. Harasymczuk, J. Ren, D. Cheng, E.K. Jackson, E. Gorelik, J. Johnson, S. Lang, y T.L. Whiteside. 2012. CD26 expression and adenosine deaminase activity in regulatory T cells (Treg) and CD4+ T effector cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology.* 1:659–669.
- Manel, N., B. Hogstad, Y. Wang, D.E. Levy, D. Unutmaz, y D.R. Littman. 2010. A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature.* 467:214–217.
- Manel, N., y D.R. Littman. 2011. Hiding in plain sight: how HIV evades innate immune responses. *Cell.* 147:271–274.
- Mars, W.M., P. Patmasiriwat, T. Maity, V. Huff, M.M. Weil, y G.F. Saunders. 1995. Inheritance of unequal numbers of the genes encoding the human neutrophil defensins HP-1 and HP-3. *J. Biol. Chem.* 270:30371–30376.
- Martellini, J.A., A.L. Cole, N. Venkataraman, G.A. Quinn, P. Svoboda, B.K. Gangrade, J. Pohl, O.E. Sørensen, y A.M. Cole. 2009. Cationic polypeptides contribute to the anti-HIV-1 activity of human seminal plasma. *FASEB J.* 23:3609–3618.
- Martin, C., M. Leone, X. Viviani, M.L. Ayem, y R. Guieu. 2000. High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* 28:3198–3202.
- Martin, K.L., M. Johnson, y R.T. D'Aquila. 2011. APOBEC3G complexes decrease human immunodeficiency virus type 1 production. *J. Virol.* 85:9314–9326.
- Martín, M., J. Huguet, J.J. Centelles, y R. Franco. 1995. Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. Possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. *J. Immunol.* 155:4630–4643.
- Martin, M.P., M. Dean, M.W. Smith, C. Winkler, B. Gerrard, N.L. Michael, B. Lee, R.W. Doms, J. Margolick, S. Buchbinder, J.J. Goedert, T.R. O'Brien, M.W. Hilgartner, D. Vlahov, S.J. O'Brien, y M. Carrington. 1998. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science.* 282:1907–1911.

- Martinez-Navio, J.M., N. Climent, R. Pacheco, F. Garcia, M. Plana, M. Nomdedeu, H. Oliva, C. Rovira, L. Miralles, J.M. Gatell, T. Gallart, J. Mallo, C. Lluís, y R. Franco. 2009. Immunological dysfunction in HIV-1-infected individuals caused by impairment of adenosine deaminase-induced costimulation of T-cell activation. *Immunology*. 128:393–404.
- Matteucci, E., M. Ghimenti, S. Di Beo, y O. Giampietro. 2011. Altered proportions of naïve, central memory and terminally differentiated central memory subsets among CD4+ and CD8 + T cells expressing CD26 in patients with type 1 diabetes. *J. Clin. Immunol.* 31:977–984.
- McDonald, D., L. Wu, S.M. Bohks, V.N. KewalRamani, D. Unutmaz, y T.J. Hope. 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science*. 300:1295–1297.
- McIlroy, D., B. Autran, R. Cheynier, S. Wain-Hobson, J.P. Clauvel, E. Oksenhendler, P. Debré, y A. Hosmalin. 1995. Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Virol.* 69:4737–4745.
- McKeating, J.A., y R.L. Willey. 1989. Structure and function of the HIV envelope. *AIDS*. 3 Suppl 1:S35–41.
- De Meester, I., S. Korom, J. Van Damme, y S. Scharpé. 1999. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol. Today*. 20:367–375.
- Meghji, P., K. Middleton, C.J. Hassall, M.I. Phillips, y A.C. Newby. 1988. Evidence for extracellular deamination of adenosine in the rat heart. *Int. J. Biochem.* 20:1335–1341.
- Méndez-Lagares, G., M. del Mar del Pozo Balado, M. Genebat González, A. García Pergañeda Sánchez, M. Leal Noval, y Y.M. Pacheco López. 2012. Severe immune dysregulation affects CD4(+)CD25(hi)FoxP3(+) regulatory T cells in HIV-infected patients with low-level CD4 T-cell repopulation despite suppressive highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 205:1501–1509.
- Mendoza, D., S.A. Johnson, B.A. Peterson, V. Natarajan, M. Salgado, R.L. Dewar, P.D. Burbelo, N.A. Doria-Rose, E.H. Graf, J.H. Greenwald, J.N. Hodge, W.L. Thompson, N.A. Cogliano, C.L. Chairez, C.A. Rehm, S. Jones, C.W. Hallahan, J.A. Kovacs, I. Sereti, O. Sued, S.A. Peel, R.J. O'Connell, U. O'Doherty, T.-W. Chun, M. Connors, y S.A. Migueles. 2012. Comprehensive analysis of unique cases with extraordinary control over HIV replication. *Blood*. 119:4645–4655.
- Mestas, J., y C.C.W. Hughes. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* 172:2731–2738.
- Migueles, S.A., A.C. Laborico, W.L. Shupert, M.S. Sabbaghian, R. Rabin, C.W. Hallahan, D. Van Baarle, S. Kostense, F. Miedema, M. McLaughlin, L. Ehler, J. Metcalf, S. Liu, y M. Connors. 2002. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat. Immunol.* 3:1061–1068.
- Migueles, S.A., M.S. Sabbaghian, W.L. Shupert, M.P. Bettinotti, F.M. Marincola, L. Martino, C.W. Hallahan, S.M. Selig, D. Schwartz, J. Sullivan, y M. Connors. 2000. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:2709–2714.
- Milanese, M., L. Segat, L.C. Arraes, A. Garzino-Demo, y S. Crovella. 2009. Copy number variation of defensin genes and HIV infection in Brazilian children. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 50:331–333.

- Mildner, A., H. Schmidt, M. Nitsche, D. Merkler, U.-K. Hanisch, M. Mack, M. Heikenwalder, W. Brück, J. Priller, y M. Prinz. 2007. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat. Neurosci.* 10:1544–1553.
- Miles, K., D.J. Clarke, W. Lu, Z. Sibinska, P.E. Beaumont, D.J. Davidson, T.A. Barr, D.J. Campopiano, y M. Gray. 2009. Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of alpha-defensins. *J. Immunol.* 183:2122–2132.
- Mills, K.H.G. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev. Immunol.* 4:841–855.
- Mishell, R.I., y R.W. Dutton. 1966. Immunization of normal mouse spleen cell suspensions in vitro. *Science.* 153:1004–1006.
- Mizokami, A., K. Eguchi, A. Kawakami, H. Ida, Y. Kawabe, T. Tsukada, T. Aoyagi, K. Maeda, C. Morimoto, y S. Nagataki. 1996. Increased population of high fluorescence 1F7 (CD26) antigen on T cells in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 23:2022–2026.
- Moanna, A., R. Dunham, M. Paiardini, y G. Silvestri. 2005. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: killed by friendly fire? *Curr HIV/AIDS Rep.* 2:16–23.
- Molina-Arcas, M., L. Trigueros-Motos, F.J. Casado, y M. Pastor-Anglada. 2008. Physiological and pharmacological roles of nucleoside transporter proteins. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 27:769–778.
- Montoya, C.J., P.A. Velilla, C. Chougnet, A.L. Landay, y M.T. Rugeles. 2006. Increased IFN-gamma production by NK and CD3+/CD56+ cells in sexually HIV-1-exposed but uninfected individuals. *Clin. Immunol.* 120:138–146.
- Morimoto, C., y S.F. Schlossman. 1998. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol. Rev.* 161:55–70.
- Morimoto, C., Y. Torimoto, G. Levinson, C.E. Rudd, M. Schrieber, N.H. Dang, N.L. Letvin, y S.F. Schlossman. 1989. 1F7, a novel cell surface molecule, involved in helper function of CD4 cells. *J. Immunol.* 143:3430–3439.
- Moriwaki, Y., T. Yamamoto, y K. Higashino. 1999. Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications. *Histol. Histopathol.* 14:1321–1340.
- Morrison, M.E., S. Vijayasaradhi, D. Engelstein, A.P. Albino, y A.N. Houghton. 1993. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J. Exp. Med.* 177:1135–1143.
- Mosier, D.E. 1967. A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. *Science.* 158:1573–1575.
- Müller, C.E., y K.A. Jacobson. 2011. Xanthines as adenosine receptor antagonists. *Handb Exp Pharmacol.* 151–199.
- Nakamachi, Y., M. Koshiba, T. Nakazawa, S. Hatachi, R. Saura, M. Kurosaka, H. Kusaka, y S. Kumagai. 2003. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 48:668–674.

- Nakashima, H., N. Yamamoto, M. Masuda, y N. Fujii. 1993. Defensins inhibit HIV replication in vitro. *AIDS*. 7:1129.
- Narra, K., S.R. Mullins, H.-O. Lee, B. Strzemkowski-Brun, K. Magalong, V.J. Christiansen, P.A. McKee, B. Egleston, S.J. Cohen, L.M. Weiner, N.J. Meropol, y J.D. Cheng. 2007. Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* 6:1691–1699.
- Nguyen, T.X., A.M. Cole, y R.I. Lehrer. 2003. Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth. *Peptides*. 24:1647–1654.
- Nikolova, M., M. Carriere, M.-A. Jenabian, S. Limou, M. Younas, A. Kök, S. Huë, N. Seddiki, A. Hulin, O. Delaneau, H. Schuitemaker, J.T. Herbeck, J.I. Mullins, M. Muhtarova, A. Bensussan, J.-F. Zagury, J.-D. Lelievre, y Y. Lévy. 2011. CD39/Adenosine Pathway Is Involved in AIDS Progression. *PLoS Pathog.* 7:e1002110.
- Niu, W., Q. Shu, Z. Chen, S. Mathews, E. Di Cera, y C. Frieden. 2010. The role of Zn²⁺ on the structure and stability of murine adenosine deaminase. *J Phys Chem B*. 114:16156–16165.
- Niyonsaba, F., K. Iwabuchi, H. Matsuda, H. Ogawa, y I. Nagaoka. 2002. Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int. Immunol.* 14:421–426.
- Norbury, C.C. 2006. Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology*. 117:443–451.
- Nussenzweig, M.C., R.M. Steinman, B. Gutchinov, y Z.A. Cohn. 1980. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 152:1070–1084.
- Nuytten, H., I. Wlodarska, K. Nackaerts, S. Vermeire, J. Vermeesch, J.-J. Cassiman, y H. Cuppens. 2009. Accurate determination of copy number variations (CNVs): application to the alpha- and beta-defensin CNVs. *J. Immunol. Methods*. 344:35–44.
- O'Garra, A., B. Stockinger, y M. Veldhoen. 2008. Differentiation of human T(H)-17 cells does require TGF-beta! *Nat. Immunol.* 9:588–590.
- Oberlin, E., A. Amara, F. Bachelier, C. Bessia, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J.M. Heard, I. Clark-Lewis, D.F. Legler, M. Loetscher, M. Baggiolini, y B. Moser. 1996. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 382:833–835.
- Ohnuma, K., N.H. Dang, y C. Morimoto. 2008. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol.* 29:295–301.
- Ohnuma, K., Y. Munakata, T. Ishii, S. Iwata, S. Kobayashi, O. Hosono, H. Kawasaki, N.H. Dang, y C. Morimoto. 2001. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV induces T cell proliferation through CD86 up-regulation on APCs. *J. Immunol.* 167:6745–6755.
- Ohtsuki, T., O. Hosono, H. Kobayashi, Y. Munakata, A. Souta, T. Shioda, y C. Morimoto. 1998. Negative regulation of the anti-human immunodeficiency virus and chemotactic activity of human stromal cell-derived factor 1alpha by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *FEBS Lett.* 431:236–240.
- Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi, y S. Sakaguchi. 2008. Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:10113–10118.

- Oravec, T., M. Pall, G. Roderiquez, M.D. Gorrell, M. Ditto, N.Y. Nguyen, R. Boykins, E. Unsworth, y M.A. Norcross. 1997. Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) by dipeptidyl peptidase IV (CD26)-mediated cleavage. *J. Exp. Med.* 186:1865–1872.
- Pacheco, R., J.M. Martinez-Navio, M. Lejeune, N. Climent, H. Oliva, J.M. Gatell, T. Gallart, J. Mallo, C. Lluís, y R. Franco. 2005. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:9583–9588.
- Palucka, K., J. Banchereau, y I. Mellman. 2010. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity.* 33:464–478.
- Panther, E., S. Corinti, M. Idzko, Y. Herouy, M. Napp, A. la Sala, G. Girolomoni, y J. Norgauer. 2003. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood.* 101:3985–3990.
- Panther, E., M. Idzko, Y. Herouy, H. Rheinen, P.J. Gebicke-Haerter, U. Mrowietz, S. Dichmann, y J. Norgauer. 2001. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J.* 15:1963–1970.
- Pasare, C., y R. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 299:1033–1036.
- Patterson-Delafield, J., R.J. Martinez, y R.I. Lehrer. 1980. Microbicidal cationic proteins in rabbit alveolar macrophages: a potential host defense mechanism. *Infect. Immun.* 30:180–192.
- Patterson-Delafield, J., D. Szklarek, R.J. Martinez, y R.I. Lehrer. 1981. Microbicidal cationic proteins of rabbit alveolar macrophages: amino acid composition and functional attributes. *Infect. Immun.* 31:723–731.
- Paxton, W.A., R. Liu, S. Kang, L. Wu, T.R. Gingeras, N.R. Landau, C.R. Mackay, y R.A. Koup. 1998. Reduced HIV-1 infectability of CD4+ lymphocytes from exposed-uninfected individuals: association with low expression of CCR5 and high production of beta-chemokines. *Virology.* 244:66–73.
- Pazgier, M., G. Wei, B. Ericksen, G. Jung, Z. Wu, E. de Leeuw, W. Yuan, H. Szmanski, W.-Y. Lu, J. Lubkowski, R.I. Lehrer, y W. Lu. 2012. Sometimes it takes two to tango: contributions of dimerization to functions of human α -defensin HNP1 peptide. *J. Biol. Chem.* 287:8944–8953.
- Perelson, A.S., A.U. Neumann, M. Markowitz, J.M. Leonard, y D.D. Ho. 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science.* 271:1582–1586.
- Pereyra, F., M.M. Addo, D.E. Kaufmann, Y. Liu, T. Miura, A. Rathod, B. Baker, A. Trocha, R. Rosenberg, E. Mackey, P. Ueda, Z. Lu, D. Cohen, T. Wrinn, C.J. Petropoulos, E.S. Rosenberg, y B.D. Walker. 2008. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 197:563–571.
- Pérez-Rodríguez, M.A.T., P. Varela, A. Cañizares, y P. Llinares. 2012. Elevated cerebrospinal fluid adenosine deaminase levels in patients with meningitis caused by varicella-zoster virus. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 30:273–274.
- Petersen, M.B., L. Tranebjaerg, N. Tommerup, P. Nygaard, y H. Edwards. 1987. New assignment of the adenosine deaminase gene locus to chromosome 20q13 X 11 by study of a patient with interstitial deletion 20q. *J. Med. Genet.* 24:93–96.

- Phares, T.W., S.A. Stohman, M. Hwang, B. Min, D.R. Hinton, y C.C. Bergmann. 2012. CD4 T cells promote CD8 T cell immunity at the priming and effector site during viral encephalitis. *J. Virol.* 86:2416–2427.
- Philpott, S.M. 2003. HIV-1 coreceptor usage, transmission, and disease progression. *Curr. HIV Res.* 1:217–227.
- Piazza, G.A., H.M. Callanan, J. Mowery, y D.C. Hixson. 1989. Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix. *Biochem. J.* 262:327–334.
- Pichlmair, A., y C. Reis e Sousa. 2007. Innate recognition of viruses. *Immunity.* 27:370–383.
- Pierson, T., J. McArthur, y R.F. Siliciano. 2000. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu. Rev. Immunol.* 18:665–708.
- Pion, M., A. Granelli-Piperno, B. Mangeat, R. Stalder, R. Correa, R.M. Steinman, y V. Piguet. 2006. APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 203:2887–2893.
- Pitrak, D.L., H.C. Tsai, K.M. Mullane, S.H. Sutton, y P. Stevens. 1996. Accelerated neutrophil apoptosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Invest.* 98:2714–2719.
- Plana, M., F. Garcia, T. Gallart, J.M. Miró, y J.M. Gatell. 1998. Lack of T-cell proliferative response to HIV-1 antigens after 1 year of highly active antiretroviral treatment in early HIV-1 disease. Immunology Study Group of Spanish EARTH-1 Study. *Lancet.* 352:1194–1195.
- Pope, M., M.G. Betjes, N. Romani, H. Hirmand, P.U. Cameron, L. Hoffman, S. Gezelter, G. Schuler, y R.M. Steinman. 1994. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell.* 78:389–398.
- Porter, E., H. Yang, S. Yavagal, G.C. Preza, O. Murillo, H. Lima, S. Greene, L. Mahoozi, M. Klein-Patel, G. Diamond, S. Gulati, T. Ganz, P.A. Rice, y A.J. Quayle. 2005. Distinct defensin profiles in *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* urethritis reveal novel epithelial cell-neutrophil interactions. *Infect. Immun.* 73:4823–4833.
- Porter, E.M., L. Liu, A. Oren, P.A. Anton, y T. Ganz. 1997. Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules. *Infect. Immun.* 65:2389–2395.
- Presicce, P., S. Giannelli, A. Taddeo, M.L. Villa, y S. Della Bella. 2009. Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD91. *J. Leukoc. Biol.* 86:941–948.
- Proost, P., P. Menten, S. Struyf, E. Schutyser, I. De Meester, y J. Van Damme. 2000. Cleavage by CD26/dipeptidyl peptidase IV converts the chemokine LD78beta into a most efficient monocyte attractant and CCR1 agonist. *Blood.* 96:1674–1680.
- Proost, P., E. Schutyser, P. Menten, S. Struyf, A. Wuyts, G. Opdenakker, M. Detheux, M. Parmentier, C. Durinx, A.M. Lambeir, J. Neyts, S. Liekens, P.C. Maudgal, A. Billiau, y J. Van Damme. 2001. Amino-terminal truncation of CXCR3 agonists impairs receptor signaling and lymphocyte chemotaxis, while preserving antiangiogenic properties. *Blood.* 98:3554–3561.
- Proost, P., S. Struyf, D. Schols, G. Opdenakker, S. Sozzani, P. Allavena, A. Mantovani, K. Augustyns, G. Bal, A. Haemers, A.M. Lambeir, S. Scharpé, J. Van Damme, y I. De Meester. 1999. Truncation of macrophage-

derived chemokine by CD26/ dipeptidyl-peptidase IV beyond its predicted cleavage site affects chemotactic activity and CC chemokine receptor 4 interaction. *J. Biol. Chem.* 274:3988–3993.

Pulendran, B., H. Tang, y S. Manicassamy. 2010. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat. Immunol.* 11:647–655.

Ramratnam, B., S. Bonhoeffer, J. Binley, A. Hurley, L. Zhang, J.E. Mittler, M. Markowitz, J.P. Moore, A.S. Perelson, y D.D. Ho. 1999. Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. *Lancet.* 354:1782–1785.

Rasmussen, H.B., S. Branner, F.C. Wiberg, y N. Wagtmann. 2003. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. *Nat. Struct. Biol.* 10:19–25.

Ravet, S., D. Scott-Algara, E. Bonnet, H.K. Tran, T. Tran, N. Nguyen, L.X. Truong, I. Theodorou, F. Barré-Sinoussi, G. Pancino, y P. Paul. 2007. Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood.* 109:4296–4305.

Reiche, E.M.V., A.M. Bonametti, J.C. Voltarelli, H.K. Morimoto, y M.A.E. Watanabe. 2007. Genetic polymorphisms in the chemokine and chemokine receptors: impact on clinical course and therapy of the human immunodeficiency virus type 1 infection (HIV-1). *Curr. Med. Chem.* 14:1325–1334.

Reinhold, D., U. Bank, F. Bühling, U. Lendeckel, J. Faust, K. Neubert, y S. Ansorge. 1997. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor-beta 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. *Immunology.* 91:354–360.

Reinhold, D., U. Bank, M. Täger, S. Ansorge, S. Wrenger, A. Thielitz, U. Lendeckel, J. Faust, K. Neubert, y S. Brocke. 2008. DP IV/CD26, APN/CD13 and related enzymes as regulators of T cell immunity: implications for experimental encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Front. Biosci.* 13:2356–2363.

Reis e Sousa, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6:476–483.

Restrepo, C., N.I. Rallón, J. Carrillo, V. Soriano, J. Blanco, y J.M. Benito. 2011. Host factors involved in low susceptibility to HIV infection. *AIDS Rev.* 13:30–40.

Rice, W.G., T. Ganz, J.M. Kinkade Jr, M.E. Selsted, R.I. Lehrer, y R.T. Parmley. 1987. Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood.* 70:757–765.

Richard, E., S.M. Alam, F.X. Arredondo-Vega, D.D. Patel, y M.S. Hershfield. 2002. Clustered charged amino acids of human adenosine deaminase comprise a functional epitope for binding the adenosine deaminase complexing protein CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J. Biol. Chem.* 277:19720–19726.

Richard, E., F.X. Arredondo-Vega, I. Santisteban, S.J. Kelly, D.D. Patel, y M.S. Hershfield. 2000. The binding site of human adenosine deaminase for CD26/Dipeptidyl peptidase IV: the Arg142Gln mutation impairs binding to cd26 but does not cause immune deficiency. *J. Exp. Med.* 192:1223–1236.

Rodríguez-García, M., H. Oliva, N. Climent, M.M. Escibese, F. García, T.M. Moran, J.M. Gatell, y T. Gallart. 2009. Impact of alpha-defensins1-3 on the maturation and differentiation of human monocyte-derived DCs. Concentration-dependent opposite dual effects. *Clin. Immunol.* 131:374–384.

Rodríguez-García, M., H. Oliva, N. Climent, F. García, J.M. Gatell, y T. Gallart. 2007. Human immature monocyte-derived dendritic cells produce and secrete alpha-defensins 1-3. *J. Leukoc. Biol.* 82:1143–1146.

- Röhrl, J., D. Yang, J.J. Oppenheim, y T. Hehlhans. 2010. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *J. Immunol.* 184:6688–6694.
- Rollenhagen, C., y S.N. Asin. 2010. IL-8 decreases HIV-1 transcription in peripheral blood lymphocytes and ectocervical tissue explants. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 54:463–469.
- de la Rosa, G., D. Yang, P. Tewary, A. Varadhachary, y J.J. Oppenheim. 2008. Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *J. Immunol.* 180:6868–6876.
- Rowland-Jones, S.L., y A. McMichael. 1995. Immune responses in HIV-exposed seronegatives: have they repelled the virus? *Curr. Opin. Immunol.* 7:448–455.
- Rowland-Jones, S.L., y H.C. Whittle. 2007. Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat. Immunol.* 8:329–331.
- Ruers, T.J., W.A. Buurman, y C.J. van der Linden. 1987. 2'-Deoxycoformycin and deoxyadenosine affect IL 2 production and IL 2 receptor expression of human T cells. *J. Immunol.* 138:116–122.
- Rusert, P., A. Krarup, C. Magnus, O.F. Brandenberg, J. Weber, A.-K. Ehlert, R.R. Regoes, H.F. Günthard, y A. Trkola. 2011. Interaction of the gp120 V1V2 loop with a neighboring gp120 unit shields the HIV envelope trimer against cross-neutralizing antibodies. *J. Exp. Med.* 208:1419–1433.
- Sagar, M., X. Wu, S. Lee, y J. Overbaugh. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J. Virol.* 80:9586–9598.
- Saitoh, T., J. Komano, Y. Saitoh, T. Misawa, M. Takahama, T. Kozaki, T. Uehata, H. Iwasaki, H. Omori, S. Yamaoka, N. Yamamoto, y S. Akira. 2012. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe.* 12:109–116.
- Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22:531–562.
- Sakaguchi, S., K. Fukuma, K. Kuribayashi, y T. Masuda. 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 161:72–87.
- Sakaguchi, S., M. Miyara, C.M. Costantino, y D.A. Hafler. 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10:490–500.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, y M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151–1164.
- Salzman, N.H., D. Ghosh, K.M. Huttner, Y. Paterson, y C.L. Bevins. 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature.* 422:522–526.
- Saura, C.A., J. Mallol, E.I. Canela, C. Lluís, y R. Franco. 1998. Adenosine deaminase and A1 adenosine receptors internalize together following agonist-induced receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 273:17610–17617.

- Scarlati, G., E. Tresoldi, A. Björndal, R. Fredriksson, C. Colognesi, H.K. Deng, M.S. Malnati, A. Plebani, A.G. Siccardi, D.R. Littman, E.M. Fenyö, y P. Lusso. 1997. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat. Med.* 3:1259–1265.
- Schmidt, B., S.H. Fujimura, J.N. Martin, y J.A. Levy. 2006. Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy. *J. Clin. Immunol.* 26:55–64.
- Schnurr, M., T. Toy, A. Shin, G. Hartmann, S. Rothenfusser, J. Soellner, I.D. Davis, J. Cebon, y E. Maraskovsky. 2004. Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 103:1391–1397.
- Schrader, W.P., C.A. West, A.D. Miczek, y E.K. Norton. 1990. Characterization of the adenosine deaminase-adenosine deaminase complexing protein binding reaction. *J. Biol. Chem.* 265:19312–19318.
- Schuler, G., y R.M. Steinman. 1985. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 161:526–546.
- Schulze Zur Wiesch, J., A. Thomssen, P. Hartjen, I. Tóth, C. Lehmann, D. Meyer-Olson, K. Colberg, S. Frerk, D. Babikir, S. Schmiedel, O. Degen, S. Mauss, J. Rockstroh, S. Staszewski, P. Khaykin, A. Strasak, A.W. Lohse, G. Fätkenheuer, J. Hauber, y J. van Lunzen. 2011. Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3+ T regulatory cells correlates with progressive disease. *J. Virol.* 85:1287–1297.
- Scott-Algara, D., L.X. Truong, P. Versmisse, A. David, T.T. Luong, N.V. Nguyen, I. Theodorou, F. Barré-Sinoussi, y G. Pancino. 2003. Cutting Edge: Increased NK Cell Activity in HIV-1-Exposed but Uninfected Vietnamese Intravascular Drug Users. *J Immunol.* 171:5663–5667.
- Seelamgari, A., A. Maddukuri, R. Berro, C. de la Fuente, K. Kehn, L. Deng, S. Dadgar, M.E. Bottazzi, E. Ghedin, A. Pumfery, y F. Kashanchi. 2004. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front. Biosci.* 9:2388–2413.
- Segura, R.M., C. Pascual, I. Ocaña, J.M. Martínez-Vázquez, E. Ribera, I. Ruiz, y M.D. Pelegrí. 1989. Adenosine deaminase in body fluids: a useful diagnostic tool in tuberculosis. *Clin. Biochem.* 22:141–148.
- Seidel, A., Y. Ye, L.R. de Armas, M. Soto, W. Yarosh, R.A. Marcisisin, D. Tran, M.E. Selsted, y D. Camerini. 2010. Cyclic and acyclic defensins inhibit human immunodeficiency virus type-1 replication by different mechanisms. *PLoS ONE.* 5:e9737.
- Selsted, M.E., y A.J. Ouellette. 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* 6:551–557.
- Selsted, M.E., D. Szklarek, T. Ganz, y R.I. Lehrer. 1985. Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 49:202–206.
- Sevigny, C.P., L. Li, A.S. Awad, L. Huang, M. McDuffie, J. Linden, P.I. Lobo, y M.D. Okusa. 2007. Activation of adenosine 2A receptors attenuates allograft rejection and alloantigen recognition. *J. Immunol.* 178:4240–4249.
- Sewram, S., R. Singh, E. Kormuth, L. Werner, K. Mlisana, S.S.A. Karim, y T. Ndung'u. 2009. Human TRIM5alpha expression levels and reduced susceptibility to HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 199:1657–1663.

- Sharoyan, S., A. Antonyan, S. Mardanyan, G. Lupidi, y G. Cristalli. 2006. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. *Acta Biochim. Pol.* 53:539–546.
- Sharp, P.M., E. Bailes, R.R. Chaudhuri, C.M. Rodenburg, M.O. Santiago, y B.H. Hahn. 2001. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 356:867–876.
- Sharpe, A.H., y G.J. Freeman. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2:116–126.
- Sharpe, A.H., E.J. Wherry, R. Ahmed, y G.J. Freeman. 2007. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat. Immunol.* 8:239–245.
- Shaw, J.M., P.W. Hunt, J.W. Critchfield, D.H. McConnell, J.C. Garcia, R.B. Pollard, M. Somsouk, S.G. Deeks, y B.L. Shacklett. 2011. Increased frequency of regulatory T cells accompanies increased immune activation in rectal mucosae of HIV-positive noncontrollers. *J. Virol.* 85:11422–11434.
- Shen, H., y D.R. Goldstein. 2009. IL-6 and TNF-alpha synergistically inhibit allograft acceptance. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20:1032–1040.
- Shen, L., y K.L. Rock. 2006. Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 18:85–91.
- Sigal, A., J.T. Kim, A.B. Balazs, E. Dekel, A. Mayo, R. Milo, y D. Baltimore. 2011. Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature.* 477:95–98.
- Simon, V., y D.D. Ho. 2003. HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* 1:181–190.
- Simon, V., D.D. Ho, y Q. Abdool Karim. 5. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *The Lancet.* 368:489–504.
- Singh, P.K., H.P. Jia, K. Wiles, J. Hesselberth, L. Liu, B.A. Conway, E.P. Greenberg, E.V. Valore, M.J. Welsh, T. Ganz, B.F. Tack, y P.B. McCray Jr. 1998. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:14961–14966.
- SKARNES, R.C., y D.W. WATSON. 1956. Characterization of leukin: an antibacterial factor from leucocytes active against gram-positive pathogens. *J. Exp. Med.* 104:829–845.
- Skurnick, J.H., P. Palumbo, A. DeVico, B.L. Shacklett, F.T. Valentine, M. Merges, R. Kamin-Lewis, J. Mestecky, T. Denny, G.K. Lewis, J. Lloyd, R. Prashchunus, A. Baker, D.F. Nixon, S. Stranford, R. Gallo, S.H. Vermund, y D.B. Louria. 2002. Correlates of nontransmission in US women at high risk of human immunodeficiency virus type 1 infection through sexual exposure. *J. Infect. Dis.* 185:428–438.
- Smed-Sörensen, A., K. Loré, L. Walther-Jallow, J. Andersson, y A.-L. Spetz. 2004. HIV-1-infected dendritic cells up-regulate cell surface markers but fail to produce IL-12 p70 in response to CD40 ligand stimulation. *Blood.* 104:2810–2817.
- Songok, E.M., B. Osero, L. McKinnon, M.K. Rono, W. Apidi, E.J. Matey, A.F.A. Meyers, M. Luo, J. Kimani, C. Wachihi, B.T. Ball, F.A. Plummer, y S. Mpoke. 2010. CD26/dipeptidyl peptidase IV (CD26/DPPIV) is highly expressed in peripheral blood of HIV-1 exposed uninfected female sex workers. *Virology.* 7:343.
- Spadaro, M., C. Caorsi, P. Ceruti, A. Varadhachary, G. Forni, F. Pericle, y M. Giovarelli. 2008. Lactoferrin, a major defense protein of innate immunity, is a novel maturation factor for human dendritic cells. *FASEB J.* 22:2747–2757.

- Spira, A.I., P.A. Marx, B.K. Patterson, J. Mahoney, R.A. Koup, S.M. Wolinsky, y D.D. Ho. 1996. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J. Exp. Med.* 183:215–225.
- Stange, T., U. Kettmann, y H.J. Holzhausen. 2000. Immunoelectron microscopic demonstration of the membrane proteases aminopeptidase N/CD13 and dipeptidyl peptidase IV/CD26 in normal and neoplastic renal parenchymal tissues and cells. *Eur J Histochem.* 44:157–164.
- Steinman, R.M. 2007. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1:S53–60.
- Steinman, R.M., y Z.A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142–1162.
- Steinman, R.M., y Z.A. Cohn. 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* 139:380–397.
- Steinman, R.M., D. Hawiger, y M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21:685–711.
- Steinman, R.M., y M.D. Witmer. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:5132–5136.
- Sthoeger, Z.M., S. Bezalel, N. Chapnik, I. Asher, y O. Froy. 2009. High alpha-defensin levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology.* 127:116–122.
- Stohlawetz, P., P. Hahn, M. Köller, J. Hauer, H. Resch, J. Smolen, y P. Pietschmann. 1998. Immunophenotypic characteristics of monocytes in elderly subjects. *Scand. J. Immunol.* 48:324–326.
- Stone, T.W., S. Ceruti, y M.P. Abbracchio. 2009. Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Handb Exp Pharmacol.* 535–587.
- Struyf, S., P. Menten, J.P. Lenaerts, W. Put, A. D’Haese, E. De Clercq, D. Schols, P. Proost, y J. Van Damme. 2001. Diverging binding capacities of natural LD78beta isoforms of macrophage inflammatory protein-1alpha to the CC chemokine receptors 1, 3 and 5 affect their anti-HIV-1 activity and chemotactic potencies for neutrophils and eosinophils. *Eur. J. Immunol.* 31:2170–2178.
- Struyf, S., P. Proost, D. Schols, E. De Clercq, G. Opendakker, J.P. Lenaerts, M. Detheux, M. Parmentier, I. De Meester, S. Scharpé, y J. Van Damme. 1999. CD26/dipeptidyl-peptidase IV down-regulates the eosinophil chemotactic potency, but not the anti-HIV activity of human eotaxin by affecting its interaction with CC chemokine receptor 3. *J. Immunol.* 162:4903–4909.
- Suchard, M.S., E. Mayne, V.A. Green, S. Shalekoff, S.L. Donninger, W.S. Stevens, C.M. Gray, y C.T. Tiemessen. 2010. FOXP3 expression is upregulated in CD4T cells in progressive HIV-1 infection and is a marker of disease severity. *PLoS ONE.* 5:e11762.
- Sun, W.-C., Y. Cao, L. Jin, L.-Z. Wang, F. Meng, y X.-Z. Zhu. 2005. Modulating effect of adenosine deaminase on function of adenosine A1 receptors. *Acta Pharmacol. Sin.* 26:160–165.
- Suy, A., P. Castro, M. Nomdedeu, F. García, A. López, E. Fumero, T. Gallart, L. Lopalco, O. Coll, J.M. Gatell, y M. Plana. 2007. Immunological profile of heterosexual highly HIV-exposed uninfected individuals: predominant role of CD4 and CD8 T-cell activation. *J. Infect. Dis.* 196:1191–1201.

- Syeda, F., H.-Y. Liu, E. Tullis, M. Liu, A.S. Slutsky, y H. Zhang. 2008. Differential signaling mechanisms of HNP-induced IL-8 production in human lung epithelial cells and monocytes. *J. Cell. Physiol.* 214:820–827.
- Szabó, C., G.S. Scott, L. Virág, G. Egnaczyk, A.L. Salzman, T.P. Shanley, y G. Haskó. 1998. Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* 125:379–387.
- Szabo, S.J., S.T. Kim, G.L. Costa, X. Zhang, C.G. Fathman, y L.H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 100:655–669.
- Tan, B.H., C. Meinken, M. Bastian, H. Bruns, A. Legaspi, M.T. Ochoa, S.R. Krutzik, B.R. Bloom, T. Ganz, R.L. Modlin, y S. Stenger. 2006. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J. Immunol.* 177:1864–1871.
- Tanaka, T., D. Camerini, B. Seed, Y. Torimoto, N.H. Dang, J. Kameoka, H.N. Dahlberg, S.F. Schlossman, y C. Morimoto. 1992. Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. *J. Immunol.* 149:481–486.
- Tanaka, T., J.S. Duke-Cohan, J. Kameoka, A. Yaron, I. Lee, S.F. Schlossman, y C. Morimoto. 1994. Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3082–3086.
- Tang, Y.Q., J. Yuan, G. Osapay, K. Osapay, D. Tran, C.J. Miller, A.J. Ouellette, y M.E. Selsted. 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science.* 286:498–502.
- Taylor, B.S., M.E. Sobieszczyk, F.E. McCutchan, y S.M. Hammer. 2008. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* 358:1590–1602.
- Territo, M.C., T. Ganz, M.E. Selsted, y R. Lehrer. 1989. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84:2017–2020.
- Thammavongsa, V., J.W. Kern, D.M. Missiakas, y O. Schneewind. 2009. Staphylococcus aureus synthesizes adenosine to escape host immune responses. *J. Exp. Med.* 206:2417–2427.
- Tomescu, C., F.-M. Duh, M.A. Lanier, A. Kapalko, K.C. Mounzer, M.P. Martin, M. Carrington, D.S. Metzger, y L.J. Montaner. 2010. Increased plasmacytoid dendritic cell maturation and natural killer cell activation in HIV-1 exposed, uninfected intravenous drug users. *AIDS.* 24:2151–2160.
- Tongaonkar, P., P. Tran, K. Roberts, J. Schaal, G. Ösapay, D. Tran, A.J. Ouellette, y M.E. Selsted. 2011. Rhesus macaque θ -defensin isoforms: expression, antimicrobial activities, and demonstration of a prominent role in neutrophil granule microbicidal activities. *J. Leukoc Biol.* 89:283–290.
- Torimoto, Y., N.H. Dang, E. Vivier, T. Tanaka, S.F. Schlossman, y C. Morimoto. 1991. Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 147:2514–2517.
- Trabattoni, D., S.L. Caputo, G. Maffei, F. Vichi, M. Biasin, P. Pierotti, F. Fasano, M. Saresella, M. Franchini, P. Ferrante, F. Mazzotta, y M. Clerici. 2004. Human alpha defensin in HIV-exposed but uninfected individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 35:455–463.
- Trams, E.G., y C.J. Lauter. 1975. Adenosine deaminase of cultured brain cells. *Biochem. J.* 152:681–687.

- Tsegaye, T.S., y S. Pöhlmann. 2010. The multiple facets of HIV attachment to dendritic cell lectins. *Cell. Microbiol.* 12:1553–1561.
- Tsutsumi-Ishii, Y., y I. Nagaoka. 2003. Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. *J. Immunol.* 170:4226–4236.
- Tudor, D., M. Derrien, L. Diomedea, A.-S. Drillet, M. Houimel, C. Moog, J.-M. Reynes, L. Lopalco, y M. Bomsel. 2009. HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol.* 2:412–426.
- Uematsu, T., H. Tanaka, M. Yamaoka, y K. Furusawa. 2004. Effects of oral squamous cell carcinoma-derived TGF-beta1 on CD26/DPPIV expression in T cells. *Anticancer Res.* 24:619–624.
- Vahl, T.P., B.W. Paty, B.D. Fuller, R.L. Prigeon, y D.A. D'Alessio. 2003. Effects of GLP-1-(7-36)NH₂, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH₂ on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:1772–1779.
- Valenzuela, A., J. Blanco, C. Callebaut, E. Jacotot, C. Lluís, A.G. Hovanessian, y R. Franco. 1997. Adenosine deaminase binding to human CD26 is inhibited by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 and viral particles. *J. Immunol.* 158:3721–3729.
- Vanham, G., L. Kestens, I. De Meester, J. Vingerhoets, G. Penne, G. Vanhoof, S. Scharpé, H. Heyligen, E. Bosmans, y J.L. Ceuppens. 1993. Decreased expression of the memory marker CD26 on both CD4+ and CD8+ T lymphocytes of HIV-infected subjects. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 6:749–757.
- Venkataraman, N., A.L. Cole, P. Svoboda, J. Pohl, y A.M. Cole. 2005. Cationic polypeptides are required for anti-HIV-1 activity of human vaginal fluid. *J. Immunol.* 175:7560–7567.
- Villadangos, J.A., y W.R. Heath. 2005. Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. *Semin. Immunol.* 17:262–272.
- van Vliet, S.J., J. den Dunnen, S.I. Gringhuis, T.B. Geijtenbeek, y Y. van Kooyk. 2007. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 19:435–440.
- Wain, L.V., J.A.L. Armour, y M.D. Tobin. 2009. Genomic copy number variation, human health, and disease. *Lancet.* 374:340–350.
- Wakim, L.M., y M.J. Bevan. 2011. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature.* 471:629–632.
- Walker, B.D. 2007. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med.* 15:134–136.
- Walker, M.R., D.J. Kasprovicz, V.H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J.H. Buckner, y S.F. Ziegler. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J. Clin. Invest.* 112:1437–1443.
- Wang, W., S.M. Owen, D.L. Rudolph, A.M. Cole, T. Hong, A.J. Waring, R.B. Lal, y R.I. Lehrer. 2004. Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1. *J. Immunol.* 173:515–520.

- Wang, Y.H., A.H. Davies, y I.M. Jones. 1995. Expression and purification of glutathione S-transferase-tagged HIV-1 gp120: no evidence of an interaction with CD26. *Virology*. 208:142–146.
- Watts, T.H. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* 23:23–68.
- Weihofen, W.A., J. Liu, W. Reutter, W. Saenger, y H. Fan. 2004. Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface. *J. Biol. Chem.* 279:43330–43335.
- van Wetering, S., S.P.G. Mannesse-Lazeroms, M.A.J.A. van Sterkenburg, y P.S. Hiemstra. 2002. Neutrophil defensins stimulate the release of cytokines by airway epithelial cells: modulation by dexamethasone. *Inflamm. Res.* 51:8–15.
- Van der Weyden, M.B., y W.N. Kelley. 1976. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. *J. Biol. Chem.* 251:5448–5456.
- Wiley, R.D., y S. Gummuluru. 2006. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:738–743.
- Wilk, T., y S.D. Fuller. 1999. Towards the structure of the human immunodeficiency virus: divide and conquer. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:231–243.
- Willheim, M., C. Ebner, K. Baier, W. Kern, K. Schratlbauer, R. Thien, D. Kraft, H. Breiteneder, W. Reinisch, y O. Scheiner. 1997. Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(H1) subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100:348–355.
- Wilson, C.L., A.J. Ouellette, D.P. Satchell, T. Ayabe, Y.S. López-Boado, J.L. Stratman, S.J. Hultgren, L.M. Matrisian, y W.C. Parks. 1999. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*. 286:113–117.
- Wilson, D.K., F.B. Rudolph, y F.A. Quijcho. 1991. Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science*. 252:1278–1284.
- Wilson, J.M., W.G. Ross, O.N. Agbai, R. Frazier, R.A. Figler, J. Rieger, J. Linden, y P.B. Ernst. 2009. The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells. *J. Immunol.* 182:4616–4623.
- Wimley, W.C., M.E. Selsted, y S.H. White. 1994. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* 3:1362–1373.
- Wu, L., y V.N. KewalRamani. 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* 6:859–868.
- Wu, Z., F. Cocchi, D. Gentles, B. Ericksen, J. Lubkowski, A. Devico, R.I. Lehrer, y W. Lu. 2005. Human neutrophil alpha-defensin 4 inhibits HIV-1 infection in vitro. *FEBS Lett.* 579:162–166.
- Yamabe, T., K. Takakura, K. Sugie, Y. Kitaoka, S. Takeda, Y. Okubo, K. Teshigawara, J. Yodoi, y T. Hori. 1997. Induction of the 2B9 antigen/dipeptidyl peptidase IV/CD26 on human natural killer cells by IL-2, IL-12 or IL-15. *Immunology*. 91:151–158.

- Yamaguchi, N., H. Isomoto, H. Mukae, H. Ishimoto, K. Ohnita, S. Shikuwa, Y. Mizuta, M. Nakazato, y S. Kohno. 2009. Concentrations of alpha- and beta-defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Res.* 58:192–197.
- Yang, D., Q. Chen, O. Chertov, y J.J. Oppenheim. 2000. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 68:9–14.
- Yang, D., O. Chertov, S.N. Bykovskaia, Q. Chen, M.J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J.M. Schröder, J.M. Wang, O.M. Howard, y J.J. Oppenheim. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 286:525–528.
- Yang, D., Y.V. Postnikov, Y. Li, P. Tewary, G. De La Rosa, F. Wei, D. Klinman, T. Gioannini, J.P. Weiss, T. Furusawa, M. Bustin, y J.J. Oppenheim. 2012. High-Mobility Group Nucleosome-Binding Protein 1 Acts as an Alarmin and Is Critical for Lipopolysaccharide-Induced Immune Responses. *J Exp Med.* 209:157–171.
- Yang, J.C., y G.A. Cortopassi. 1998. dATP causes specific release of cytochrome C from mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250:454–457.
- Yang, O.O., P.T.N. Sarkis, A. Ali, J.D. Harlow, C. Brander, S.A. Kalams, y B.D. Walker. 2003. Determinant of HIV-1 mutational escape from cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 197:1365–1375.
- Yegutkin, G.G. 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta.* 1783:673–694.
- Yeung, C.Y., D.E. Ingolia, D.B. Roth, C. Shoemaker, M.R. Al-Ubaidi, J.Y. Yen, C. Ching, C. Bobonis, R.J. Kaufman, y R.E. Kellems. 1985. Identification of functional murine adenosine deaminase cDNA clones by complementation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260:10299–10307.
- Zaharatos, G.J., T. He, P. Lopez, W. Yu, J. Yu, y L. Zhang. 2004. alpha-defensins released into stimulated CD8+ T-cell supernatants are likely derived from residual granulocytes within the irradiated allogeneic peripheral blood mononuclear cells used as feeders. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 36:993–1005.
- Zapata, W., B. Rodriguez, J. Weber, H. Estrada, M.E. Quiñones-Mateu, P.A. Zimmerman, M.M. Lederman, y M.T. Rugeles. 2008. Increased levels of human beta-defensins mRNA in sexually HIV-1 exposed but uninfected individuals. *Curr. HIV Res.* 6:531–538.
- Zeng, M., P.J. Southern, C.S. Reilly, G.J. Beilman, J.G. Chipman, T.W. Schacker, y A.T. Haase. 2012. Lymphoid Tissue Damage in HIV-1 Infection Depletes Naïve T Cells and Limits T Cell Reconstitution after Antiretroviral Therapy. *PLoS Pathog.* 8:e1002437.
- Zhang, F., W. Gu, M.E. Hurler, y J.R. Lupski. 2009. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 10:451–481.
- Zhang, L., P. Lopez, T. He, W. Yu, y D.D. Ho. 2004. Retraction of an interpretation. *Science.* 303:467.
- Zhang, L., W. Yu, T. He, J. Yu, R.E. Caffrey, E.A. Dalmasso, S. Fu, T. Pham, J. Mei, J.J. Ho, W. Zhang, P. Lopez, y D.D. Ho. 2002. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science.* 298:995–1000.
- Zhang, Y., W. Lu, y M. Hong. 2010. The membrane-bound structure and topology of a human α -defensin indicate a dimer pore mechanism for membrane disruption. *Biochemistry.* 49:9770–9782.

Bibliografia

Zhong, J., X. Rao, J. Deiluiis, Z. Braunstein, V. Narula, J. Hazey, D. Mikami, B. Needleman, A. Satoskar, y S. Rajagopalan. 2012. A Potential Role for Dendritic Cell/Macrophage-Expressing DPP4 in Obesity-Induced Visceral Inflammation. *Diabetes*.

Zhu, J., y W.E. Paul. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 112:1557–1569.

Zhu, J., H. Yamane, y W.E. Paul. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu. Rev. Immunol.* 28:445–489.

Zhu, S. 2008. Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CSalphabeta defensins. *Mol. Immunol.* 45:828–838.

Zhu, Y., S. Yao, y L. Chen. 2011. Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity*. 34:466–478.