

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra buněčné biologie



Bakalářská práce

Petra Votavová

Efekt IL-15/IL-15R α komplexu na NK buňky a T buňky

The effect of IL-15/IL-15R α complex on NK and T cells

Vedoucí práce: RNDr. Marek Kovář Ph.D.

Laboratoř nádorové imunologie
Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.

Praha 2009

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně s použitím uvedených zdrojů, a souhlasím s jejím eventuálním zveřejněním v tištěné nebo elektronické podobě.

V Praze dne 27. dubna 2009

.....
Votavová Petra

Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Marku Kovářovi, Ph.D. za pomoc při psaní této práce, ochotu a trpělivost při konzultacích.

Obsah

Abstrakt.....	4
Klíčová slova.....	4
Seznam zkratk.....	5
Úvod.....	6
1. Interleukin 15.....	7
1.1. Existují dvě izoformy interleukinu 15 – sekretovaný a intracelulární.....	7
1.2. Kontrola exprese IL-15.....	9
1.3. IL-15 receptor.....	10
2. IL-15R α	11
3. Signalizační mechanismy.....	12
3.1. Transprezentace.....	14
4. Solubilní forma IL-15R α	16
5. IL-15R α mediovaná sekrece IL-15.....	17
6. Biologické funkce IL-15 a IL-15R α	19
6.1. Transprezentace IL-15 je esenciální pro vývoj, homeostázu a funkci NK a NKT buněk.....	20
6.2. IL-15 reguluje homeostatickou proliferaci paměťových CD8 ⁺ T lymfocytů.....	21
7. IL-15/IL-15R α komplexy jako superagonistická forma IL-15.....	22
7.1. Komplexy fúzované s Fc.....	23
7.2. Fúzní komplexy.....	26
7.3. Srovnání vlastností komplexu hIL-15/IL-15R α -Fc a fúzního proteinu hIL-15/IL-15R α -sushi.....	26
8. Potencionální využití IL-15/IL-15R α komplexů v imunoterapii.....	26
8.1. Léčba HIV.....	27
8.2. IL-15 jako adjuvans.....	27
8.3. Transplantace kostní dřeně.....	28
8.4. Imunoterapie nádorů.....	28
8.4.1. Transprezentace IL-15/sIL-15R α nádorovými buňkami a inhibice nádorového růstu.....	29
9. Závěr.....	30
10. Použitá literatura.....	31

Abstrakt

Vztah interleukinu 15 a jeho vysokoafinitního receptoru IL-15R α je značně provázaný. IL-15 tvoří s IL-15R α komplex IL-15/IL-15R α . Tak IL-15R α zprostředkovává působení IL-15 na rezponzivní buňky, moduluje jeho expresi a podílí se na IL-15 sekreci. Interleukin 15 má řadu důležitých imunologických funkcí – je důležitým faktorem vývoje NK buněk, imunitních odpovědí, buněčného přežití a proliferace u mnoha buněčných typů a tkání. Nepostradatelný je zejména pro populace NK, NKT a paměťových CD8⁺ T buněk. IL-15/IL-15R α komplex je ve svých funkcích plně nahraditelný solubilními rekombinantními IL-15/IL-15R α -Fc komplexy, které se chovají jako IL-15 superagonista. V této práci jsem se zaměřila zejména na komplexy IL-15/IL-15R α , a to jak přirozeně se vyskytující, tak i rekombinantní. Díky výrazné potenciaci IL-15 efektů jsou nyní pro svoje lepší vlastnosti extenzivně testovány právě solubilní rekombinantní komplexy IL-15/IL-15R α -Fc, jejichž pozorované aktivity ve své bakalářské práci také popisuji. V závěru práce se pokouším nastínit některá možná budoucí využití těchto komplexů v imunoterapii.

Klíčová slova

Interleukin 15, IL-15/IL-15R α komplex, CD8⁺ T lymfocyty, NK buňky, trans-prezentace

Abstract

Current experimental evidences suggest that interactions of IL-15 with its high-affinity receptor IL-15R α are in very close relationship. IL-15R α binds IL-15 and forms IL-15/IL-15R α complex. In this way IL-15R α mediates IL-15 effect on IL-15 responding cells as well as IL-15 expression and secretion. Interleukin 15 has many unique functions in the immune system – it is an important factor for NK cell development, immune responses, cell survival and proliferation in many different cell types and tissues. IL-15 is indispensable especially for NK, NKT and memory phenotype CD8⁺ T cell populations. In my work, I focused on IL-15/IL-15R α complexes, both naturally occurring and recombinant. Most importantly, functions of IL-15/IL-15R α complexes can be completely replaced by soluble recombinant IL-15/IL-15R α -Fc complexes, which act as an IL-15 superagonist. These soluble recombinant IL-15/IL-15R α -Fc complexes show important biological activities and better qualities than soluble IL-15 alone. Thanks to their notable potentiating activities on IL-15 action these IL-15/IL-15R α -Fc complexes are currently extensively investigated. Finally, I tried to describe IL-15/IL-15R α -Fc complexes as promising tool for future application in immunotherapy.

Key words

Interleukin 15, IL-15/IL-15R α complex, CD8⁺ T lymphocytes, NK cells, trans-presentation

Seznam zkratek

AICD	aktivací-indukovaná buněčná smrt
Bcl-xL	anti-apoptický protein, člen rodiny Bcl-2 proteinů
Bcl-2	anti-apoptický protein
CD16	nízko afinní IgG Fc receptor (Fc γ RIII)
CD69	časný aktivační antigen
CD122	β řetězec receptoru pro interleukin-2 a interleukin-15
CD132	společný cytokinový receptorový řetězec γ_c
CD144	VE-cadherin, adhezivní molekula
CTCL	kožní lymfom T buněk
CTL	cytotoxický T lymfocyt
CTLL-2	myší cytotoxická T-buněčná linie z C57/Bl/6 inbredních myší
DC	dendritická buňka
ER	endoplasmatické retikulum
ERK	extracelulárně regulované kinázy
Fc	Fc fragment protilátky
GA	Golgiho aparát
G-CSF	faktor stimulující růst granulocytů
GM-CSF	faktor stimulující růst granulocytů a makrofágů
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli
$\gamma\delta$ T lymfocyty	subpopulace T lymfocytů s $\gamma\delta$ receptorem
HSCT	transplantace krvetvorných kmenových buněk
kDa	kilodalton
IEL	intestinální intraepiteliální lymfocyt
IFN-I	interferony typu I (α a β)
IFN- γ	interferon- γ
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IRF-E	interferon regulační faktor E
Jak	Janusova tyrosin kináza
Ki-67	proliferační marker
LPS	lipopolysacharid
MP	paměťového fenotypu
NF- κ B	jaderný faktor κ B
NK	přirozený zabíječ
NKT	subpopulace T-lymfocytů s některými vlastnostmi T i NK buněk
NLS	jaderný lokalizační signál
p38	MAP kináza
PC-3	lidská buněčná linie nádoru prostaty
Rac3	botulinum toxinový substrát 3 související s Ras
STAT	protein signální transdukce a aktivace transkripce
Syk	tyrosin kináza
TACE/ADAM17	TNF- α konvertující enzym, metalloproteáza
TLR	toll-like receptor
TNF- α	faktor nekrotizující nádory
Tyk 2	tyrosin kináza 2
TRAF-2	faktor 2 asociovaný s TNF receptorem
UTR	nepřekládaný region

Úvod

Molekulární imunologie se v nynější době těší velké pozornosti. Neboť spletité vztahy a komunikace mezi buňkami, provázané imunitní reakce vrozené a získané imunity při ochraně našeho těla proti cizím patogenům, nádorům a dalším onemocněním, to vše se realizuje až na úrovni molekul a molekulových komplexů. Klíčovým typem těchto molekul jsou cytokiny, ovlivňující a zajišťující nejen vývoj buněk a jejich komunikaci, ale také celkové systémové reakce. Cytokiny jsou imunomodulační látky glykoproteinové povahy, produkované širokým spektrem buněk v celém organismu. Jejich působení je zprostředkováno vazbou na specifický receptor, a tak je zajištěna jedinečnost jejich účinků v rámci organismu. Jedním z těchto cytokinů je interleukin 15, který hraje významnou roli v imunitním systému, a to jak v části vrozené, tak i získané imunity. Role interleukinu 15 jsou v organismu zprostředkovány zejména IL-15R α řetězcem, ke kterému se IL-15 s vysokou afinitou váže a tvoří komplex IL-15/IL-15R α .

Tato práce je literární rešerší, zabývající se strukturou, funkcí a biologickou aktivitou IL-15 na NK a T buňky, a to právě zejména ve formě komplexu IL-15/IL-15R α . Shrnuje role IL-15R α při trans-prezentaci IL-15, regulaci jeho exprese, sekrece a vlastního působení na jednotlivé buňky. Právě porozumění biologii tohoto cytokinu a znalost interakcí IL-15 s IL-15R α (včetně jeho solubilní formy) a následně interakci IL-15/IL-15R α komplexu s $\beta\gamma_c$ receptorem, totiž může poskytnout účinný nástroj k cílené selektivní modulaci některých složek imunitního systému a jeho funkcí. Dále je diskutována role solubilních rekombinantních IL-15/IL-15R α komplexů, superagonistických forem IL-15, které se ukázaly jako velmi potentní při působení na jednotlivé populace IL-15 responzivních buněk. Z tohoto hlediska je na závěr nastíněno další možné využití těchto komplexů v imunoterapii některých patologických stavů.

1. Interleukin 15

Interleukin 15 (IL-15), je 14-15 kDa velký glykoprotein, jenž patří svou terciální strukturou do rodiny cytokinů, obsahujících čtyři alfa-helixové domény [1]. Do této superrodiny patří také interleukin 2, IL-3, IL-7, IL-9, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) a granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF).

Svým pleiotropním působením hraje IL-15 významnou roli jak ve vrozené, tak i získané imunitní odpovědi na infekci, anti-tumorové odpovědi, alergii a autoimunitních chorobách. Podporuje aktivaci neutrofilů, makrofágů a je kritický pro funkci dendritických buněk [2]. Je důležitý pro vývoj, přežití a funkci NK buněk, NKT buněk a CD8⁺ T lymfocytů. Má anti-apoptické účinky na aktivované T a B lymfocyty, keratinocyty [3].

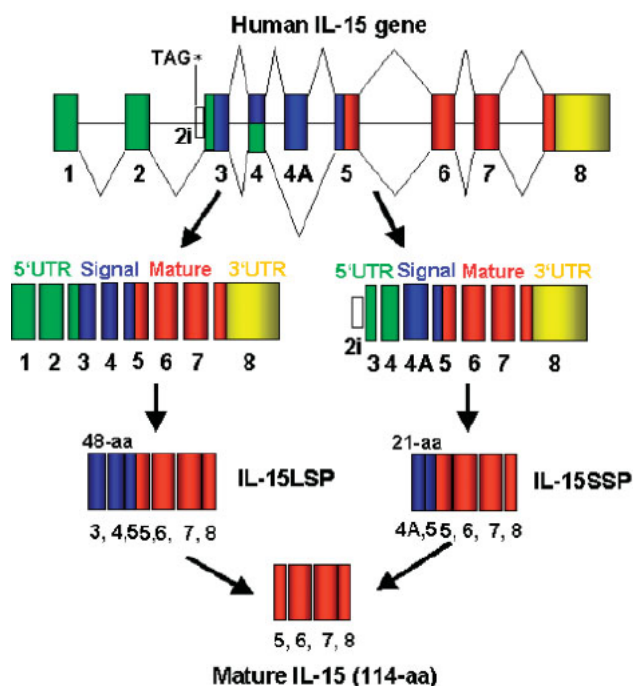
Dále má řadu imunoregulačních účinků, jimiž se zčásti překrývá s působením IL-2. Příkladem může být indukce T buněčné proliferace a chemotaxe, stimulace růstu NK buněk a produkce interferonu γ (IFN- γ), kostimulace B buněčného růstu a imunoglobulinové syntézy, tvorba cytotoxických efektorových buněk [4]. Naopak, při ovlivňování T-lymfocytárního vývoje a přežití *in vivo*, působí IL-2 a IL-15 opačně. Dlouhodobá přítomnost IL-2 se podílí na snižování počtu T lymfocytů, neboť trvalá expozice IL-2 způsobuje aktivací-indukovanou buněčnou smrt (AICD). Myši deficientní na IL-2 či IL-2 α trpí polyklonální lymfoproliferací, spolu s T-dependentní autoimunitou. Naproti tomu IL-15 může potlačovat AICD, navíc IL-15 či IL-15 α deficientní myši jeví lymfopénii [2].

Interleukin 15 je konstitutivně produkován velkým množstvím buněčných typů a tkání (např. keratinocyty, fibroblasty, monocyty, makrofágy, placentou, thymickým epitelem). K indukované expresi IL-15 mRNA makrofágy a dendritickými buňkami (DC, dendritic cell) dochází po setkání imunitního systému s konzervovanými bakteriálními motivy (složky bakteriálních stěn – LPS, virové nukleové kyseliny) [5], přičemž exprese IL-15 je komplexně regulována na mnoha úrovních.

1.1. Existují dvě izoformy interleukinu 15 – sekretovaný a intracelulární

Mezi savci vykazuje interleukin 15 vysoký stupeň sekvenční homologie (opičí IL-15 sdílí 97% homologie s lidským IL-15). Naopak, IL-15 nejeví sekvenční homologii s IL-2 ani s dalšími cytokiny své 4 alfa-helixové superrodiny. Je kódován genem (> 34 kb velkým), který je tvořen 9 exony a 8 introny (viz Obr.1). U člověka se tento gen nachází na chromozomu 4q31 a u myši v centrálním regionu chromozomu 8. Maturovaná forma IL-15 se skládá ze 114 aminokyselin, obsahuje dva cysteinové disulfidické můstky v pozicích Cys42-

Cys88 (obdobně jako IL-2) a Cys35-Cys85 a dále tři asparaginové zbytky, z nichž 2 jsou N-glykosylovány [6].



Obr. 1: Schématické zobrazení struktury genu lidského IL-15. Převzato z Paus et al., 2006.

Alternativním sestřihem jsou u člověka vytvářeny dvě izoformy IL-15, jež se liší pouze délkou svého signálního peptidu. Tento N-koncový signální peptid cílí izoformy do endoplazmatického retikula (ER), kde je nakonec po translokaci membránou ER odštěpen signálními peptidázami. Obě dvě izoformy vykazují odlišné způsoby intracelulární distribuce, intracelulárního pohybu a endozomální lokalizace. Taktéž sekrece IL-15 je izotypově specifická [7].

Kratší izoforma (IL-15SSP), obsahující 21 aminokyselin dlouhý leader peptid, zůstává v cytoplazmě, nebo je translokována do jádra, ale není sekretována. Její signální peptid je kódován exony 4a (119-nukleotidová sekvence vložená mezi exony 4 a 5) a 5 lidského IL-15 genu. IL-15SSP je produkována zejména tkání testis a thymu. Naopak izoforma s delším, 48 aminokyselin dlouhým leader peptidem (IL-15LSP), identifikovaná v Golgiho aparátu, časných endosomech a v endoplazmatickém retikulu, může být sekretována a/nebo vystavována na membráně. Leader peptid v IL-15LSP izoformě je tvořen třemi exony (exon 3, 4, 5) a funguje jako sekreční signální peptid, ale reguluje také míru translace. Tato forma je exprimována zejména tkáněmi kosterního svalstva, placentou, srdcem, plícemi, játry a ledvinami [8]. Oba signální peptidy sdílejí sekvenci 11 identických aminokyselin,

kódovaných exonem 5. K expresi kratší formy dochází na transkripční úrovni využitím alternativního promotoru a enhanceru v intronu 2 [9].

Jednou z funkcí nesekretované IL-15SSP izoformy, která vykazuje jadernou kolokalizaci se svým vysoce afinním receptorem IL-15R α , je autoregulace snižováním IL-15 genové transkripce.

U myši jsou alternativním splicingem variabilního exonu 5 vytvářeny nejméně dvě izoformy IL-15. Izoforma, obsahující alternativní exon 5 s odlišným 3' sestřihovým místem, vykazuje oproti ostatním (které jsou vytvářeny vnitřním sestřihem exonu 5), vyšší translační účinnost. Translační produkt alternativní izoformy postrádá hydrofóbní doménu v signální sekvenci svého leader peptidu, je tedy lokalizován intracelulárně, zatímco produkt kódovaný IL-15 mRNA s normálním exonem 5 může být sekretován [10].

Dalším mechanismem ovlivňujícím IL-15 sekreci je IL-15R α chaperonová sekretorická dráha, při níž vysokoafinní IL-15R α receptor kontroluje transport svého ligandu, jeho povrchovou expresi a sekreci [11]. Díky závislosti sekrece IL-15 na této dráze lze detekovat pouze velmi málo solubilního IL-15 v plasmě. Je to způsobeno formací IL-15/IL-15R α komplexu, jehož afinita je tak vysoká, že se vazba IL-15 stává téměř irreverzibilní [12].

1.2. Kontrola exprese IL-15

Regulace exprese IL-15 mRNA vykazuje mnoho odlišností od exprese IL-2, který je specificky produkován aktivovanými T-lymfocyty a jehož exprese je regulována zejména na úrovni mRNA transkripce a stabilizace. Přestože je IL-15 mRNA konstitutivně exprimována téměř všudypřítomně, je velmi těžké detekovat sekretovaný IL-15 protein v supernatantu kultury buněk, exprimujících IL-15 mRNA [13]. Je to dáno jak existencí dvou izoform proteinu IL-15 [10], tak komplexní regulací exprese tohoto cytokinu. Produkce interleukinu 15 je kontrolována mnoha faktory na úrovni transkripce, translace a vnitrobuněčného pohybu, přičemž se ukazuje, že dominantní postavení má regulace posttranskripční.

K up-regulaci produkce IL-15 monocytů dochází po jejich aktivaci LPS či IFN- γ , nebo po infekci monocytů herpesvirem 6, Mycobacterium Tuberculosis, Candidou Albicans a dalšími. V indukované up-regulaci transkripce se uplatňují 5' konzervované regulační motivy NF- κ B a IRF response element IRF-E [6]. U žírných buněk dochází k upregulaci IL-15/IL-15R α po stimulaci IFN-I, indukovanými stimulací TLRs přítomností LPS či jiných konzervovaných mikrobiálních motivů [14].

Mezi posttranskripční regulace tvorby proteinu IL-15 patří i mechanismy, které ve své podstatě způsobují odpojení translace a udržení netranslatované IL-15 mRNA v buňce. Tato netranslatovatelná mRNA, sloužící pravděpodobně jako zásobní pool pro rychlou produkci proteinu IL-15, může být po stimulaci imunitního systému intracelulární infekcí či jinými podněty modifikována na svou translatovatelnou formu a dochází k produkci proteinu IL-15.

Mezi tyto kontrolní elementy, jež odpojují translaci IL-15 mRNA, patří 5'netranslatovaný region (UTR) IL-15 mRNA, obsahující 12 upstream iniciačních translačních AUG kodonů u člověka (5 u myši). Dále proteinová sekvence signálního peptidu a C-konec maturovaného proteinu. Odstranění upstream AUG start kodonů vede k 10-15x zvýšené produkci IL-15. Delecí všech těchto kontrolních bodů se produkce IL-15 zvýší až 250krát [13].

1.3. IL-15 receptor

Cytokiny jako IL-15 vykazují pleiotropní a redundantní účinky při kontrole funkcí v mnoha buněčných typech, což je důsledek sdílení určitých receptorových podjednotek v rámci cytokinové rodiny. V souvislosti se strukturální homologií s cytokinem IL-2, sdílí IL-15R a IL-2R receptorové komponenty IL2/15R β (CD122) a IL-2R γ_c (γ_c ; CD132), které jsou po vazbě IL-2 nebo IL-15 zodpovědné za přenos signálu. Navíc, každý z těchto cytokinů obsahuje vlastní α -receptorový řetězec, který rozpoznává pouze svůj cytokin a tak zajišťuje ligandovou specifitu [15].

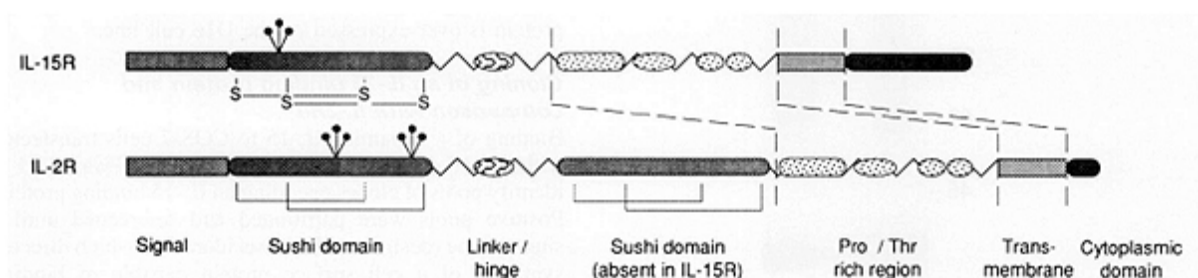
Lidský IL-2/15R β mRNA poskytuje primární translační produkt o délce 551 aminokyselin, obsahující 26-aa dlouhý signální peptid. Maturovaný lidský IL-2/15R β protein je tvořen 525 aminokyselinami, z nichž 214-aa tvoří extracelulární segment, 25-aa hydrofóbní transmembránovou doménu a 286 aminokyselin cytoplazmatickou doménu. Konstitutivně je exprimován NK buňkami a méně také monocyty a CD8⁺ T-lymfocyty.

Společný γ_c řetězec sdílí IL-15 také s IL-4, IL-7, IL-9 a IL-21 cytokiny. Lidský γ_c je tvořen 369 aminokyselinami, z nichž 22 připadá na signální peptid, 233-aa na extracelulární doménu, 28-aa na hydrofóbní transmembránovou doménu a 86-aa na C-terminální cytoplazmatickou doménu.

IL-2/15R β a γ_c řetězec mohou spolu s IL-15R α tvořit heterotrimerní receptor pro IL-15, ve kterém IL-15R α zvyšuje vazebnou afinitu intermediálně vazebného dimerického komplexu IL-2/15R $\beta\gamma_c$ (jehož $K_a = 10^9/M$) [6].

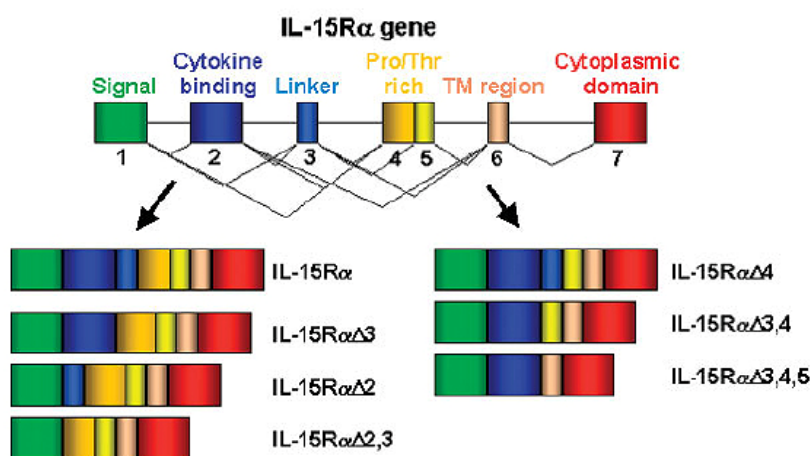
2. IL-15R α

IL-15R α a IL-2R α (CD25) řetězce sdílejí mnoho strukturních rysů (krátké cytoplazmatické domény, proline-threonin bohaté domény a hinge regiony, stejně jako konzervovaný extracelulární cytokin-vazebný motiv, nazývaný sushi doména. Oproti IL-2R α , který obsahuje dvě sushi domény však IL-15R α obsahuje pouze jednu. Dalším rozdílem je to, že IL-15R α má znatelně delší cytoplazmatickou doménu (37-aa) oproti IL-2R α , s délkou 11 aminokyselin. IL-15R α dále obsahuje 32 aminokyselinový signální peptid, 173-aa extracelulární doménu a 21 aminokyselin dlouhý transmembránový úsek (srovnání obou receptorových řetězců viz Obr.2).



Obr. 2: Strukturní srovnání IL-15R α a IL-2R α , na sushi doménách je naznačena N-glykosylace. Převzato z Giri et al., 1995.

IL-15 se váže na IL-15R α řetězec s vysokou afinitou i v absenci IL-2/15R β a γ_c řetězce. Tato afinita ($K_a = 10^{11}/M$) je 1000x vyšší než vazebná afinita samotného IL-2R α řetězce ($K_a = 10^8/M$), je však srovnatelná s afinitou heterotrimerního receptoru IL-2R pro IL-2 ($K_a = 10^{11}/M$). Také samotný komplex IL-2/15R β a γ_c řetězce je schopen vázat IL-15, i když s nižší afinitou ($K_a \approx 10^9/M$) [1].



Obr. 3: Schématické znázornění struktury genu lidského IL-15R α Převzato z Paus et al., 2006.

Gen pro IL-15R α se u člověka nachází na chromozomu 10 a u myši na chromozomu 2. Dosud bylo popsáno mnoho izoform IL-15R α , vznikajících alternativním splicingem 7 exonů IL-15R α genu, a to jak v lidském (Obr. 3), tak myším systému. Exon 2 obsahuje jaderný lokalizační signál (NLS) a kóduje sushi doménu receptoru. Isoforma s chybějícím exonem 2 je prakticky neschopná vazby IL-15 [16].

IL-15R α je exprimován velkým množstvím hematopoetických i nehematopoetických buněk a tkání, přičemž exprese jednotlivých izoform vykazuje tkáňovou specifitu. IL-15R α mRNA je exprimována například aktivovanými T a B lymfocyty, aktivovanými NK buňkami, NKT buňkami, makrofágy, dendritickými buňkami, stromálními buňkami thymu a kostní dřeně a v mnoha orgánech zahrnujících játra, srdce, slezinu, plíce a kosterní svastvo [17].

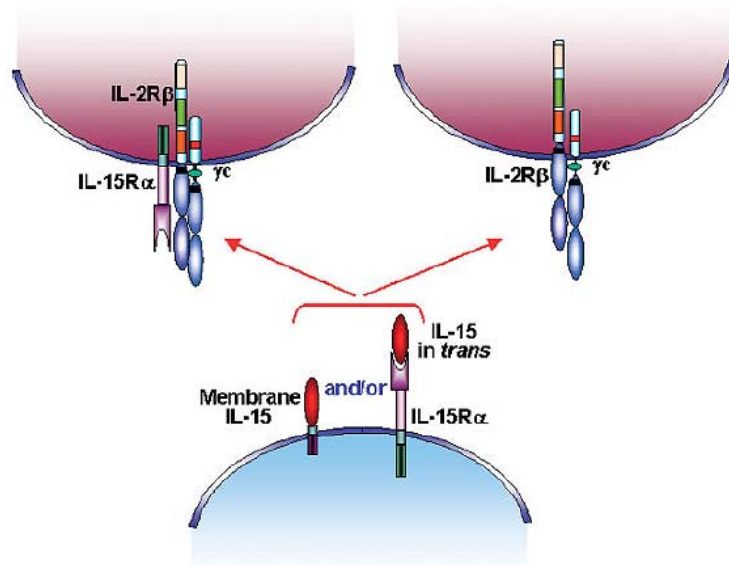
IL-15R α zprostředkovaná *trans*-prezentace IL-15 je hlavním signalizačním mechanismem, jakým IL-15R α působí *in vivo*, a je esenciální pro udržování lymfocytární homeostáze [18].

Žírné buňky a fibroblasty exprimují tři odlišné izoformy IL-15R α receptoru, přičemž výsledná signalizace není závislá na přítomnosti IL-15R β (tento receptorový řetězec dokonce na žírných buňkách není přítomen) ani γ_c řetězce. Všechny tyto izoformy jsou produkty alternativního splicingu IL-15R α genu a zahrnují delecí exonu 4; exonů 3 a 4 či exonů 3, 4 a 5. IL-15R α je tak schopen přenášet signál do buňky i bez formace heterotrimerního receptorového komplexu. Signalizace přes tento receptor zahrnuje Jak2/STAT5 (či Tyk2/STAT6) signalizační dráhu oproti Jak1/Jak3 a STAT5/STAT3 systému v aktivovaných T-lymfocytech. Interleukin 15 dále v žírných buňkách indukuje aktivaci Syk kináz, asociovaných s IL-15R α . Signalizace přes IL-15R α řetězec vede ve fibroblastech k rekruci TRAF-2 a NF- κ B aktivaci [19].

3. Signalizační mechanismy

Působení interleukinu 15 probíhá na mnoha úrovních – zahrnuje juxtakrinní (cell-to-cell contact, Obr. 4), intrakrinní (působení přímo v buňce) a reverzní signalizaci (signalizaci zpět do buňky). Téměř ve všech těchto procesech se uplatňuje IL-15R α , tvořící s IL-15 komplex IL-15/IL-15R α .

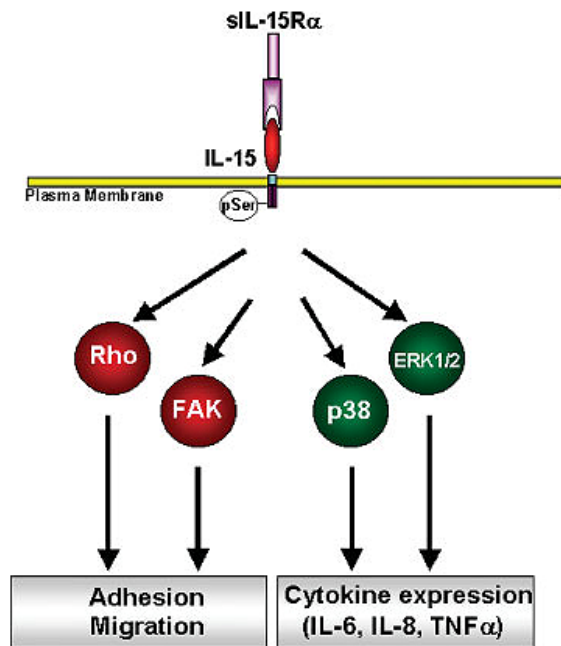
Ačkoli byl interleukin 15 zpočátku popsán jako solubilní molekula, je majoritně přítomen ve formě membránově vázané. IL-15 může být na membránu vázán přímo, anebo v komplexu s IL-15R α , a v obou případech působí juxtakrinně mezibuněčným kontaktem, jako součást imunologické synapse.



Obr.4: Znárodnění modelu juxtakrinní signalizace membránově vázaným IL-15 trimerním (vlevo nahoře), či dimerním IL-15 receptorovému komplexu (vpravo nahoře). Převezato z Bulfone-Paus et al., 2006.

Lidské monocyty exprimují transmembránový IL-15 (bez tvorby komplexu s IL-15R α) v různé míře, v závislosti na aktivaci IFN- γ . Tato biologicky aktivní forma membránově vázaného IL-15 se podílí na juxtakrinní, ale i reverzní signalizaci. Takto vázaný IL-15 se vyskytuje i u lidských epidermálních keratinocytů, fibroblastů, epiteliálních buněk a a PC-3 buněk (lidská linie karcinomu prostaty). Je pravděpodobné, že se u monocytů uplatňuje i forma IL-15 vázaného na IL-15R α .

Reverzní signalizace dovnitř buňky přes transmembránovou formu IL-15 zahrnuje v buňce, jež IL-15 vystavuje, aktivaci mnoha downstream signálních drah. Do těchto drah spadá například fosforylace ERK1/2 a p38 a dále indukce rodiny Rho malých GTPáz Rac3. Dále zvyšuje buněčnou adhezi a produkci prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-8, TNF α) monocyty a PC-3 buňkami (Obr.5) [17].



Obr. 5: Model reverzní signalizace, indukované přes membránově vázaný IL-15. Převzato z Bulfone-Paus et al., 2006.

3.1. Transprezentace

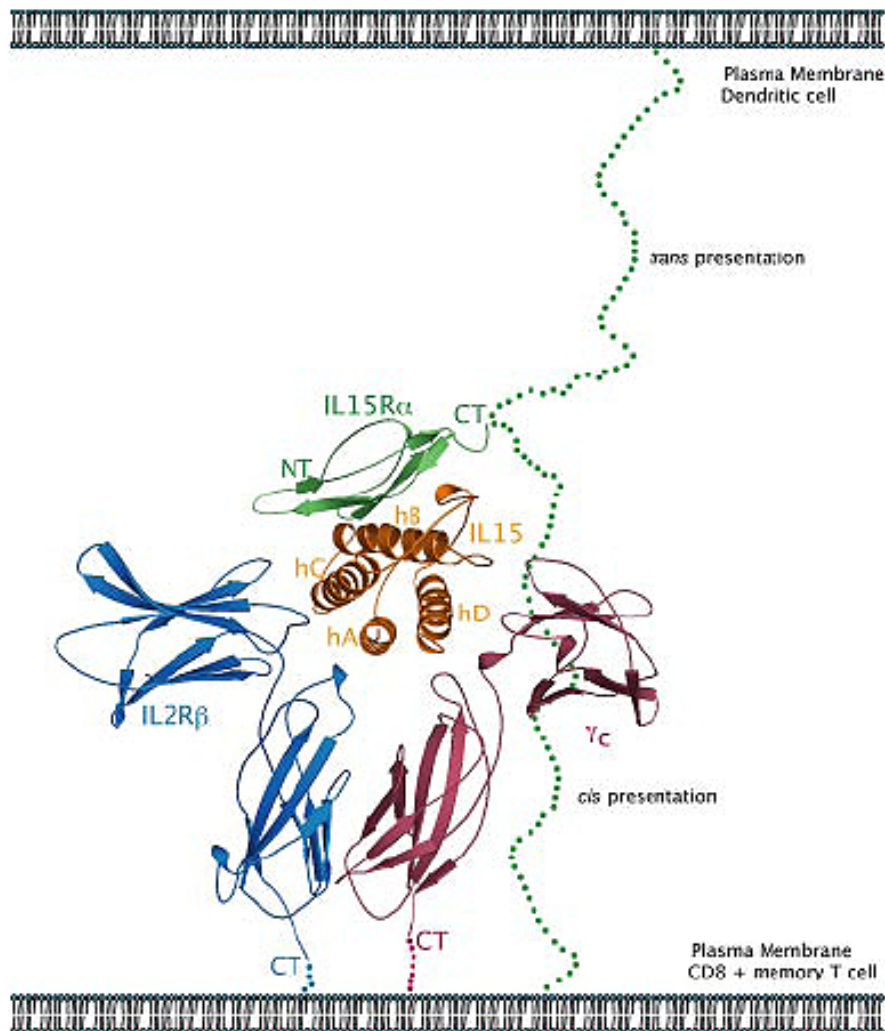
Majoritní způsob juxtakrinní signalizace představuje *trans*-prezentace. Při ní funguje vysokoafinitní receptor IL-15R α jako *trans*-prezentační molekula, tvořící s IL-15 stabilní, membránově vázaný IL-15R α /IL-15 komplex. Tento komplex je prezentován okolním buňkám, nesoucím na svém povrchu IL-15 $\beta\gamma_c$ receptor [20]. Transprezentovaný IL-15 poskytuje dlouhodobější a silnější signalizaci responzivním buňkám, než solubilní IL-15 [21].

Například makrofágy, monocyty a dendritické buňky exprimují stabilní IL-15R α /IL-15 komplex na svém povrchu a transprezentují ho IL-15R $\beta\gamma_c$ receptoru na povrchu CD8⁺ T lymfocytů, NK a NKT buněk. Senzitivita k IL-15 signálům je v přímém vztahu s mírou exprese IL-15R β na responzivních buňkách; avšak exprese IL-15R α těmito buňkami není nezbytná, nezvyšuje vnímavost k působení transprezentovaného IL-15.

Takto prezentovaný IL-15 spouští přes $\beta\gamma_c$ receptor signalizační dráhy, vedoucí k aktivaci JAK1/JAK3 a následně fosforylaci STAT5 a/nebo STAT3, které vedou k proliferaci a maturaci buněk. K formaci komplexu dochází intracelulárně, stabilně je na membráně udržován *trans*-endozomální internalizací, recyklací a znovuvystavením na membráně. *Trans*-prezentace tudíž pochopitelně vyžaduje současnou expresi IL-15 a IL-15R α prezentujícími buňkami [20].

IL-15 se taktéž může vázat na IL-15R α pozitivní buňky (tyto buňky však nutně nemusí být zároveň producenty IL-15), jak dokazuje studie skupiny Sato et al. (2007). Tyto buňky postupně komplexy internalizují, ale nedegradují a následně je opět vystavují na membráně, či

v menším množství vypouští volný IL-15 do supernatantu. Ukazuje se, že IL-15R α /IL-15 komplexy jsou rezistentní k degradaci během endozomální recyklace, čímž je zajištěn intracelulární rezervoár IL-15, který tak může sloužit jako perzistentní *in vivo* faktor, který je oproti ostatním cytokinům odolný renální filtraci [21].



Obr. 6: Model IL-15 kvarternárního komplexu s naznačenou *trans* i *cis* prezentací. IL-15 je zbarveno oranžově, IL-15R α zeleně, IL-15R β modře a γ_c růžově. Převzato z Olsen et al., 2007.

Nyní se ukazuje, že je díky vysoké flexibilitě IL-15R α řetězce možná i *cis* IL-15 prezentace. Při ní může IL-15 pomocí membránově vázaného IL-15R α interagovat s IL-15 $\beta\gamma_c$ receptorem na povrchu téže buňky. Tento způsob signalizace je umožněn nebývalou flexibilitou C-konce IL-15R α ektodomény, tedy 32-aa linkerem a/nebo 74-aa PT regionem. Díky tomu leží C-konec IL-15R α v rovině téměř rovnoběžné s plazmatickou membránou a IL-15 může být prezentován i v *cis*. Strukturální a biochemické analýzy ukázaly, že orientace IL-15 a jeho receptorových komponent ve styčné ploše kvaternárního komplexu je stejná při

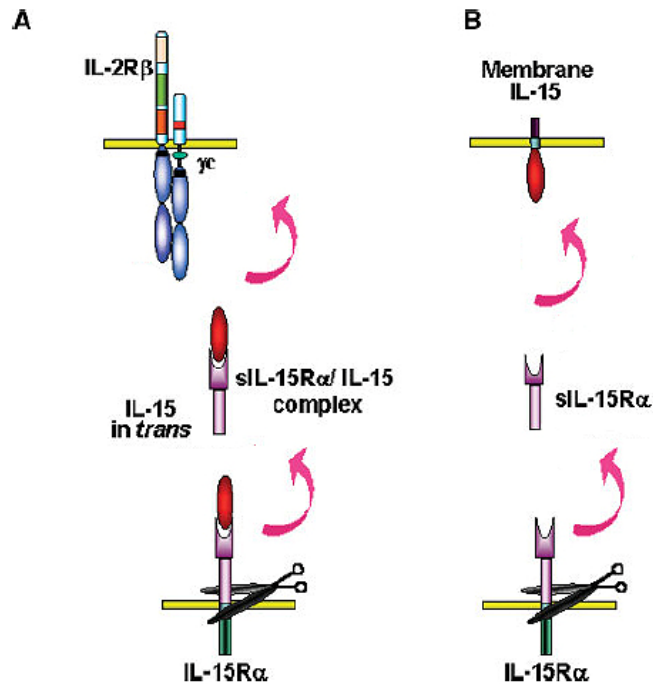
trans i *cis* prezentaci. Podle tohoto modelu, slouží PT region IL-15R α k oddálení IL-15 vazebné sushi domény od membrány natolik, aby mohlo být IL-15 úspěšně prezentováno IL-15 $\beta\gamma_c$ receptoru. O tom, jakým způsobem bude IL-15 prezentováno, rozhoduje právě konformace zaujatá spojovacím regionem N-terminální části PT regionu (Obr. 6) [22].

4. Solubilní forma IL-15R α

IL-15R α existuje nejen v membránové, ale i v solubilní formě (sIL-15R α ; myši \approx 30 kDa, lidský \approx 42 kDa), podobně jako další cytokinové receptory (například sIL-4R, sIL-6R). Obě formy vykazují shodnou afinitu pro IL-15 ($K_a = 10^{11}/M$). Solubilní formy lidského IL-15R α jsou výsledkem definovaného štěpení receptorů z buněčného povrchu matrixovými metalloproteinázami – TACE (tumor necrosis factor-alpha-converting enzym; = ADAM17).

Rekombinantní solubilní sushi doména, která nese většinu vazebné afinity pro IL-15 (avšak její afinita k IL-15 je o něco nižší, než afinita sIL-15R α , což je způsobeno ztrátou exonu 3), se chová jako silný IL-15 agonista. Komplex sIL-15R α -sushi/IL-15 kooperativně zvyšuje vazebné a biologické efekty IL-15 (proliferaci a protekci před apoptózou) zvýšením afinity k IL-15R $\beta\gamma_c$ heterodimeru. Přirozené sIL-15R α -sushi domény, vyskytující se zřejmě jako produkty alternativního splicingu IL-15R α genu (izoformy s chybějícími exony 3,4,5; postrádající transmembránové domény), jsou pravděpodobně zahrnuty v IL-15 signalizaci [16].

Bulfone-Paus et al. (2006) uvažují další možný model působení sIL-15R α . Dle této hypotézy může TACE/ADAM17 proteináza štěpit membránové formy receptoru vázané s trans-prezentovaným IL-15 a vytvářet tak solubilní komplexy IL-15R α /IL-15, které mohou spouštět signální kaskády vazbou na IL-15 receptorové komplexy (Obr. 7A). Tento model je potvrzen skupinou Duitman et al. (2008) jako majoritní způsob IL-15 sekrece. Bulfone-paus et al. (2006) zároveň uvažují, že sIL-15R α vazbou na membránovou formu IL-15 může zprostředkovat reverzní signalizaci (Obr. 7B) [17].



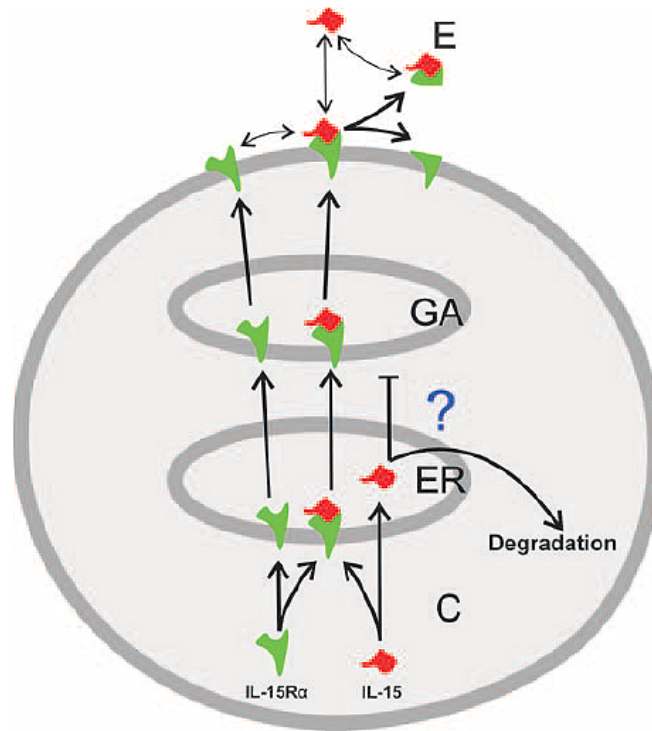
Obr.7: Navrhovaný model působení samotného sIL-15R α , či v komplexu s IL-15. K odstřížení dochází proteolytickým štěpením zprostředkovaným TACE/ADAM17. A: Vypuštění sIL-15R α /IL-15 komplexů do cirkulace a signalizace vazbou na receptor. B: Reverzní signalizace zprostředkovaná sIL-15R α . Převzato z Bulfone-Paus et al., 2006.

5. IL-15R α mediovaná sekrece IL-15

IL-15R α má kromě své hlavní role v signální transdukci roli také v regulaci transportu IL-15 a jeho povrchové expresi a esenciální je zejména pro sekreci IL-15 klasickou cestou, zahrnující průchod endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem. Celý proces probíhá pravděpodobně takto: IL-15 je svým signálním peptidem cílen do ER, do něhož translokuje nezávisle na IL-15R α , avšak pro jeho další cestu na membránu je již přítomnost IL-15R α nutná. V přítomnosti svého vysokoafinního receptoru se IL-15 váže do jeho sushi domény a vytváří s ním komplex IL-15R α /IL-15. Ten je dále transportován přes Golgiho aparát a nakonec je translokován na membránu obvyklým mechanismem, jako ostatní membránové proteiny.

Duitman et al. (2008) dále prokazují, že sekrece IL-15 monocyty je mediována proteolytickým štěpením membránově lokalizovaných IL-15R α /IL-15 komplexů pomocí matrixových metalloproteináz, jak bylo popsáno výše. Tak vznikají sekretované IL-15R α /IL-15 komplexy, které díky vysoké afinitě IL-15R α k IL-15 nedisociují a tudíž neustí v sekreci samotného IL-15 [11]. Tyto komplexy mohou působit parakrinním způsobem

na buňky nesoucí IL-15R β / γ_c [17]. Shrnutí tohoto modelu, předkládaného Duitmanem et al., poskytuje Obr.8.



Obr.8: Model intracelulárního traffickingu a IL-15R α -dependetní sekretorické cesty IL-15. C: cytoplazma, ER: endoplazmatické retikulum, GA: Golgiho aparát, E: extracelulární prostředí. Převzato z Duitman et al. 2008.

Nicméně vyvstává otázka, jaký další způsob sekrece IL-15 se uplatňuje u monocytů, keratinocytů a například PC-3 buněk, které nesou na svém povrchu formu membránově vázaného IL-15 (nezávisle na IL-15R α). Tento prozatím neobjasněný mechanismus ústí v sekreci samotného IL-15 [11].

Na závěr se dá shrnout, že sekrece IL-15 klasickou cestou je závislá na koexpresi IL-15R α a formaci komplexu IL-15R α /IL-15. Regulace exprese IL-15R α tak poskytuje jeden z hlavních mechanismů kontroly sekrece IL-15. Zajímavé výsledky poskytl pokus provedený skupinou Duitman et al. na PC-3 buňkách, jež exprimují membránově vázaný IL-15 (ne však IL-15R α). Transfekce těchto buněk IL-15R α indukovala sekreci IL-15 do supernatantu, což ukazuje na další způsob regulace exprese IL-15, a to samotným IL-15R α v buňce. K přirozené up-regulaci syntézy IL-15 a jeho vysokoafinního receptoru IL-15R α dochází působením IFN- γ na monocyty a makrofágy, což ve výsledku ústí ve zvýšenou hladinu IL-15/IL-15R α na povrchu těchto buněk [11].

6. Biologické funkce IL-15 a IL-15 R α

Důležité funkce IL-15R α a IL-15 *in vivo* byly poprvé prokázány u IL-15R $\alpha^{-/-}$ a IL-15 $^{-/-}$ myši. Tyto myši mají normální délku života, normální orgánovou histologii a normální vývoj makrofágů, granulocytů, B a CD4 $^{+}$ T lymfocytů. Zato však vykazují snížené množství celkového počtu CD8 $^{+}$ T lymfocytů a jsou deficientní v populaci paměťových CD8 $^{+}$ T buněk (CD8 $^{+}$ CD44 hi CD122 hi), NK buněk, NK/T buněk a některých podskupin intraepiteliálních lymfocytů (IEL). Příčinou deficiencie je pravděpodobně to, že IL-15 syntetizované u IL-15R $\alpha^{-/-}$ myši nemůže opustit cytoplazmu.

Navíc, prezentace a působení IL-15 se ukazuje být silně závislé na formaci komplexu s IL-15R α . IL-15R α exprese ostatními buněčnými typy je klíčová pro působení IL-15, neboť transprezentace IL-15 je hlavním mechanismem IL-15 zprostředkovaného vývoje těchto buněčných populací [23,24]. U těchto myši nedochází k projevům lymfoproliferace ani autoimunity.

Naopak IL-15 transgenní myši, konstitutivně exprimující vysokou nefyziologickou hladinu IL-15, mají zvýšený počet periferních NK, NKT a CD44 hi CD8 $^{+}$ buněk, avšak normální počet CD4 $^{+}$ T lymfocytů. Dále vykazují zvýšenou antibakteriální a protinádorovou aktivitu, která je potlačena deplecí CD8 $^{+}$ T buněk. Shrnutí důsledků defektní či zvýšené exprese IL-15 a IL-15R α je v tabulce 1 [2].

	IL-15 $^{-/-}$ mice	IL-15R $\alpha^{-/-}$ mice	IL-15 transgenic mice
Thymic cellularity	Normal	Deficiency in single-positive CD8 $^{+}$ T cells	Increased
CD8 $^{+}$ T cells	Decreased (primarily CD44 hi CD122 hi memory cells)	Decreased (primarily CD44 hi CD122 hi memory cells)	Increased (primarily CD44 hi CD122 hi memory cells)
CD4 $^{+}$ T cells	Normal	Normal	Normal
B cells	Normal	Normal	NA
NK cells	Absent	Absent	Increased
NKT cells	Decreased	Decreased	Increased
$\gamma\delta$ T cells	Decreased	Decreased	Increased
Response to infection	Increased susceptibility	ND	Increased resistance
Response to tumor challenge	ND	ND	Increased survival

NA, not applicable; ND, no data available.

Tabulka 1. Biologické důsledky defektní či zvýšené exprese IL-15 či IL-15R α . Převzato z Diab et al. 2005.

Biologická dostupnost IL-15 reguluje homeostatické množství paměťových CD8 $^{+}$ T a některých podskupin IEL lymfocytů, NK a NKT buněk, přítomných aktuálně v organismu [18].

6.1. Transprezentace IL-15 je esenciální pro vývoj, homeostázu a funkci NK a NKT buněk.

NK buňky (natural killer) jsou efektorové buňky přirozené imunity, rozpoznávající buňky se sníženou expresí MHC-I glykoproteinů. Tyto cytotoxické lymfocyty zprostředkovávají rychlou imunitní odpověď na virové infekce a hrají významnou roli v rozpoznávání a odstraňování nádorových buněk. NKT buňky sdílejí vlastnosti T lymfocytů i NK buněk a rozpoznávají CD1d molekuly s navázanými ligandy.

Neaktivované NK a NKT buňky konstitutivně exprimují IL-15R α , CD122 a γ_c receptor. Vysoká hladina exprese IL-2/15R β spolu s γ_c řetězcem, kontrolujícím intracelulární signalizaci, je nezbytná pro rozpoznání, vazbu a působení membránově vázaného IL-15, transprezentovaného zejména dendritickými buňkami, a to i v pikomolárních koncentracích. Absenci těchto populací můžeme pozorovat u myši deficientních na IL-15, IL-15R α a IL-2/15R β γ_c , zatímco fenotypově a funkčně normální NK buňky se nacházejí u myši IL-2 a IL-7 deficientních. Přestože exprese IL-2 i IL-7 je postačující pro maturaci NK buněčných progenitorů, IL-15 je mnohem efektivnější při indukcii diferenciace progenitorů kostní dřeně na NK buňky [6]. Pro vývoj a maturaci NK a NKT buněk je důležitá exprese IL-15 a IL-15R α parenchymálními a hlavně také hematopoetickými buňkami [24].

Stimulace dendritických buněk přes TLR receptory (například bakteriálním LPS či syntetickým polyI:C) a přítomnost IFN-I vede ke zvýšené expresi membránově vázaného IL-15/IL-15R α a také zvýšené sekreci těchto komplexů do séra. Přítomnost membránově vázaných IL-15 komplexů je také nutná pro vyvinutí efektorových funkcí u NK buněk jak *in vitro*, tak *in vivo* [25]. Avšak dle skupiny Mortier et al. (2008) jsou solubilní IL-15 komplexy, vznikající odstřížením z membrány, prakticky neschopné aktivovat NK buňky k produkci IFN- γ a granzymu B, což indikuje nutnost mezibuněčného kontaktu NK a DC buňky. Model aktivace NK buněk tedy zahrnuje přímý mezibuněčný kontakt DC a NK buňky při transprezentaci IL-15, který se velmi podobá imunologické synapsi, vysoce organizované formě mezibuněčného kontaktu, při kterém dochází k aktivaci naivních T lymfocytů dendritickými buňkami [25].

IL-15/IL-15R α systém funguje jako reostat, regulující odlišné aspekty NK působení. Konstitutivní exprese IL-15/IL-15R α komplexů je vyžadována pro přežití, zatímco IFN-I indukovaná exprese těchto komplexů na povrchu DC je nepostradatelná pro vyvinutí efektorových funkcí u NK buněk. Vyvinutí účinné antimikrobiální NK mediované imunitní odpovědi na virové a bakteriální infekce tak vyžaduje interakci NK buněk s CD11^{high} DC v sekundárních lymfoidních orgánech [14].

In vitro experimenty na myších modelech provedené Huntingtonem et al. (2008) ukazují, že pouze lidský hIL-15 kombinovaný s lidským hIL-15R α -Fc ve formě imunokomplexu, je schopný vyvolat silnou proliferaci lidských NK buněk. Oproti tomu myší mIL-15, ač kombinovaný s lidským hIL-15R α -Fc, nemá na proliferaci lidských NK buněk žádný efekt. Podobně pouze lidské myeloidní buňky jsou schopny indukovat proliferaci lidských NK buněk *in vitro* [26].

6.2. IL-15 reguluje homeostatickou proliferaci paměťových CD8⁺ T lymfocytů

Současná exprese IL-15R α a IL-15 na mnoha buněčných typech je esenciální pro vývoj a homeostázu paměťových CD8⁺ T lymfocytů [18]. Bazální proliferace a udržování paměťových CD8⁺ T lymfocytů je zajištěna zejména transprezentací hematopoetickými buňkami a pro vývoj $\gamma\delta$ T intraepiteliálních lymfocytů (IEL) jsou důležité intestinální epiteliální buňky. Přítomnost IL-15 není vyžadována pro thymický vývoj CD8⁺ T lymfocytů, zato trans-prezentace IL-15 parenchymálními buňkami a buňkami kostní dřeně se podílí na homeostatickém udržení populace naivních CD8⁺ T lymfocytů [24]. Transprezentace je vyžadována pro bazální proliferaci a udržení antigen-specifických paměťových CD8⁺ T buněk [27]. Senzitivita CD8⁺ T lymfocytů a $\gamma\delta$ T buněk k IL-15 signálu je ve vztahu s jejich vysokou hladinou exprese CD122 [18]. Exprese CD122 je regulována dvěma T-box transkripčními faktory, T-bet a Eomes, jejichž zvýšená exprese je indukována v naivních CD8⁺ T lymfocytech po aktivaci a diferenciaci na efektorové a paměťové CD8⁺ T buňky [28]. Avšak exprese IL-15R α paměťovými CD8⁺ T lymfocyty není nezbytná pro jejich utváření a udržení, čímž je zpochybněn model podpory těchto buněk vazbou solubilního IL-15 k vysokoafinnímu IL-15 $\alpha\beta\gamma_c$ receptoru na jejich povrchu [27]. Nicméně, diferenciované paměťové CD8⁺ T lymfocyty mohou exprimovat IL-15R α na svém povrchu a odpovídat na solubilní IL-15 pravděpodobně odlišnými signálními drahami oproti těm, spouštěným membránovým IL-15. Membránově vázané IL-15R α /IL-15 komplexy vedou v responzivních buňkách k dlouhodobější signalizaci oproti signalizaci vazbou solubilního IL-15 [21].

Konstitutivní existence membránově vázaného IL-15R α /IL-15 komplexu v určitých tkáních (např. plíce a lymfatické uzliny) pravděpodobně umožňuje přežívání paměťových CD8⁺ T buněk během kontrakční fáze, kdy jsou tyto buňky silně závislé na IL-15. Proto jsou tato místa vstupu cizích antigenů preferenčně obývána dlouhožijícími paměťovými CD8⁺ T lymfocyty. Tyto minimální, zato dlouhotrvající IL-15 signály, jsou nutné pro homeostatickou proliferaci a dlouhodobé přežití CD8⁺ T lymfocytů mimo primární a sekundární lymfoidní orgány. Po stimulaci TLRs (toll-like receptory) imunitního systému např. LPS, dochází

k přechodně zvýšené expresi IL-15/IL-15R α komplexů některými buňkami (například DC, aktivovanými makrofágy) v sekundárních lymfoidních orgánech (slezina, lymfatické uzliny), což indukuje proliferaci paměťových CD8⁺ T lymfocytů [21].

7. IL-15/IL-15R α komplexy jako superagonistická forma IL-15

Juxtakrinní a revezní signální procesy, charakterizující IL-15/IL-15R α systém, odkrývají jeho plasticitu. Nejpodstatnější tři mechanismy zahrnují interakci mezi solubilním ligandem a membránově vázaným receptorem, interakci membránově vázaného ligandu i jeho receptoru a nakonec stimulaci membránového IL-15 jeho solubilním ligandem. Zároveň je podstatné to, že solubilní IL-15/IL-15R α komplexy mohou působit nejen lokálně, ale i parakrinně či endokrinně (systemicky) a současně ovlivňovat podstatu a/nebo délku trvání signálních procesů a dostupnost IL-15.

Znalost všech těchto interakcí IL-15 s IL-15R α (včetně jeho solubilní formy), poskytuje účinný nástroj k manipulaci s imunitním systémem *in vivo*. V léčbě autoimunitních chorob, onkologii a vakcinaci by účinná blokáce či potenciace efektů IL-15 mohla mít významný terapeutický efekt. Podání IL-15 vede k posílení imunitních odpovědí a podpoře rekonstituce imunitního systému. Zesiluje ochranu před mnoha infekcemi a zvyšuje účinnost vakcinace. IL-15 terapie stimuluje anti-HIV imunitu a zvyšuje přežívání CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů získaných od HIV pacientů *in vitro*. IL-15 může zrychlit obnovení imunitního systému po transplantaci kostní dřeně. Společně s chemoterapií či adoptivním transferem nádorově-reaktivních CD8⁺ T lymfocytů vede IL-15 terapie k delšímu přežití jedinců či úplné regresi nádoru v mnoho myších nádorových modelech [2].

Pozorované efekty IL-15R α se mnohdy liší. Například skupina Rückert et al. (2005) dokládá svými výsledky to, že aplikace solubilního rekombinantního IL-15R α do myši potlačuje NK buněčnou proliferaci a některé na T-lymfocytech založené imunitní odpovědi *in vivo* a blokuje reakce buněčných linií na IL-15 *in vitro* [29,30]. Rubinsten et al. (2006) ukázali, že tento zdánlivě antagonistický efekt solubilního rekombinantního IL-15R α byl způsoben použitím IL-15 a IL-15R α z jiných živočišných druhů. A naopak dále prokazují, že komplexy IL-15/IL-15R α mají podstatně vyšší aktivitu než samotný IL-15 jak *in vitro*, tak *in vivo*, tzn., chovají se jako IL-15 superagonista [31]. Tyto strukturální rozdíly potvrzují Olsen et al., kteří ve své krystalografické studii myšičího a lidského IL-15 odhalují jejich odlišné relativní orientace helixu B (IL-15R α vazebné místo) k helixům A, C a D (IL-15R $\beta\gamma_c$ vazebné místo) [22].

Protože efektivita působení podaného IL-15 může být limitována dostupností volného IL-15R α , které je esenciální pro jeho prezentaci buněčným subtypům, nesoucím na povrchu IL-15R $\beta\gamma_c$, je výhodné podat současně i tento vysokoafinní IL-15R α [32]. Tak se pro potenciaci IL-15 účinků *in vitro* a hlavně také *in vivo* ukázaly jako velmi potentní solubilní IL-15/IL-15R α komplexy, které také zvyšují biologickou dostupnost IL-15 a jeho poločas v séru. Mechanismus působení těchto imunokomplexů velmi pravděpodobně zahrnuje prezentaci IL-15 buněčným populacím CD8⁺ T lymfocytů, NK a NKT buněk. Tyto komplexy jsou nyní dále modifikovány, čímž je zajištěna modulace jejich efektivity a vyšší účinnost při působení na jednotlivé subtypy buněk. Několik takových už bylo navrženo a prozkoumáno, charakteristika několika z nich je shrnuta níže.

7.1. Komplexy fúzované s Fc

Solubilní komplexy IL-15/IL-15R α mají mnohem vyšší stimulační efekt než IL-15 samotný, a to jak *in vitro*, tak především *in vivo*. Komplexy sIL-15R α -Fc/IL-15 mají delší poločas eliminace v *in vivo* systému oproti IL-15. Stoklasek et al. (2006) mluví až o 20-násobném prodloužení poločasu eliminace IL-15 v séru [32]. Z hlediska vyššího poločasu v séru se využívá myší sIL-15R α kovalentně připojený k Fc části lidského IgG1 (sIL-15R α -Fc) [31]. Stejně efekty jako IgG1 má i použití Fc částí lidského IgG2 a IgG3, naopak konstrukt s lidským fragmentem IgG4 je nefunkční ve smyslu stimulace proliferace NK buněk *in vitro* [33].

Rubinstein et al. (2006) ve svých výsledcích dokazují superagonistické působení komplexů, vznikajících vazbou solubilního lidského IL-15 k solubilnímu myšimu IL-15R α -Fc konstruktu. Pravděpodobný mechanismus působení IL-15/IL-15R α -Fc formulují takto: vazba IL-15 k IL-15R α -Fc indukuje v molekule IL-15 konformační změnu, zvyšující interakci s $\beta\gamma_c$ receptorem a tím mění cytokin v superagonistu. Navíc, výrazné prodloužení poločasu eliminace dále zvyšuje rozdíl mezi aktivitou volného IL-15 a IL-15 asociovaného s IL-15R α -Fc. Preasociace komplexů s IL-15 ukázala zvýšený efekt na proliferaci, oproti současnému podání IL-15 a IL-15R α -Fc [31]. *In vitro* testy zatím neukázaly závislost komplexů na FcR signalizaci pro indukci proliferace [33].

Při *in vitro* studiích se buněčná odpověď na IL-15 zvýšila 6x až 9x v přítomnosti IL-15R α -Fc. Limitující koncentrace myšího IL-15 (5 ng/ml) spolu s myším sIL-15R α -Fc (1 μ g/ml) vedla až k 9x silnější proliferativní odpovědi MP CD44^{hi}CD122^{hi}CD8⁺ T lymfocytů a také zvýšila odpověď CD122^{hi} NK buněk na IL-15 [31]. Dále byl solubilní

IL-15/IL-15R α komplex schopen expandovat IL-15 rezpozivní buňky (NK a CD8⁺ CD44^{hi} T lymfocyty) *in vitro* v tkáňové kultuře buněk, získaných z periferních tkání [33]. Citlivost buněk k množství podaného komplexu korelovala s mírou jejich CD122 exprese. NK buňky, exprimující nejvyšší hladiny CD122, odpovídaly na nejnižší dávky podaného komplexu [33].

Výsledky *in vivo* studie, provedené skupinou Rubinstein et al. ukázaly, že podání preasociovaných IL-15/ IL-15R α -Fc komplexů také vedlo k proliferaci naivních T-lymfocytů (CD44^{lo}CD122^{lo}CD8⁺), i když až při vyšších koncentracích IL-15 (50 ng/ml) [31]. Podobné výsledky prezentují i Stocklasek et al. (2006), kteří ve svých studiích na myších modelech používají shodné *in vitro* preasociované komplexy IL-15/IL-15R α -Fc. Ukazují, že B lymfocyty na tyto komplexy neodpovídají, zato však odhalují střední reaktivitu CD4⁺ T lymfocytů [32]. Toto reflektuje skutečnost, že paměťové CD4⁺ T lymfocyty exprimují podstatně nižší hladiny CD122 než paměťové CD8⁺ T lymfocyty a NK buňky. Tento fakt potvrzuje skutečnost, že pouze při absenci NK buněk a CD8⁺ T lymfocytů jsou paměťové CD4⁺ T lymfocyty schopny využít IL-15 tak efektivně, jako paměťové CD8⁺ T lymfocyty [34].

V myších modelech vedlo současné podání IL-15 (5 ng/ml) a IL-15R α -Fc k troj- a vícenásobné proliferaci >95% MP CD8⁺ buněk, ve srovnání s méně než 5% u samotného IL-15, shodný efekt byl pozorován i pro antigenně specifické paměťové CD8⁺ T lymfocyty. Dle výsledků titračních experimentů se tímto aktivita IL-15 zvýšila asi 50x. Injekování samotného IL-15R α -Fc nemělo na proliferaci žádný vliv [31].

Stocklasek et al. testovali účinek IL-15/IL-15R α -Fc komplexů na naivní CD8⁺ T lymfocyty. Imunokomplexy indukovaly i bez přítomnosti antigenního stimulu masivní proliferaci (klonální expanzi) a vyvinutí efektorových funkcí (antigenně specifická lytická aktivita) u naivních CD8⁺ T lymfocytů, následovanou zmenšením populace a nakonec ústící ve vytvoření stabilní populace paměťových CD8⁺ T lymfocytů. Tyto paměťové CD8⁺ T lymfocyty byly po *in vitro* restimulaci schopné produkce IFN- γ [32].

Komplexy IL-15/IL-15R α -Fc, podány *in vivo* v dávce 1 nmol, vedly k velmi silné expanzi (expanze = proliferace - buněčná smrt) NK a CD8⁺ CD44^{hi} T lymfocytů po dobu minimálně 28 dní, a to bez potřeby přítomnosti dalšího stimulu [33]. Kinetické studie, sledující proliferaci CD8⁺ T lymfocytů prokazují, že nejvyšší proliferace je dosaženo 4. den po podání jedné dávky IL-15/IL-15R α -Fc (15 μ g sIL-15R α -Fc a 2,5 μ g IL-15). Stocklasek et al. zdůrazňují, že stupeň proliferace, pozorovaný při aplikaci komplexů, nemůže být dosažen ani velkými dávkami samotného IL-15. Proliferace CD8⁺ T lymfocytů *in vivo* dle jejich

výsledků jeví při podání 12 µg samotného IL-15 plató fázi, t.j. nedochází k vyšší odpovědi při dále se zvyšujících dávkách IL-15.

Aplikace samotného IL-15R α -Fc neprokázala vliv na prezentaci endogenního IL-15 (vázaného na IL-15R α) MP CD8⁺ buňkám, tedy ani žádný blokační efekt. Rubinstein et al. to zdůvodňují tak, že IL-15 má pouze jedno vazebné místo pro interakci s IL-15R α , tudíž když už je jednou obsazené, interakce s IL-15R α -Fc nemůže proběhnout [31].

Rubinstein et al. dospěli k významnému závěru, že esenciální role IL-15R α při transprezentaci IL-15 je plně nahraditelná podáním komplexů IL-15/IL-15R α -Fc u IL-15R α ^{-/-} myši (deficientní na CD122^{hi} populace, t.j. MP CD8⁺ a NK buňky). Současné podání sIL-15R α -Fc a IL-15 vedlo u těchto myši k obnovení populace NK1.1⁺ DX5⁺ NK buněk a MP CD8⁺ T buněk [31]. Tento efekt vyzdvihuje potenciál komplexů pro obnovování některých komponent imunitního systému během stádií lymfopénie. Stocklasek et al. potvrzují, že funkcí sIL-15R α -Fc/IL-15 je prezentace IL-15 jednotlivým subtypům buněk, exprimujících IL-15R $\beta\gamma_c$ a dále prokázují esenciální roli CD122 použitím modelu CD122^{-/-} CD8⁺ T lymfocytů či podáním α -CD122 [32].

Nejdůležitějším přínosem se jeví právě pozorované odlišnosti vlivu myšičího oproti lidskému IL-15 na jednotlivé subtypy buněk. Rubinstein et al. ukazují, že podání lidského IL-15R α -Fc zvyšuje odpověď myšičích (MP) CD8⁺ buněk jak na lidský, tak i myšičí IL-15, přičemž však tyto buňky odpovídají lépe právě na myšičí IL-15. Myšičí CTLL buňky, které na svém povrchu exprimují IL-15R α plus $\beta\gamma_c$ odpovídají lépe na myšičí IL-15 v kombinaci s myšičím sIL-15R α -Fc. V případě kombinace lidského IL-15 a myšičího IL-15R α -Fc byla proliferace CTLL-2 buněk silně inhibována [31].

Stocklasek et al. také srovnávali účinnost IL-15R α -Fc komplexů s podáním samotného IL-15 při zvyšování protinádorové imunitní reakce v experimentálním modelu B16-F₁ melanomu. Vycházeli přitom z potenciálu komplexů expandovat a aktivovat CD8⁺ T lymfocyty a NK buňky, populace angažující se v protinádorovém dozoru. Při tomto pokusu bylo myšičím intravenózně aplikováno 10⁵ B16-F₁ buněk, léčba proběhla následující a desátý den intraperitoneálním podáním PBS (kontrola), samotného IL-15 či komplexu IL-15/IL-15R α -Fc. Účinek samotného IL-15 byl srovnatelný s PBS, tedy žádný. Oproti tomu podání IL-15/IL-15R α -Fc komplexů vyléčilo devět z deseti myši, u nichž se vytvořily metastázy v plicích a játrech, čímž se prokázal potenciál těchto komplexů jako protinádorových imunoterapeutických agens [32].

7.2. Fúzní komplexy

Mortier et al. (2005) popisují fúzní proteiny RLI a ILR, které *in vivo* působí jako účinní superagonisté IL-15R β/γ_c receptorového komplexu. Tyto konstrukty jsou tvořené IL-15 kovaletně připojeným flexibilní spojkou z 20-aa (RLI) či 26-aa (ILR), spojující C-konec IL-15 a N-konec IL-15R α -sushi u ILR a naopak u RLI. Dle výsledků Mortiera et al., je aktivita těchto komplexů až 10x vyšší než aktivita IL-15/IL-15R α -sushi u TF-1 β lidské buněčné linie, exprimující IL-15R β/γ_c . Jako efektivnější se ukazuje RLI forma konstruktů, neboť efekty ILR fúzního proteinu jsou srovnatelné s použitím samotného rIL-15. RLI komplexy se ukázaly být až 5x účinnější než IL-15/IL-15R α -sushi v prevenci apoptózy navozené cytokinovou deprivací u experimentální myeloidní leukemické linie Mo-7e buněk. Dále prokázaly 20x vyšší vazebnou afinitu k IL-15R β/γ_c než samotný IL-15 a o něco vyšší afinitu než IL-15/IL-15R α -sushi [16].

7.3. Srovnání vlastností komplexu hIL-15/IL-15R α -Fc a fúzního proteinu hIL-15/IL-15R α -sushi

In vivo srovnání působení nekovalentně asociovaného hIL-15/IL-15R α -Fc imunokomplexu a RLI konstruktů provedla skupina Huntington et al. (2008): oba komplexy stimulovaly proliferaci NK buněk, expresi Bcl-xL (anti-apoptický protein), Ki-67 a CD69 (proliferační markery) a vedly k oddálení apoptózy v nepřítomnosti cytokinů. Obdobné výsledky byly dosaženy pro CD8⁺ T lymfocyty. RLI však aktivovalo IL-15R β/γ_c i IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$ oproti hIL-15/IL-15R α -Fc, které aktivovalo pouze IL-15R β/γ_c . Dále byla vyloučena aktivace NK buněk vazbou Fc části k CD16. Tato skupina naznačila hypotézu, že hIL-15/IL-15R α -Fc komplex spíše zesiluje, než poskytuje, samotný signál k přežití během NK buněčného vývoje *in vivo*.

Transprezentace IL-15 oběma komplexy vedla k maturaci a diferenciaci NK buněk *in vivo* a dále k vytvoření vyššího množství NK buněk, exprimujících KIRs receptory (killing inhibitory receptor), přičemž stimulace byla účinnější v případě RLI [26].

8. Potencionální využití IL-15/IL-15R α komplexů v imunoterapii

Již mnoho vědeckých skupin (Rubinstein et al., Stoklasek et al., Dubois et al., Mortier et al.) dokázalo, že IL-15/IL-15R α -Fc komplexy mají mnoho výhod oproti samotnému IL-15. Příkladem může být delší životnost v séru (až 20násobná ve srovnání s IL-15; Rubinstein et al.) a tím i o mnoho vyšší účinnost, které použitím samotného IL-15 není možné dosáhnout při působení na NK buňky, CD8⁺ a dokonce i CD4⁺ T lymfocyty (zejména paměťového

fenotypu). Další výhodou těchto komplexů je schopnost plně nahradit přirozenou transprezentaci IL-15 (obnovení populací CD122^{hi}, t.j. MP CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk u IL-15R α ^{-/-} myši [31]) a účinně navozovat v cílových buňkách efektorové funkce. Tyto výhody IL-15/IL-15R α -Fc komplexů mohou mít praktické využití v celé řadě klinických aplikací.

Všechny tyto vlastnosti předurčují IL-15/IL-15R α -Fc komplexy k využití v případech, kde se již ukazuje pozitivní vliv aplikace IL-15. Tyto studie však teprve čekají na své provedení, nicméně některé příklady možného využití IL-15/IL-15R α -Fc komplexů jsou uvedeny níže.

8.1. Léčba HIV

IL-15 hraje významnou roli v imunitní odpovědi během HIV infekce [2]. HIV pacientni vykazují defektní produkci IL-15 a zvýšená hladina IL-15 v séru koreluje s vyšší účinností terapie [35]. Důležitou roli při kontrole HIV infekce mají HIV-specifické CD8⁺ T lymfocyty [36]. Avšak právě tyto buňky vykazují zvýšenou senzitivitu k CD95/Fas – indukované apoptóze a mohou tak být účinně zabíjeny HIV-infikovanými buňkami [37]. Interleukin 15 tuto CD95/Fas-indukovanou apoptózu u HIV-specifických CD8⁺ T buněk značně inhibuje [38].

In vitro stimulace CD8⁺ T buněk z HIV-infikovaných pacientů pomocí IL-15 se ukázala být velmi efektivní ve zvyšování anti-HIV imunitní odpovědi [38]. IL-15 také projevil schopnost zvyšovat *in vitro* NK funkce u HIV nakažených pacientů [2]. Administrace komplexů IL-15/IL-15R α -Fc by mohla obnovit či zvýšit T a NK buněčné funkce a „vyrovnat“ deficienci IL-15. Komplexy IL-15/IL-15R α -Fc, zvyšující hladiny anti-apoptických molekul Bcl-2 a Bcl-x(L), by mohly mít pozitivní efekt na přežití a funkci HIV-specifických CD8⁺ T lymfocytů [39]. Použití imunokomplexů oproti samotnému IL-15 se také může ukázat výhodné při *in vitro* expanzi T a NK buněk pro HIV-specifickou adoptivní terapii [2].

8.2. IL-15 jako adjuvans

Preklinické studie na myších modelech ukazují, že současné podání IL-15 zvyšuje CD8⁺ T zprostředkovanou imunitní odpověď na HIV DNA vakcíny, obsahující envelope a gag proteiny. Podobné výsledky jsou dosaženy i při imunizaci proti tetanovému toxoidu, chřipce, herpes simplex viru a hepatitidě B. Zajímavé jistě bude otestovat v těchto případech také komplexy IL-15/IL-15R α -Fc se všemi jejich výhodami, spočívajícími například v nižší potřebné dávce a výrazně vyšší účinnosti [2].

8.3. Transplantace kostní dřeně

Opožděná rekonstituce imunitního systému je pozorována po allogenní transplantaci hematopoetických buněk kostní dřeně (hematopoietic stem cell transplantation; HSCT) a je asociována se zvýšeným rizikem oportunistických infekcí. Tyto infekce mají na výsledek transplantace větší dopad, než například relaps chromické myelogenní leukémie u pacientů, kteří prodělali allogenní HSCT od nepříbuzného donora. V popředí zájmů je nyní zrychlení imunitní rekonstituce po HSCT pomocí IL-15, ale potenciálně také pomocí IL-15/IL-15R α -Fc imunokomplexů.

Podání IL-15 po syngenní HSCT zvýšilo počet T-lymfocytů a NK buněk a jejich cytolytickou aktivitu, a navíc zvýšilo protinádorovou aktivitu u myší, nesoucích nádor [2]. Nedávné pokusy s post-transplantační administrací IL-15 ukázaly zvýšení počtu donorových CD8⁺ T lymfocytů (převážně paměťových), NK a NKT buněk v recipientech po alogenní HSCT. IL-15 stimuloval homeostatickou proliferaci donorových CD8⁺ T lymfocytů, ta se však netýkala alloreaktivních donorových CD8⁺ T buněk. Post-transplantační administrace IL-15 zvýšila rekonstituci antimikrobiální imunity, zvýšením reaktivnosti antigeně specifických T buněk proti cizím antigenům. Dále se zvýšila životnost donorových CD8⁺ T lymfocytů a také protinádorová aktivita, zprostředkovaná donorovými NK buňkami. IL-15 nezhoršovalo reakci štěpu proti hostiteli (Graft-versus-host disease; GvHD) v recipientech T-depletovaných HSCT. Tyto výsledky naznačují potenciální využití komplexů jak u recipientů syngenních HSCT, tak i na T-lymfocyty depletovaných alogenních HSCT, u nichž je riziko GvHD značně sniženo [40].

8.4. Imunoterapie nádorů

In vitro kultivace v přítomnosti IL-15 komplexů podporuje expanzi a zvyšuje přežívání v *in vivo* podmínkách u T a NK buněk. IL-15 (a potenciálně také IL-15 komplexy) také zvyšuje expanzi EBV-specifických CTL a proliferaci a *in vitro* protinádorovou aktivitu periferních $\gamma\delta$ T lymfocytů, izolovaných z pacientů trpících glioblastomy. Dále aktivuje NK a CD8⁺ T lymfocyty pacientů s pokročilým kožním T-lymfomem (CTCL) [2]. *In vitro* kultivace s IL-15 vede k expanzi a aktivaci NK buněk, pocházejících z pacientů s CTCL či trpících nádorem prostaty. Studie na myších modelech, srovnávající účinky IL-2 a IL-15 na expanzi nádorově specifických CD8⁺ T lymfocytů, ukazují rozdíly mezi působením těchto cytokinů. Buňky expandované v přítomnosti IL-2jevily efektorový paměťový fenotyp a sekretovaly IFN- γ a IL-10, ale ne IL-2. Oproti tomu buňky v přítomnosti IL-15 nabyly centrálního paměťového fenotypu, produkovaly IFN- γ a IL-2, ale ne IL-10; tyto buňky také po transferu do myší, nesoucích nádor, zpomalily růst nádoru a prodloužily jejich přežití.

V závislosti na typu nádoru je protinádorová imunita zprostředkována samotnými CD8⁺ T lymfocyty, samotnými NK buňkami, či oběma typy zároveň. IL-15 komplexy projevily schopnost právě tyto typy buněk účinně aktivovat a expandovat, je tedy pravděpodobné jejich využití tam, kde se odvědčila administrace IL-15 *in vivo*, se všemi výhodami oproti podání samotného IL-15. Například, v mnoha myších modelech vedla denní aplikace IL-15 k potlačení metastatického procesu (u plicního nádorového modelu MCA-205 buněk), k inhibici růstu nádoru (u rhabdomyosarkomu) či úplné eradikaci nádoru (MC38 model karcinomu tlustého střeva). Podání IL-15 vedlo k regresi nádorů a podpořilo přežívání adoptivně přenesených nádorově specifických CTL, na rozdíl od podání IL-2 ve stejném modelu [2].

8.4.1. Transprezentace IL-15/IL-15R α nádorovými buňkami a inhibice nádorového růstu

Zajímavý experiment provedla skupina Rowley et al. (2008), která prokázala, že exprese IL-15/IL-15R α na TC-1 nádorové linii vede ke zvýšenému množství nádor-infiltrujících NK, NKT a CD8⁺ T buněk. To v konečném důsledku vede k inhibici nádorového růstu. V tomto modelu byl využit k transdukci TC-1 buněk retrovirus, kódující IL-15 kovalentně připojený 26-aminokyselinovým polyprolinovým linkerem k IL-15R α . Takto transdukované TC-1 buňky, exprimující na svém povrchu komplex IL-15/IL-15R α , byly vneseny do myši (5x10⁴), kde se sledoval jejich další osud. Po 18 dnech tyto myši nevykazovaly žádné stopy nádorového růstu. Při depleci jednotlivých buněčných subtypů (pomocí specifických monoklonálních protilátek) se ukázalo, že nádorový růst je potlačen NK1.1⁺ a CD8⁺ buňkami, jejichž současná deplece vedla k opětovnému růstu nádoru. Bodová mutace 108. aminokyseliny v γ_c vazebném místě IL-15 zabránila inhibici nádorového růstu *in vitro*, čímž byla doložena esenciální role IL-15R $\beta\gamma_c$ na povrchu responzivních buněk pro signalizaci přes transprezentovaný IL-15 [41]. Signalizace v responzivních buňkách iniciovala STAT5 dráhu (obdobně, jako přirozeně se vyskytující transprezentovaný IL-15), která je kritická pro NK a T buněčné přežití, funkci a proliferaci. Zesílená aktivace nádor-infiltrujících buněk byla mimo jiné potvrzena také zvýšenou expresí granzymu B NK buňkami.

Schopnost chimérického konstruktu IL-15/IL-15R α (exprimovaného na povrchu nádorových buněk) aktivovat NK a T buňky, může mít zajímavé klinické aplikace. Tak například aktivace NK buněk v okolí nádoru může vést k usmrcení nádorových buněk, uvolnění a pohlcení nádorově-specifických antigenů a jejich následné cross-prezentaci, vedoucí k ustavení nádorově specifické imunitní odpovědi. Velmi nadějně se jeví vakcinační postupy, využívající ozářené nádorové buňky, exprimující chimérické IL-15/IL-15R α

konstrukty, pro schopnost vyvolat nádorově-specifickou imunitní odpověď vyjádřenou jako systémové protinádorové efekty proti rodičovskému nádoru [41].

9. Závěr

Interleukin 15 je pleiotropní cytokin, hrající významnou roli jak ve vrozené, tak i specifické imunitě. Jeho hlavními prouducenty jsou zejména monocyty, makrofágy a dendritické buňky. Působení IL-15 na jednotlivé buňky je zprostředkováno vysokoafinitním receptorem IL-15R α , který se dále podílí na IL-15 sekreci a ovlivňuje také jeho expresi.

Signalizace přes interleukin 15 probíhá na mnoha úrovních a zahrnuje juxtakrinní, intrakrinní a reverzní signální procesy. Příkladem juxtakrinní signalizace je transprezentace IL-15 se svým vysokoafinitním receptorem IL-15R α ve formě komplexu IL-15/IL-15R α , která je esenciální pro populace NK, NKT a paměťových CD8⁺ buněk. Interleukin-15 je důležitý pro vývoj NK buněk, jejich diferenciaci a maturaci. Aktivuje proliferaci NK buněk, jejich cytotoxickou aktivitu a sekreci některých cytokinů a chemokinů. IL-15 také zvyšuje přežívání, aktivaci, IFN- γ produkci a cytotoxicitu CD8⁺T buněk (zejména paměťového fenotypu) a dále hraje významnou roli v homeostáze paměťových CD8⁺ T buněk.

Poznané zákonitosti působení IL-15 a IL-15R α (včetně jeho solubilní formy), poskytují účinný nástroj k cílené selektivní modulaci některých složek imunitního systému a jeho funkcí. Účinná potenciace efektů IL-15 by mohla mít významný terapeutický efekt zejména v léčbě nádorových onemocnění, některých imunodeficiencí a při vakcinaci. Právě pro potenciaci IL-15 účinků *in vitro* a hlavně také *in vivo*, se ukázaly jako velmi potentní solubilní rekombinantní IL-15/IL-15R α -Fc komplexy, působící jako IL-15 superagonista. Jednou z výhod těchto solubilních IL-15/IL-15R α -Fc komplexů je také to, že mohou působit nejen lokálně, ale i parakrinně či endokrinně (systemicky) a současně ovlivňovat podstatu a/nebo délku trvání signálních procesů a dostupnost IL-15.

Tyto IL-15/IL-15R α komplexy jsou nyní dále modifikovány, aby bylo dosaženo jejich vyšší aktivity a lepších vlastností při působení v rámci imunitního systému. Pozorované účinky na jednotlivé populace buněk předurčují tyto komplexy pro budoucí uplatnění například v posílení imunitních odpovědí a podpoře rekonstituce imunitního systému. Do budoucna bude jistě zajímavé využití těchto modifikovaných IL-15/IL-15R α komplexů v celé řadě klinických aplikací, kde se již ukázal pozitivní vliv aplikace IL-15.

10. Použitá literatura

- 1 Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, DuBose R, Cosman D, Park LS, Anderson DM: **Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the α chain of the IL-2 receptor.** EMBO J. 1995, **14**: 3654-3663.
- 2 Diab A, Cohen AD, Alpdogan O, Perales MA: **IL-15: targeting CD8⁺ T cells for immunotherapy.** Cytotherapy 2005, **7**: 23-35.
- 3 Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J., Schoenborn MA, Ahdieh M, Johnson L, Alderson MR, Watson JD, Anderson DM, Giri JG: **Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin-2 receptor.** Science 1994, **264**: 965-968.
- 4 Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, Pohl T, Borden EC, Silverman R, Bulfone-Paus S: **Reverse Signaling through Membrane-bound Interleukin-15.** J Biol Chem. 2004, **279**: 42192-42201.
- 5 Lodolce JP, Burkett PR, Boone DL, Chien M, Ma A: **T Cell-independent Interleukin 15R α Signals Are Required for Bystander Proliferation.** J Exp Med. 2001, **15**: 1187-1193.
- 6 Waldman TA, Tagaya Y: **The Multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens.** Annu Rev Immunol. 1999, **17**:19-49.
- 7 Gaggero A, Azzarone B, Andrei C, Mishal Z, Meazza R, Zappia E, Rubartelli A, Ferrini S: **Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms.** Eur J Immunol. 1999, **29**:1265-74.
- 8 Onu A, Pohl T, Krause H, Bulfone-Paus S: **Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms.** J Immunol. 1997, **158**: 255-62.
- 9 Tagaya Y, Kurys G, Thies TA, Losi JM, Azimi N, Hanover JA, Bamford RN, Waldmann TA: **Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides.** PNAS 1997, **94**: 14444-14449.
- 10 Nishimura H, Yajima T, Naiki Y, Tsunobuchi H, Umemura M, Itano K, Matsuguchi T, Suzuki M., Ohashi PS, Yoshikai Y: **Differential Roles of Interleukin 15 mRNA Isoforms Generated by Alternative Splicing in Immune Responses in Vivo.** J Immunol. 2000, **191**: 157-170.
- 11 Duitman EH, Orinska Z, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S: **How a Cytokine Is Chaperoned through the Secretory Pathway by Complexing with Its Own Receptor: Lessons from Interleukin-15 (IL-15)/IL-15 Receptor α .** Mol Cell Biol. 2008, **28**: 4851-4861.
- 12 Chirifu M, Hayashi CH, Nakamura T, Toma S, Shuto T, Kai H, Yamagata Y, Davis SJ, Ikemizu S: **Crystal structure of the IL-15-IL-15R α complex, a cytokine-receptor unit presented in trans.** Nat Immunol. 2007, **8**: 1001-1007.
- 13 Bamford RN, DeFilippis AP, Azimi N, Kurys G, Waldmann TA: **The 5' Untranslated Region, Signal Peptide, and the Coding Sequence of the Carboxyl Terminus of IL-15 Participate in Its Multifaceted Translational Control.** J Immunol. 1998, **160**: 4418-4426.
- 14 Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A: **Natural Killer Cell-Mediated Control of Infections Requires Production of Interleukin 15 by Type I IFN-Trigged Dendritic Cells.** Immunity 2007, **26**: 503-517.

- 15 Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D, Anderson D: **Utilization of the β and γ chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15.** EMBO J 1994, 13: 2822-2830.
- 16 Mortier E, Quéméner A, Vusio P, Lorenzen I, Boublik Y, Grötzinger J, Plet A, Jacques Y: **Soluble Interleukin-15 Receptor α (IL-15R α)-sushi as a Selective and Potent Agonist of IL-15 Action through IL-15R β/γ .** J Biol Chem. 2006, **281**: 1612–1619.
- 17 Bulfone-Paus S, Bulanova E, Budagian V, Paus R: **The interleukin-15/interleukin-15 receptor system as a model for juxtacrine and reverse signaling.** BioEssays 2006, **28**: 362–377.
- 18 Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A: **Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15R α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8⁺ T cell homeostasis.** J Exp Med. 2004, **200**: 825-34.
- 19 Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Krause H, Paus R, Bulfone-Paus S: **Mast Cells Express Novel Functional IL-15 Receptor α Isoforms.** J Immunol. 2003, **170**: 5045–5055.
- 20 Schluns KS, Stoklasek T, Lefrancois L: **The roles of interleukin-15 receptor α : Trans-presentation, receptor component, or both?** Int J Biochem Cell Biol. 2005, **37**: 1567–1571.
- 21 Sato N, Patel HJ, Waldmann TA, Tagaya Y: **The IL-15/IL-15R α on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells.** PNAS 2007, **104**: 588–593.
- 22 Olsen SK, Ota N, Kishishita S, Kukimoto-Niino M, Murayama K, Uchiyama H, Toyama M, Terada T, Shirouzu M, Kanagawa O, Yokoyama S: **Crystal Structure of the Interleukin-15/Interleukin-15 Receptor α Complex.** INSIGHTS INTO TRANS AND CIS PRESENTATION. J Biol Chem. 2007, 282: 37191–37204
- 23 Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, Ma A: **IL-15 Receptor Maintains Lymphoid Homeostasis by Supporting Lymphocyte Homing and Proliferation.** Immunity 1998, **9**: 669–676.
- 24 Schluns KS, Nowak EC, Cabrera-Hernandez A, Puddington L, Lefrancois L, Aguila HL: **Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor α expression.** Proc Natl Acad Sci USA. 2004, **101**: 5616–5621.
- 25 Mortier E, Woo T, Advincula R, Gozalo S, Ma A: **IL-15R α chaperons IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation.** J Exp Med. 2008, **205**: 1213–1225.
- 26 Huntington ND, Legrand N, Alves NL, Jaron B, Weijer K, Plet A, Corcuff E, Mortier E, Jacques Y, Spits H, Santo JP: **IL-15 trans-resentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo.** J Exp Med. 2008, **206**: 25-34.
- 27 Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Chan F, Ma A: **IL-15R α expression on CD8⁺T cells is dispensable for T cell memory.** PNAS 2003, **100**: 4724–4729.
- 28 Surh ChD, Sprent J: **Homeostasis of Naive and Memory T Cells.** Immunity 2008, **29**: 848-862.

- 29 Rückert R, Brand K, Braun A, Hoymann HG, Herz U, Budagian V, Dürkop H, Renz H, Bulfone-Paus S: **Blocking IL-15 Prevents the Induction of Allergen-Specific T Cells and Allergic Inflammation In Vivo.** *J Immunol.* 2005, **174**: 5507-5515.
- 30 Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei X, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE, Biron CA: **Coordinated and Distinct Roles for IFN- $\alpha\beta$, IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection.** *J Immunol.* 2002, **169**: 4279-4287.
- 31 Rubinstein MP, Kovar M, Purton JF, Cho JH, Boyman O, Surh CD, Sprent J: **Converting IL-15 to a superantagonist by binding to soluble IL-15R α .** *PNAS* 2006, **103**: 9166-9171.
- 32 Stoklasek TA, Schluns KS, Lefrancois L: **Combined IL-15/IL-15R α Immunotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo.** *J Immunol.* 2006, **177**: 6072-6080.
- 33 Dubois S, Patel HJ, Zhang M, Waldmann TA, Müller JR: **Preassociation of IL-15 with IL-15R α -IgG1-Fc Enhances Its Activity on Proliferation of NK and CD8⁺/CD44^{high} T Cells and Its Antitumor Action.** *J Immunol.* 2008, **180**: 2099-2106.
- 34 Purton JF, Tan JT, Rubinstein MP, Kim DM, Sprent J, Surh CD: **Antiviral CD4⁺ memory T cells are IL-15 dependent.** *J Exp Med.* 2007, **204**: 951-961.
- 35 Amicosante M, Poccia F, Gioia C et al . **Levels of interleukin-15 in plasma may predict a favorable outcome of structured treatment interruption in patients with chronic human immunodeficiency virus infection.** *J Infect Dis* 2003, **188**: 661-665.
- 36 Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB: **Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection.** *J Virol.* 1994, **68**: 6103-6110.
- 37 Mueller YM, De Rosa SC, Hutton JA, Witek J, Roederer M, Altman JD, Katsikis PD: **Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8⁺ T cells.** *Immunity* 2001, **15**: 871-882.
- 38 Mueller YM, Bojczuk PM, Halstead ES, Kim AHJ, Witek J, Altman JD, Katsikis PD: **IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8⁺ T cells.** *Blood* 2003, **101**: 1024-1029.
- 39 Petrovas C, Mueller YM, Dimitriou ID et al . **HIV-specific CD8⁺ T cells exhibit markedly reduced levels of Bcl-2 and Bcl-xL.** *J Immunol.* 2004, **172**: 4444-4453.
- 40 Alpdogan O, Eng JM, Muriglan SJ, Willis LM, Hubbard VM, Tjoe KH, Terwey TH, Kochman A, van den Brink MRM: **Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation.** *Blood* 2005, **105**: 865-873.
- 41 Rowley J, Monie A, Hung CF, Wu TC: **Inhibition of tumor growth by NK1.1⁺ cells and CD8⁺ T cells activated by IL-15 through receptor beta/common gamma signaling in trans.** *J Immunol.* 2008, **181**: 8237-47.