

INTERLEUKINA 15 – CO JUŻ WIEMY? BUDOWA, RECEPTORY I INHIBITORY

INTERLEUKIN 15 – WHAT DO WE KNOW?
THE STRUCTURE, RECEPTORS AND INHIBITORS

Barbara ŻYŻYŃSKA-GRANICA

Zakład Biochemii Ogólnej i Żywności, Wydział Nauki o Zdrowiu,
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie: Interleukina 15 (IL-15) jest cytokiną o pleiotropowym działaniu, wykazującą szerokie spektrum aktywności. Znacząca rola IL-15 w patogenezie procesów zapalnych, autoimmunologicznych, zakaźnych i nowotworowych sugeruje możliwość interwencji terapeutycznej polegającej na blokowaniu aktywności biologicznej tej cytokiny. Dotychczas stosowane metody blokowania IL-15 opierają się na uzyskiwaniu przeciwciał blokujących jej aktywność, skierowanych przeciwko IL-15 lub jej receptorowi, oraz na modyfikacjach prowadzących do uzyskania rozpuszczalnego receptora lub zmutowanej cząsteczki IL-15, wykazujących właściwości kompetycyjnego antagonisty. Stosuje się również inne związki nie oddziałujące bezpośrednio z elementami kompleksu IL-15 i jej receptora. Żadna z tych strategii nie została jednak wprowadzona do szerokiego stosowania klinicznego. Nowe perspektywy dla badań, których celem jest stworzenie metody skutecznej i wybiórczej inhibicji IL-15, stworzyło wyznaczenie dokładnej struktury kompleksu IL-15 i jej receptora i poznanie najważniejszych elementów budowy tych białek, biorących udział w ich wzajemnym oddziaływaniu. W artykule omówiono budowę IL-15 i jej receptora oraz sposób ich wzajemnego wiązania, a także przedstawiono przegląd najważniejszych badań dotyczących inhibicji IL-15.

Słowa kluczowe: cytokina; interleukina 15; podjednostka α receptora interleukiny 15; antagonist; przeciwciało.

Summary: Interleukin 15 (IL-15) is a pleiotropic cytokine with a wide spectrum of activity. The significant role of IL-15 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune processes, infectious diseases and cancer suggests a possibility of a therapeutic intervention by blocking the biological activity of this cytokine. The methods of blocking IL-15, which have been already developed, are based either on the administration of anti-IL-15 and anti-IL-15 receptor antibodies or on the modifications leading to a soluble receptor molecule or a mutated IL-15, exhibiting properties of competitive antagonists. There are also other compounds used, which do not interact directly with elements of the complex of IL-15 and its receptor. Nevertheless, none of these strategies have been introduced into a wide clinical use. New

*Praca powstała podczas realizacji projektu pt. „Identyfikacja związku chemicznego hamującego biologiczne efekty interleukiny 15 (IL-15) poprzez selektywne blokowanie receptora IL-15R α ” finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy.

perspectives for the research on the selective and efficient inhibition of IL-15 has been created by a recent definition of IL-15 and its receptor complex structure. The article discusses the structure of IL-15 and its receptor, their interactions and reviews the major advances in the research on the inhibition of IL-15.

Keywords: cytokine; interleukin 15; interleukin 15 receptor α subunit; antagonist; antibody.

Wykaz skrótów: **IC₅₀** (ang. *half maximal inhibitory concentration*) – stężenie związku powodujące 50% inhibicji danego parametru; **Ig** – immunoglobulina (przeciwciało); **IL** – interleukina; **IL-15R** – receptor interleukiny 15; **IL-15R α** – podjednostka α receptora **IL-15R**; **IL-2/IL-15R β** (IL-2R β ; β ; CD122; p75) – podjednostka β receptorów interleukiny 15 i interleukiny 2; **γ_c** (γ ; CD132; p64) (ang. *common γ chain*) – powszechna podjednostka γ , będąca elementem wielu receptorów; **komórki NK** (ang. *natural killers*) – grupa komórek układu odpornościowego; **LSP-IL-15** (ang. *long signal peptide IL-15*) – forma IL-15 o długim peptydzie liderowym; **NMR** (ang. *nuclear magnetic resonance*) – magnetyczny rezonans jądrowy; **PBMCs** (ang. *peripheral blood mononuclear cells*) – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej; **Region PT** – region bogaty w reszty proliny i treoniny; **RZS** (ang. *rheumatoid arthritis, RA*) – reumatoidalne zapalenie stawów; **sIL-15R α** – rozpuszczalna podjednostka α receptora IL-15R; **SSP IL-15** (ang. *short signal peptide IL-15*) – forma IL-15 o krótkim peptydzie liderowym; **TF-1** – linia komórek białaczki promielocytowej; **TNF- α** (ang. *tumor necrosis factor α*) – czynnik martwicy nowotworów α .

WSTĘP

W 1994 r. odkryto nową cytokinę naśladującą funkcjami interleukinę 2 (IL-2). Wykazano, że oddziałuje ona z podjednostkami β (IL-2R β , CD122, p75) i γ (γ_c , CD132, p64) receptora dla IL-2 (IL-2R) oraz z prywatną podjednostką α (IL-15R α) [30]. Była to interleukina 15. W odróżnieniu od IL-2, która jest produkowana praktycznie wyłącznie przez limfocyty T, nową cytokinę charakteryzował szeroki zakres występowania. Transkrypt IL-15 powstaje w wielu tkankach, między innymi w mięśniach szkieletowych, łożysku, nerkach, płucach, sercu i wątrobie. Głównym źródłem IL-15 są monocyty i fibroblasty [13, 30].

IL-15 pełni wiele istotnych funkcji zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych [2, 67, 70]. Wbrew początkowym doniesieniom rola IL-15 znacznie różni się od funkcji IL-2. Więcej informacji na temat funkcji IL-15 czytelnik znajdzie w innych pracach przeglądowych [13, 54].

Zaburzenie mechanizmów regulujących ekspresję IL-15, prowadzące do jej nadprodukcji, bezpośrednio przyczynia się do rozwoju wielu schorzeń. Zwiększony poziom IL-15 w surowicy krwi obserwuje się w chorobach autoimmunologicznych, takich jak: sarkoidoza, łuszczyca, toczeń rumieniowaty układowy, nieswoiste zapalenie jelit, astma oskrzelowa, stwardnienie rozsiane czy reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) [13, 18, 22, 28, 33]. Zauważono również związek pomiędzy podwyższonym stężeniem IL-15 a częstością odrzucania przeszczepów [13]. Te i inne stany chorobowe związane z zaburzeniami ekspresji IL-15 opisano szerzej w pracach przeglądowych [3, 13, 14].

Eksperymentalne leczenie chorób związanych z nadmierną ekspresją IL-15 uzyskuje się między innymi stosując jej inhibitory. Większość z nich to związki wielkocząsteczkowe, aczkolwiek istnieją również prostsze substancje organiczne hamujące aktywność IL-15 [53, 63]. Badania w zakresie inhibicji IL-15 do niedawna prowadzone były przy wykorzystaniu

cząstkowych informacji na temat budowy IL-15, uzyskanych przede wszystkim w wyniku mutagenyzy. W 2007 roku wyznaczono strukturę krystaliczną kompleksu IL-15·IL-15R [17, 45, 68]. Dwa lata później określono najistotniejsze termodynamicznie fragmenty biorące udział w wiązaniu IL-15 z podjednostką α jej receptora [51]. Informacje te stwarzają nowe perspektywy badań w zakresie terapii chorób związanych z zaburzeniami ekspresji IL-15.

W niniejszej pracy opisano budowę IL-15 i jej receptora oraz scharakteryzowano ich wzajemne oddziaływania występujące w kompleksie IL-15·IL-15R. Omówiono także najważniejsze dotychczasowe osiągnięcia w poszukiwaniu skutecznych inhibitorów IL-15.

BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI IL-15

IL-15 jest glikoproteina o masie cząsteczkowej 14–15 kDa [30]. Ludzki gen IL-15 znajduje się na chromosomie 4q31 i składa się z dziewięciu egzonów oraz ośmiu intronów [4, 13]. Ekspresja IL-15 jest kontrolowana na wielu etapach: transkrypcji, translacji, transportu wewnątrzkomórkowego i translokacji. Choć mRNA kodująca IL-15 występuje powszechnie, do translacji i wydzielania białka w wielu komórkach dochodzi dopiero po ich aktywacji zachodzącej m.in. pod wpływem cytokin prozapalnych [13, 42, 47].

IL-15 występuje w dwóch formach splicingowych: SSP-IL-15 (ang. *short signal peptide*) oraz LSP-IL-15 (ang. *long signal peptide*), różniących się długością peptydu liderowego. Peptyd liderowy (peptyd sygnałowy) jest to krótka sekwencja aminokwasów, znajdująca się zazwyczaj na N-końcu niektórych białek, kierująca białko do konkretnego przedziału komórki. Peptyd liderowy krótszej formy IL-15 składa się z 21 aminokwasów, natomiast formy dłuższej z 48 aminokwasów [30]. W niektórych typach komórek ekspresji ulega tylko jedna z tych form, w innych obecne są oba białka [8]. Obie formy IL-15 charakteryzują się różną dystrybucją wewnątrzkomórkową, a także w różny sposób ulegają sekrecji. Początkowo wyniki badań sugerowały, że SSP-IL-15, czyli cząsteczka z krótszym peptydem liderowym jest magazynowana w cytoplazmie, podczas gdy LSP-IL-15 preferencyjnie jest wydzielana na zewnątrz komórki [13]. Niedawno dowiedziono jednak, że po utworzeniu kompleksu z podjednostką IL-15R α obie formy splicingowe mogą być wydzielane na zewnątrz komórki, a przy nieobecności tej podjednostki receptora lokują się wewnątrzkomórkowo, rozproszone w cytoplazmie [7, 8]. Ponadto wykazano, że SSP-IL-15 lokalizuje się w jądrze, gdzie wraz z podjednostką receptora IL-15R α reguluje transkrypcję genu IL-15 [8, 42]. Co ciekawe, mimo identycznej sekwencji aminokwasowej dojrzałej IL-15, obie formy wykazują częściowo odmienne właściwości. Przyczyną tego zjawiska są prawdopodobnie różnice w modyfikacji posttranslacyjnej obu białek zdeterminowane przez peptyd liderowy [8].

Dojrzała IL-15 zbudowana jest ze 114-aminokwasowego łańcucha [30]. Należy ona do rodziny cytokin zbudowanych z czterech α -helis (A, B, C i D), obejmującej również inne białka: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 i IL-9 [4, 30]. IL-15 wykazuje duże podobieństwo w strukturze drugo- i trzeciorzędowej do IL-2, mimo że ich

sekwencje aminokwasowe znacznie się różnią [17, 48]. Największą analogię do IL-2 przejawia w budowie helis A, C i D, które biorą udział w oddziaływaniu ze wspólnymi podjednostkami receptora IL-2/IL-15R β i γ_c [17, 56, 65]. IL-15 ma dwa mostki dwusiarczkowe w pozycjach Cys35-Cys85 i Cys42-Cys88, które stabilizują miejsce wiązania z podjednostką receptora IL-15R α [17, 30, 45].

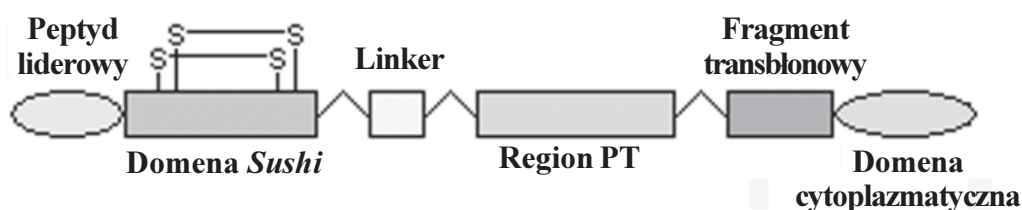
BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI RECEPTORA IL-15R

Receptor dla IL-15 (IL-15R) występuje w różnych typach komórek, jednak znaczne nasilenie jego ekspresji następuje dopiero po ich aktywacji [19, 30, 34]. Składa się on z trzech podjednostek: specyficznej dla IL-15 podjednostki α (IL-15R α); podjednostki β , którą współdzieli z IL-2 (IL-15/IL-2R β) oraz podjednostki γ_c , biorącej udział w wiązaniu większej grupy cytokin, m.in. IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 i IL-21 [13]. Receptor ten nie zawsze występuje w postaci heterotrimeru. Na niektórych typach komórek obecne są tylko jedna lub dwie podjednostki [1]. IL-15 może być wiązana przez heterodimer $\beta\gamma$ ze średnim powinowactwem ($K_d = 0,27 \cdot 10^{-9} - 13,5 \cdot 10^{-9}$ M [30, 40]). Obecność łańcucha IL-15R α wielokrotnie zwiększa powinowactwo tej cytokiny do receptora ($K_d = 10^{-11} - 5 \cdot 10^{-10}$ M [1]). IL-15 związana z podjednostką IL-15R α może tworzyć kompleks czwartorzędowy z heterodimerem $\beta\gamma$ obecnym na tej samej (kompleks *cis*), bądź innej komórce (kompleks *trans*) [46, 52] (ryc. 3). IL-15 może również wiązać się z heterodimerem IL-15R α ·IL-15/IL-2R β , jednak badania sugerują, że nie prowadzi to do wyzwolenia sygnału [13]. Aktywacja ścieżki sygnałowej następuje natomiast po związaniu IL-15 samej bądź związanej z IL-15R α z kompleksem IL 2/IL-15R β · γ_c [9].

Podjednostka IL-15R α

Podjednostka IL-15R α jest białkiem o masie 58–60 kDa występującym w formach o różnym stopniu N- i O-glikozytacji [7, 20, 29]. U ludzi gen *IL15R α* kodujący to białko zlokalizowany jest na chromosomie 10 na prążkach p14-p15 [1]. Aktualnie znanych jest osiem form splicingowych tej podjednostki [20, 52]. Ludzka IL-15R α zbudowana jest z 263 aminokwasów [29]. Istnieją doniesienia literaturowe sugerujące, że choć ma ona stosunkowo krótką, 41-aminokwasową, domenę cytoplazmatyczną [1, 29], to może wyzwać niektóre sygnały wewnątrzkomórkowe [47].

Strukturę mysiej i ludzkiej podjednostki IL-15R α określono na podstawie badań metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [35] oraz pomiarów krystalograficznych [17, 45]. Różnice w jej strukturze u człowieka i myszy są niewielkie [17, 45]. Poniżej omówiono budowę ludzkiej formy tego białka. Podjednostka IL-15R α ma we fragmencie pozakomórkowym jedną, niezbędną do wiązania IL-15, tzw. domenę '*sushi*', charakterystyczną dla wielu oddziaływań białko-białko [17, 66]. Domena ta składa się z 66 aminokwasów i zawiera dwa mostki dwusiarczkowe w pozycjach Cys4-Cys46 i Cys30-Cys64, konieczne do utworzenia struktury trzeciorzędowej białka [51, 66]. Zbudowana jest ona z sześciu nici β (B, C, C', D, E, E'), z których fragmenty C, D i E tworzą charakterystyczną dla domeny *sushi*



RYCINA 1. Budowa IL-15R α . Ludzkie białko IL-15R α zbudowane jest z 32-aminokwasowego fragmentu sygnałowego, 173-aminokwasowej domeny zewnątrzkomórkowej (domena sushi, linker, region PT), fragmentu transbłonowego o długości 21 aminokwasów i 37-aminokwasowej domeny cytoplazmatycznej [13, 52]

FIGURE 1. Schematic structure of IL-15R α . Human IL-15R α consists of a 32-amino acid signal peptide, 173-amino acid extracellular domain (*sushi* domain, linker, PT region), 21-amino acid transmembrane domain and 37-amino acid cytoplasmic domain [13, 52]

formę β -kartki [17, 35, 45]. Ponadto, podjednostka IL-15R α w części usytuowanej bliżej błony komórkowej zawiera bogaty w reszty treoniny i proliny region PT oraz łączący go z domeną *sushi* linker [17, 29]. Schematyczną budowę podjednostki α przedstawiono na rycinie 1. Oprócz opisanej wyżej formy IL-15R α , w krążeniu występuje również niezwiązana z błoną komórkową krótsza forma tej podjednostki receptora, sIL-15R α , o wielkości około 42 kDa. Powstaje ona po trawieniu IL-15R α przez metaloproteinazy [12, 39]. Może ona funkcjonować jako naturalny inhibitor kompetycyjny dla IL-15R α , zmniejszający ilość IL-15 związanej z receptorem błonowym [39].

Podjednostki IL-2/IL-15R β i γ_c

Ludzka podjednostka IL-2R β jest białkiem o masie 70 kDa i długości 525 aminokwasów. Zawiera 214-aminokwasowy fragment pozakomórkowy, 25-aminokwasowy hydrofobowy fragment transbłonowy i 286-aminokwasową domenę cytoplazmatyczną, a całość poprzedzona jest po stronie N-końca 26-aminokwasowym fragmentem sygnałowym [31].

Ludzka podjednostka γ_c ma masę 64 kDa i składa się z 369 aminokwasów. Zbudowana jest z 22-aminokwasowego fragmentu sygnałowego, 233-aminokwasowego fragmentu pozakomórkowego, 28-aminokwasowego łańcucha transbłonowego i domeny cytoplazmatycznej o długości 86 aminokwasów [59]. Więcej informacji na temat budowy i właściwości tych podjednostek zawarto w pracach przeglądowych [37, 58].

WIĄZANIE IL-15 Z RECEPTOREM IL-15R

Wiązanie IL-15 z IL-15R α

IL-15 jest wiązana przez podjednostkę IL-15R α z wysokim powinowactwem ($K_d = 1 \cdot 10^{-11}$ – $100 \cdot 10^{-11}$ M [1, 9, 29, 40]). Ostatnie badania dowodzą, że wiązanie to może następować już wewnątrzkomórkowo, zanim obydwa białka zostaną przetransportowane na powierzchnię błony [7, 52]. Po powstaniu kompleksu,

podjednostka IL-15R α ulega pełnej *O*-glikozylacji i przemieszcza się na powierzchnię błony [7]. Wtedy może dojść do uwolnienia aktywnego biologicznie heterodimeru IL-15·sIL-15R α . IL-15 związana z sIL-15R α wykazuje znacznie większą stabilność niż wolna IL-15, m.in. dzięki unikaniu degradacji przez proteasomy prowadzącemu do wydłużenia okresu półtrwania [8]. Dzięki temu cytokina ta może ulegać obszernej dystrybucji i wykazywać aktywność biologiczną w miejscach znacznie oddalonych od miejsca ekspresji [7, 8, 21, 41].

Jak wspomniano wcześniej, na zewnątrz komórki może być wydzielana zarówno IL-15 z krótkim (SSP-IL-15), jak i długim (LSP-IL-15) peptydem liderowym i następuje to zazwyczaj po związaniu z podjednostką IL-15R α [8]. Po opuszczeniu komórki oba kompleksy nie wykazują różnic w aktywności, która zależy jedynie od ich stężenia we krwi. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że peptyd liderowy determinuje stabilność i sekrecję obu form. Kompleks SSP-IL-15·IL-15R α jest wydzielany w znacznie mniejszej ilości niż LSP-IL-15·IL-15R α [8]. Ponadto, SSP-IL-15 ulegając w tej samej komórce koekspresji z LSP-IL-15, zachowuje się jak inhibitor kompetycyjny konkurując o wiązanie z podjednostką IL-15R α , a w kompleksie z nią wykazując mniejszą stabilność niż LSP-IL-15. W rezultacie, ilość aktywnej IL-15 we krwi jest mniejsza niż w przypadku, gdy ekspresji ulega jedynie LSP-IL-15. Wydaje się prawdopodobne, że w komórkach, w których obecne są obie formy, SSP-IL-15 może pełnić funkcję regulatora aktywności IL-15 [8].

Model kompleksu IL-15·IL-15R α opracowano korzystając z pomiarów NMR [35] oraz badań krystalograficznych [17, 45], wspierając się modelem kompleksu IL-2·IL-2R α . Wiązania IL-15 z IL-15R α tworzą wąskie, sąsiadujące ze sobą, dobrze dopasowane powierzchnie o wielkości około 10 x 25 Å [17]. Podczas wiązania pętla C'D receptora wpasowuje się we wklęsłość utworzoną przez pętle AB i CD oraz helisę B IL-15 (ryc. 2A) [17]. W miejscu wiążącym receptora występują w większości zasadowe reszty aminokwasów, podczas gdy ligand w miejscu wiązania ma charakter kwaśny. Taki układ zapewnia silne oddziaływania elektrostatyczne na dużej powierzchni [17, 45]. W przeciwieństwie do większości kompleksów typu cytokina-receptor, w miejscu wiązania IL-15 z IL-15R α znajduje się niewiele hydrofobowych reszt aminokwasowych [35]. Co więcej zastąpienie ich w obrębie IL-15 silnie hydrofilowymi, kwaśnymi resztami asparaginowymi, znacznie zwiększa powinowactwo tej cytokiny do receptora [35].

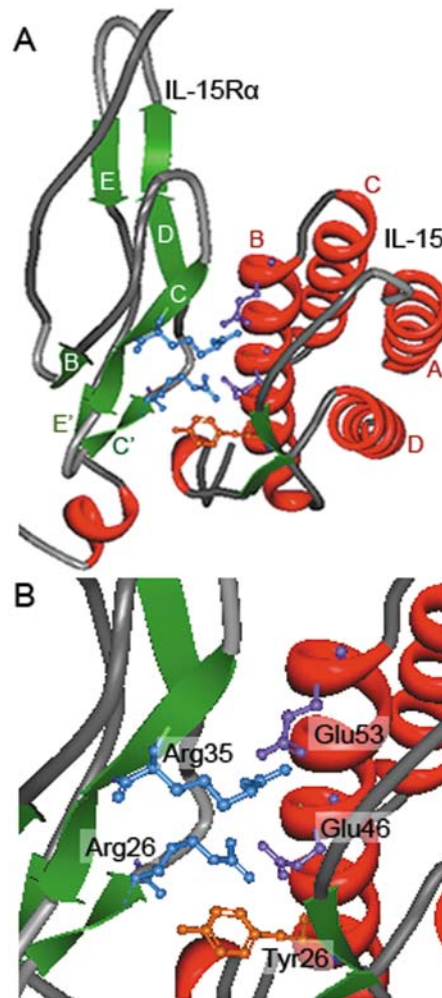
Parametry termodynamiczne oddziaływań pomiędzy IL-15 i IL-15R α scharakteryzowano dopiero w 2009 roku [51]. W miejscu wiązania tych dwóch cząsteczek można wyróżnić trzy regiony najsilniej wpływające na energię oddziaływań pomiędzy nimi. W regionie pierwszym, położonym po środku powierzchni wiązania, wyróżniono aminokwasy o krytycznym znaczeniu dla tworzenia kompleksu. Są to IL-Tyr26, IL-Glu46 i R-Arg35 (gdzie: IL i R oznaczają odpowiednio aminokwasy w obrębie IL-15 i podjednostki IL-15R α) (ryc. 2B). IL-Glu46 tworzy mostek solny z R-Arg35, natomiast IL-Tyr26, położona w pobliżu tego mostka, tworzy wiązanie wodorowe z karboksylowym atomem tlenu R-Arg35. W drugim regionie duży wpływ na energię wiązania ma mostek solny pomiędzy IL-Glu53 a R-Arg26. Trzeci rejon położony jest w regionie PT, tuż obok domeny *sushi*. Bardzo dobre dopasowanie struktur IL-15 oraz IL-15R α w tym miejscu znacząco zwiększa wzajemne powinowactwo tych cząsteczek [51].

Sumarycznie, w wiązaniu IL-15 z IL-15R α bierze udział 31 reszt aminokwasowych, które tworzą siedemnaście oddziaływań van der Waalsa, osiem wiązań wodorowych i dwa mostki solne [17]. Istotnym elementem stabilizującym strukturę kompleksu są dwie cząsteczki wody tworzące sieć wiązań wodorowych łączących reszty IL-Glu53 oraz R-Arg35 [51]. Stabilizują one mostki solne pomiędzy resztami aminokwasów liganda i receptora w regionie 1 i 2 [17, 51]. Wysokie powinowactwo IL-15 do IL-15R α jest związane z niezmiernie niską wartością stałej dysocjacji kompleksu IL-15-IL-15R α [51].

Wiązanie IL-15 z IL-2/IL-15R β i γ_C

Oprócz specyficznego wiązania z IL-15R α , IL-15 może również przyłączyć się do heterodimeru zbudowanego z podjednostek IL-2R β i γ_C . Jest to tak zwany receptor IL-15R o średnim powinowactwie ($K_d = 0,27 \cdot 10^{-9} - 13,5 \cdot 10^{-9}$ M [30, 40]).

Bardzo ciekawy wydaje się fakt, że IL-15 może być prezentowana przez podjednostkę α swojego receptora komórkom, na których obecne są jedynie podjednostki IL-2/IL-15R β i γ_C [13, 17]. W ten sposób IL-15 jest ujawniana limfocytom T i B przez komórki prezentujące antygen [17]. Z dotychczas przeprowadzonych badań wynika, że taki sposób wiązania IL-15 (kompleks *trans*) ma duże znaczenie biologiczne. Niektórzy autorzy postulują nawet, że występuje ono częściej niż wiązanie IL-15 przez pojedyncze komórki (kompleks *cis*) [52]. Ponadto, IL-15 w kompleksie z podjednostką IL-15R α znacznie efektywniej przekazuje sygnał podjednostkom IL-2/IL-15R β i γ_C , niż w formie niezwiązanej. Może to



RYCINA 2. Wiązanie IL-15 z IL-15R α . (A) Kolorem czerwonym zaznaczono α -helisy, kolorem zielonym β -struktury. (B) Wyróżnienie najważniejszych aminokwasów biorących udział w wiązaniu IL-15 z IL-15R α . Dokładny opis w tekście. Rysunek sporządzono za pomocą programu PDB ProteinWorkshop 3.9 korzystając ze struktury kompleksu 2Z3Q [17] uzyskanego z bazy struktur krystalograficznych (www.rcsb.org)

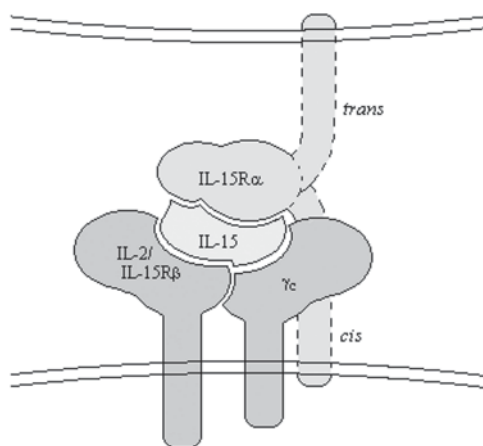
FIGURE 2. IL-15 and IL-15R α complex. (A) α -helices are shown in red, β -structures in green. (B) The amino acids of critical importance for IL-15 and IL-15R α binding. The precise description is given in the text. The figure was prepared using the PDB Protein Workshop 3.9 program using the model of the complex 2Z3Q [17] from the Protein Data Bank website (www.rcsb.org)

sugerować, że po związaniu z IL-15R α konformacja cytokiny ulega niewielkim zmianom ułatwiającym jej wiązanie z pozostałymi podjednostkami receptora.

Opisywane przez badaczy różne sposoby wiązania IL-15 z komórkami (kompleks *cis* lub *trans*) przyczyniły się do podjęcia rozważań nad sposobem jej oddziaływania z podjednostką IL-15R α , umożliwiającym różnorodne ułożenie przestrzenne wszystkich podjednostek receptora. Olsen i wsp. zaproponowali, że jest to możliwe dzięki budowie IL-15R α po stronie C-końca. Obecny tam 32-aminokwasowy linker oraz 74-aminokwasowy region PT wykazują dużą giętkość, co umożliwia różny sposób ułożenia części wiążącej IL-15R α . Dzięki temu, bez względu na to, czy wszystkie trzy podjednostki będą obecne na jednej komórce, czy nie, wiązania w czwartorzędowym kompleksie IL-15·IL-15R α ·IL-2R β · γ_c będą miały taki sam układ [45] (ryc. 3).

ZWIĄZKI HAMUJĄCE AKTYWNOŚĆ IL-15

W większości badań prowadzonych na eksperymentalnych modelach chorób związanych z nadmierną ekspresją IL-15, hamowanie aktywności biologicznej IL-15 osiągane jest poprzez stosowanie związków oddziałujących bezpośrednio z tą cytokiną bądź jej receptorem. Do blokowania IL-15 wykorzystuje się przeciwciała



RYCINA 3. Schemat wiązania IL-15 z podjednostkami receptora IL-15R α , IL-2/IL-15R β i γ_c występującymi na tej samej komórce (*cis*) bądź na różnych komórkach (*trans*). Rycina przedstawia identyczny sposób wiązania IL-15 przez wszystkie trzy podjednostki. Jest to możliwe dzięki znacznej długości oraz dużej giętkości C-końcowego łańcucha podjednostki IL-15R α (linia przerywana) [45]

FIGURE 3. Schematic presentation of IL-15 binding with its receptor subunits IL-15R α , IL-2/IL-15R β and γ_c expressed on the surface of the same (*cis*) or different (*trans*) cell. Due to the length and high flexibility of the C-terminal chain of the IL-15R α subunit (dashed line) the mechanism of the binding may be identical in both configurations [45]

monoklonalne rozpoznające IL-15 lub rozpuszczalne formy rekombinowanej podjednostki IL-15R α . Z kolei, do blokowania receptora stosuje się przeciwciała skierowane przeciwko podjednostkom receptora IL-15R lub zmodyfikowane formy IL-15. Stosowane dotychczas metody inhibicji IL-15 wykorzystujące oddziaływanie z nią bądź jej receptorem zestawiono w tabeli 1. Ponadto znane są także inne sposoby hamowania aktywności IL-15 niezwiązane bezpośrednio z oddziaływaniem z elementami jej kompleksu z receptorem. Poniżej opisano najważniejsze stosowane dotychczas strategie blokowania aktywności biologicznej IL-15.

ZWIĄZKI WIĄŻĄCE SIĘ Z IL-15

Przeciwciała skierowane przeciwko IL-15

Bernard i wsp. wyodrębnili kilka przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko IL-15 [9]. Jedno z nich, B-E29, wykazało hamowanie wiązania IL-15 do komórek białaczki promielocytowej linii TF-1 ($IC_{50} = 172$ pM). Wiąże się ono z

TABELA 1. Związki hamujące aktywność IL-15 przez oddziaływanie z nią bądź jej receptorem
TABLE 1. Inhibitors of IL-15 interrupting the IL-15 and IL-15R interactions

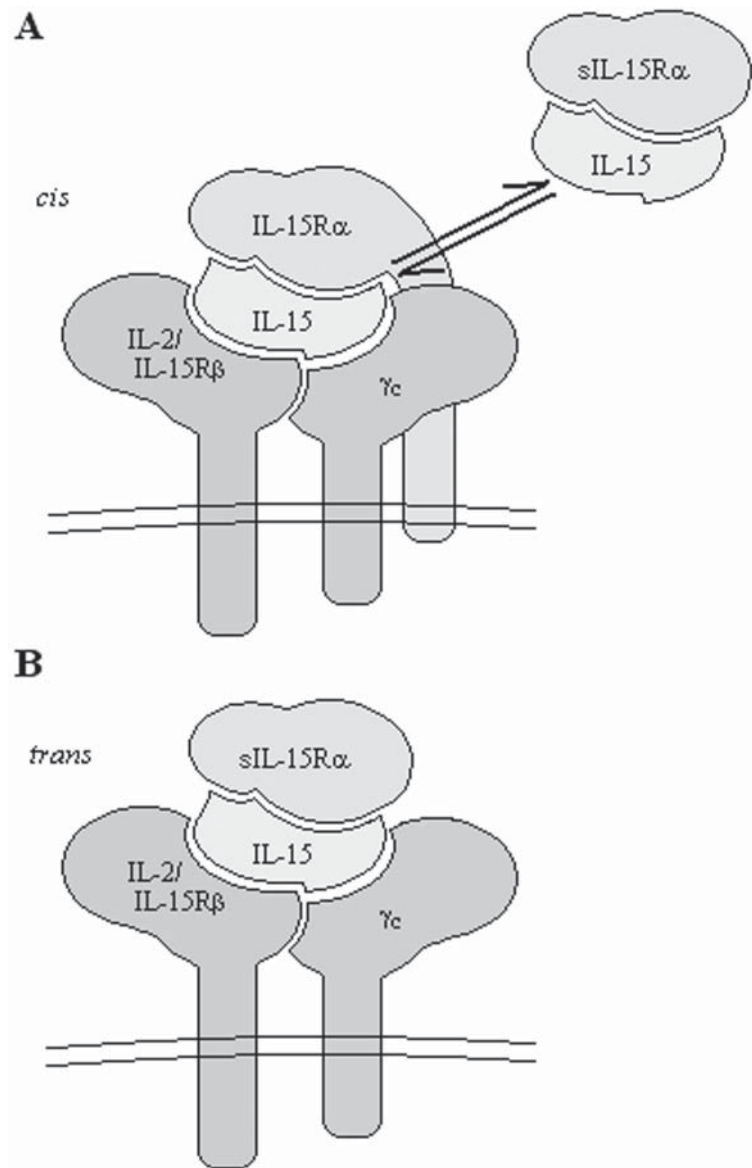
Rodzaj	Nazwa	Cel	Właściwości, uwagi	Literatura
Przeciwciała monoklonalne przeciwko IL-15	Anti-IL-15 B-E29	IL-15	Wiązanie z sekwencją ⁶¹ DTVENLILANN ⁷² na helisie C IL-15; hamowanie wiązania z IL-15R α	[9]
	Anti-IL-15 MAB247	IL-15	Wiązanie z sekwencją ¹⁰² SFVHIVQMFIN ¹¹² na helisie D IL-15; hamowanie wiązania z IL-2/IL-15 β i/lub γ_c	[9]
	DISC0280	IL-15	Ludzkie przeciwciało monoklonalne IgG1 przeciwko IL-15	[26]
	HuMax-IL15 (146B7, AMG714)	IL-15	Ludzkie przeciwciało monoklonalne IgG1 przeciwko IL-15; I/II faza badań klinicznych	[5, 62]
Przeciwciała monoklonalne przeciwko IL-15R	HuMik β 1	IL-2R β	Humanizowane przeciwciało przeciwko IL-2R β	[49, 60]
	BF-IgG	IL-2R $\alpha\beta$	Dwufunkcyjne przeciwciało przeciw podjednostkom α i β receptora dla IL-2, o aktywności również wobec IL-15R	[49]
	M161	IL-15R α	Humanizowane przeciwciało przeciwko IL-15R α	[9]
Mutanty IL-15	E64K	IL-15R α	Mutacja: Glu64 zastąpiony Lys; wiązanie IL-15R α , hamowanie dalszego wiązania z IL-2/IL-15R β i γ_c	[9]
	I68D	IL-15R α	Mutacja: Ile68 zastąpiona Asp; wiązanie z IL-15R α , hamowanie dalszego wiązania z IL-2/IL-15R β i γ_c	[9]
	N65K	IL-15R α	Mutacja: Asn65 zastąpiona Lys; wiązanie z IL-15R α , przy jednoczesnym hamowaniu aktywności biologicznej kompleksu IL-15-IL-15R α	[9]
	mutant IL-15 /Fc γ 2a (CRB-15)	IL-15R α	Białko fuzyjne mutant IL-15 /Fc γ 2a; mutacje w IL-15: Glu101 i Glu108 zastąpione Asp	[23, 32]
Immuno-toksyny	IL15-PEA Δ 293 (IT1)	Komórki z IL-15R	Białko fuzyjne złożone z IL-15 i endotoksyny <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[43]
	IL15M-PEA Δ 293 (IT2)	Komórki z IL-15R	Białko fuzyjne złożone z antagonisty IL-15 i endotoksyny <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[44]
Fragmenty IL-15R α	sIL-15R α	IL-15	Pozakomórkowy fragment IL-15R α (193 aa, 26 kDa)	[50, 55]
	T1	IL-15	Pozakomórkowy fragment IL-15R α (182 aa)	[66]
	T2	IL-15	Domena sushi + linker IL-15R α (85 aa)	[66]
	T3	IL-15	Domena sushi IL-15R α (65 aa)	[66]

IL-15 w obrębie sekwencji ⁶¹DTVENLILANN⁷², należącej do helisy C, blokując w ten sposób wiązanie IL-15 do podjednostki IL-15R α [9]. W 2011 roku opisano podobne do B-E29 i wiążące się z IL-15 w zbliżonym miejscu przeciwciało DISC0280 [26]. Blokując ono wiązanie IL-15 z podjednostką IL-15R α oraz z heterodimerem IL-2/IL-15R β - γ_c , hamując aktywność tej cytokiny *in vitro*. Właściwości te ograniczone są do ludzkiej IL-15, natomiast nie ujawniają się wobec cytokiny mysiej i szczurzej. Co ciekawe, przeciwciało DISC0280 w warunkach *in vivo* wykazuje efekt hiperagonistyczny, zwiększając aktywność egzogennej IL-15 [26]. Ten niezwykle efekt nie został dotychczas wyjaśniony, jednak badacze przypuszczają, że może to być związane z wydłużeniem okresu półtrwania IL-15 po związaniu z przeciwciałem, bądź ułatwieniem *trans*-prezentacji IL-15 komórkom NK [26].

Kolejne obiecujące przeciwciało, MAB247, pomimo braku wpływu na wiązanie IL-15 z IL-15R α , hamuje przekazywanie sygnału. Dokładniejsze badania dowiodły, że wiąże się ono z sekwencją ¹⁰²SFVHVQMFN¹¹² zlokalizowaną na helisie D IL-15, która prawdopodobnie jest zaangażowana w wiązanie tej cytokiny z podjednostką γ_c [9]. W ten sposób zablokowane jest przekazywanie sygnału przez heterodimer $\beta\gamma_c$. Podobne właściwości wykazuje HuMax-IL-15, jedno z najbardziej znanych przeciwciał blokujących aktywność IL-15. Jest to przeciwciało monoklonalne 146B7, znane też pod nazwą AMG714, wiążące się z IL-15 we fragmencie oddziałującym z podjednostką γ_c receptora IL-15R [62]. Przeciwciało to znacznie efektywniej hamuje aktywność IL-15 niż przeciwciała blokujące wiązanie IL-15 z podjednostką IL-15R α [62]. Jak wspomniano wcześniej, IL-15 łączy się z podjednostką IL-15R α z bardzo wysokim powinowactwem. Co więcej, większość IL-15 obecnej w organizmie występuje w formie związanej z tą podjednostką. Oznacza to, że potencjalny inhibitor wiążący się z IL-15 w miejscu oddziaływania cytokiny z podjednostką IL-15R α , powinien wykazywać względem niej wyższe powinowactwo niż IL-15R α . Z tego względu lepszy efekt inhibicji uzyskano dla przeciwciała HuMax-IL-15, które nie interferowało z wiązaniem IL-15 z IL-15R α , a zaburzało oddziaływanie tego kompleksu z podjednostką γ_c [62]. Aktywność biologiczną tego przeciwciała potwierdzono w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* [62], a także przeprowadzono dobrze rokujące próby kliniczne na chorych z RZS [5].

Polipeptydy o budowie zbliżonej do budowy IL-15Ra

Już pod koniec lat 90. ub. wieku pojawiły się doniesienia o skutecznym hamowaniu aktywności IL-15 poprzez stosowanie egzogennych, rozpuszczalnych form podjednostki α receptora IL-15R (sIL-15R α) [50] (ryc. 4A). Parę lat później przeprowadzono badania mające na celu określenie, które fragmenty IL-15R α są niezbędne do wiązania IL-15. Wei i wsp. wykazali, że minimalny fragment rozpuszczalnej formy podjednostki IL-15R α , skutecznie hamujący aktywność IL-15, to 65-aminokwasowa domena *sushi* [66]. Nowsze badania sugerowały, że dopiero obecność 13-aminokwasowego fragmentu przylegającego do C-końca tej domeny nadaje jej właściwości antagonistycznych względem trimery IL-15R $\alpha\beta\gamma$ [10].



RYCINA 4. Rozpuszczalna forma podjednostki α receptora IL-15R, sIL-15R α , może działać wobec receptora IL-15R antagonistycznie (A), lub agonistycznie (B)

FIGURE 4. A soluble form of the α subunit of IL-15R, sIL-15R α , may act as IL-15R antagonist (A), or agonist (B)

Wykazano jednak, że pewne fragmenty rekombinowanej podjednostki sIL-15R α , zawierające domenę *sushi*, mogą działać agonistycznie wobec heterodimeru $\beta\gamma$ [10, 40, 57]. Wydaje się prawdopodobne, że sIL-15R α wiążąc IL-15 prezentuje ją komórkom zawierającym heterodimer $\beta\gamma$, podobnie jak to się dzieje w kompleksie *trans* IL-15 z podjednostką IL-15R α związaną z komórkami [40] (ryc. 4B). Z tego względu rozpuszczalne analogi podjednostki IL-15R α nie mogą być uniwersalnie stosowane jako inhibitory IL-15.

Związki wiążące się z receptorem IL-15R

Działanie receptora IL-15R można selektywnie zahamować poprzez zablokowanie podjednostki IL-15R α , która jest specyficzna jedynie dla IL-15. Blokada pozostałych dwóch podjednostek (IL-2/IL-15R β i γ_c) również zmniejsza aktywność biologiczną IL-15, jednak, ponieważ podjednostki te są aktywowane również przez inne cytokiny, zablokowanie ich hamuje także inne szlaki sygnałowe. Z tego względu większość badań nad związkami celującymi w receptor IL-15R dąży do hamowania podjednostki IL-15R α .

Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko IL-15R

Pierwszymi przeciwciałami zastosowanymi do hamowania aktywności IL-15 były przeciwciała blokujące receptor dla IL-2 (IL-2R). Przeciwciało humanizowane HuMiK β 1 skierowane przeciwko wspólnej dla IL-2 i IL-15 receptorowej podjednostce β , oprócz hamowania aktywności IL-2 wykazuje także właściwości antagonistyczne wobec IL-15 [49, 60]. Również dwufunkcyjne humanizowane przeciwciało skierowane przeciwko IL-2R $\alpha\beta$, BF-IgG, hamuje odpowiedź proliferacyjną limfocytów T indukowaną przez IL-15 [49]. Prawdopodobnie utrudnia ono oddziaływanie pomiędzy podjednostkami IL-15R α i IL-2/IL-15R β [49]. Bardziej specyficzne właściwości względem IL-15 wykazuje natomiast przeciwciało skierowane przeciwko IL-15R α , M161, które praktycznie całkowicie hamuje wiązanie IL-15 do receptora ($IC_{50} = 100$ pM) [9].

Polipeptydy o budowie zbliżonej do budowy IL-15

Podczas badań mających na celu określenie miejsc wiążących IL-15 i IL-15R zidentyfikowano kilka mutacji IL-15 w obszarze helis B i C (sekwencje odpowiednio 44–52 i 64–68) wpływających na wzajemne oddziaływanie tych białek oraz przekazywanie sygnału. Właściwości antagonistyczne względem IL-15 ma kilka mutantów IL-15: E64K, N65K, I68D [9]. Wiążą się one z podjednostką IL-15R α z wysokim powinowactwem, blokując w ten sposób dostęp natywnej IL-15 do receptora, a przy tym nie powodują wyzwolenia sygnału [9, 32].

Białka fuzyjne

Podstawowym problemem podczas projektowania zmodyfikowanych cząsteczek IL-15 o właściwościach antagonistycznych względem receptora IL-15R, jest krótki okres półtrwania $t_{1/2}$ tych cząsteczek *in vivo*. Stosowanie ich jako leków wymaga-

łoby częstego podawania, co utrudniłoby ich praktyczne stosowanie. Problem ten można ominąć łącząc odpowiednio zmodyfikowaną IL-15 z łańcuchem ciężkim przeciwciała IgG. Strategię tę wykorzystano przy projektowaniu białka fuzyjnego CRB-15. Połączenie zmodyfikowanej IL-15 z fragmentem Fc przeciwciała IgG2a umożliwiło zwiększenie okresu półtrwania $t_{1/2}$ cytokiny w warunkach *in vivo* z 2–3 minut do 6 godzin. Z kolei właściwości antagonistyczne tego białka fuzyjnego wobec IL-15R α wywołane są modyfikacjami w obszarze C-końcowym IL-15, w którym dwie reszty kwasu glutaminowego (Glu101 i Glu108) zastąpiono resztami kwasu asparaginowego [32]. Mutacje te uniemożliwiają aktywację ścieżki sygnałowej, biorącej udział w indukcji proliferacji komórek [32]. Badania *in vitro* potwierdziły blokowanie przez CRB-15 proliferacji komórek indukowanej przez IL-15 [32, 48]. Inne badania dowiodły, że dzięki inhibicji aktywacji i proliferacji limfocytów T CD8⁺ w warunkach *in vivo*, zastosowanie tego białka u myszy zwiększa czas przeżycia przeszczepu [25, 69]. Ponadto wykazano, że u myszy zapobiega ono powstawaniu i rozwojowi zapalenia stawów indukowanego kolagenem [24]. Hamowanie aktywności podjednostki IL-15R α przez CRB-15 wpływa również na zmniejszenie ekspresji cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL-6, IL-17 i TNF- α [24].

Obecność łańcucha Fc w białku fuzyjnym CRB-15 zapewnia mu nie tylko wydłużenie okresu półtrwania, ale również nadaje właściwości cytotoksycznych w stosunku do komórek mających IL-15R na swojej powierzchni. Dzięki temu eliminowane są komórki uczestniczące w wiązaniu i przekazywaniu sygnału przez IL-15 [24]. Podobne właściwości wykazują immunotoksyny zaprojektowane przez Niu i wsp. [43, 44]. Są to białka fuzyjne złożone z fragmentu egzotoksyny PE produkowanej przez pałeczkę ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* oraz z IL-15 (IL-15 PE Δ 293; IT1), bądź jej fragmentu o właściwościach antagonistycznych (IL-15M PE Δ 293; IT2). Egzotoksyna PE jest proenzymem, który dostaje się do wnętrza komórki w drodze endocytozy, gdzie ulega aktywacji i poprzez inhibicję czynnika elongacji 2 (ang. *elongation factor 2*, EF-2) hamuje syntezę białek. Prowadzi to do śmierci komórki. Powyższe właściwości egzotoksyny PE, po modyfikacji jej domeny wiążącej, wykorzystuje się w terapiach celowanych [27]. Zaprojektowane przez Niu i wsp. immunotoksyny specyficznie rozpoznają komórki, na których powierzchni obecny jest receptor IL-15R i prowadzą do ich apoptozy. Badania *in vivo* wykazały efektywność tych związków w eliminowaniu aktywowanych limfocytów T i makrofagów u szczurów z indukowanym zapaleniem stawów [64]. W ten sposób usuwane są komórki wiążące się i odpowiadające na stymulację IL-15. Stwarza to potencjalne możliwości zastosowania klinicznego u chorych, u których nadmierna aktywność tych komórek prowadzi m.in. do chorób autoimmunologicznych.

Związki niewiążące się ani z IL-15, ani z IL-15R

Powyżej opisano związki oddziałujące bezpośrednio z elementami kompleksu IL-15·IL-15R. Oprócz nich znane są również cząsteczki modyfikujące aktywność IL-15 inaczej niż poprzez blokowanie jej wiązania z receptorem. Związki te omówiono poniżej.

Deksametazon, lek przeciwzapalny i immunosupresyjny z grupy syntetycznych glikokortykosteroidów, hamuje ekspresję podjednostki IL-15R α w jednojądrzastych

komórkach krwi obwodowej – PBMCs (ang. *peripheral blood mononuclear cells*) [15]. Kolejnym lekiem o działaniu immunosupresyjnym i cytostatycznym jest antymetabolit kwasu foliowego, metotreksat [6, 11]. Badania dowiodły, że znacząco zmniejsza on sekrecję IL-15 w fibroblastach błony maziowej stawów chorych z RZS [38]. Wpływ na produkcję IL-15 ma również wyciąg z rośliny *Pelargonium sidoides*, którego właściwości przeciwbakteryjne i przeciwbólowe wykorzystywane są w medycynie ludowej Południowej Afryki. Badania jego właściwości immunomodulacyjnych wykazały, że hamuje on syntezę IL-6 i IL-15, zmniejszając ich stężenie we krwi i w komórkach nabłonka jamy nosowej [36].

Ushio i wsp. zsyntetyzowali kilka pochodnych leflunomidu, leku immunosupresyjnego o działaniu antyproliferacyjnym względem limfocytów T. Jedną z nich, Y-320, hamuje aktywację limfocytów T indukowaną IL-15 oraz ogranicza zapalenie stawów indukowane kolagenem u myszy i małp z rodziny makakowatych [16, 61]. Nie określono jednak, w jaki sposób związek ten zmniejsza aktywność IL-15.

PODSUMOWANIE

IL-15 jest cytokiną o plejotropowym działaniu, wykazującą szerokie spektrum aktywności. Coraz częściej umieszcza się ją na szczycie kaskady cytokin prozapalnych. Zaburzenie ekspresji IL-15 bezpośrednio przyczynia się do rozwoju procesów zapalnych, autoimmunologicznych, zakaźnych i nowotworowych. Od czasu odkrycia IL-15 przeprowadzono wiele badań, mających na celu sprecyzowanie indukowanych przez nią ścieżek sygnalizacyjnych, określenie sposobów jej aktywacji i możliwości kontrolowania jej aktywności biologicznej. Ze względu na złożony i nietypowy mechanizm ekspresji oraz wiązania IL-15 z receptorem, tradycyjne metody hamowania aktywności receptora poprzez zastosowanie związków imitujących ligand, okazały się mało skuteczne. Również wiązanie IL-15 przez rozpuszczalne formy podjednostki IL-15R α nie zawsze prowadzi do jej inhibicji, a wręcz może wzmacniać aktywność biologiczną tej cytokiny. Skuteczniejsze wydają się być przeciwciała monoklonalne, wiążące się z IL-15 w sposób zakłócający oddziaływanie z podjednostką IL-15/IL-2R β lub γ_c . Nie muszą one konkurować z wiązaniem o wysokim powinowactwie, które występuje pomiędzy IL-15 a IL-15R α . Wszystkie stosowane dotychczas strategie hamowania IL-15, choć wydają się skuteczne, do dziś wykorzystywane są tylko w warunkach doświadczalnych. Można mieć nadzieję, że postęp badań i kolejne informacje na temat dokładnej struktury oraz sposobu oddziaływania IL-15 z receptorem przybliżą nas do zrozumienia skomplikowanych interakcji prowadzących do wyzwolenia sygnału przez IL-15. Być może już w najbliższym czasie zasób wiedzy specjalistycznej w tej dziedzinie będzie wystarczający, aby zaprojektować związek skutecznie hamujący aktywność IL-15. Byłby to przełom w leczeniu wielu chorób zapalnych i autoimmunologicznych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDERSON DM, KUMAKI S, AHDIEH M, BERTLES J, TOMETSKO M, LOOMIS A, GIRI J, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, VALENTINE V, SHAPIRO DN, MORRIS SW, PARK LS, COSMAN D. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor α chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 29862–29869.
- [2] BANNWART CF, MARTINS RA, NAKAIRA-TAKAHASHI E, DIAS-MELICIO LA, SOARES AM, PERACOLI MT. Interleukin-15 augments oxidative metabolism and fungicidal activity of human monocytes against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; **105**: 866–872.
- [3] BASAK GW, LASEK W. Rola interleukiny 15 w patogenezie oraz terapii chorób człowieka. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 327–347.
- [4] BASAK GW, LASEK W. Interleukina 15: Charakterystyka i aktywność w warunkach fizjologicznych. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 303–325.
- [5] BASLUND B, TVEDE N, DANNESKIOLD-SAMSOE B, LARSSON P, PANAYI G, PETERSEN J, PETERSEN LJ, BEURSKENS FJM, SCHUURMAN J, VAN DE WINKEL JGJ, PARREN PWHI, GRACIE JA, JONGBLOED S, LIEW FY, MCINNES IB. Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: A proof-of-concept study. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 2686–2692.
- [6] BENEDEK TG. Methotrexate: From its introduction to non-oncologic therapeutics to anti-TNF- α . *Clin Exp Rheumatol* 2010; **28**, suppl. 61: 3-8.
- [7] BERGAMASCHI C, ROSATI M, JALAH R, VALENTIN A, KULKARNI V, ALICEA C, ZHANG GM, PATEL V, FELBER BK, PAVLAKIS GN. Intracellular interaction of interleukin-15 with its receptor α during production leads to mutual stabilization and increased bioactivity. *J Biol Chem* 2008; **283**: 4189–4199.
- [8] BERGAMASCHI C, JALAH R, KULKARNI V, ROSATI M, ZHANG GM, ALICEA C, ZOLOTUKHIN AS, FELBER BK, PAVLAKIS GN. Secretion and biological activity of short signal peptide IL-15 is chaperoned by IL-15 receptor alpha *in vivo*. *J Immunol* 2009; **183**: 3064–3072.
- [9] BERNARD J, HARB C, MORTIER E, QUÉMÉNER A, MELOEN RH, VERMOT-DESROCHES C, WIJDENESS J, VAN DIJKEN P, GRÖTZINGER J, SLOOTSTRA JW, PLET A, JACQUES Y. Identification of an interleukin-15 α receptor-binding site on human interleukin-15. *J Biol Chem* 2004; **279**: 24313–24322.
- [10] BOUCHAUD G, GARRIGUE-ANTAR L, SOLÉ V, QUÉMÉNER A, BOUBLIK Y, MORTIER E, PERDREAU H, JACQUES Y, PLET A. The Exon-3-Encoded Domain of IL-15R α Contributes to IL-15 High-Affinity Binding and Is Crucial for the IL-15 Antagonistic Effect of Soluble IL-15R α . *J Mol Biol* 2008; **382**: 1–12.
- [11] BRAUN J, RAU R. An update on methotrexate. *Curr Opin Rheumatol* 2009; **21**: 216–223.
- [12] BUDAGIAN V, BULANOVA E, ORINSKA Z, LUDWIG A, ROSE-JOHN S, SAFTIG P, BORDEN EC, BULFONE-PAUS S. Natural soluble interleukin-15R α is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE/ADAM17). *J Biol Chem* 2004; **279**: 40368–40375.
- [13] BUDAGIAN V, BULANOVA E, PAUS R, BULFONE-PAUS S. IL-15/IL-15 receptor biology: A guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; **17**: 259–280.
- [14] CARROLL HP, PAUNOVIC V, GADINA M. Signalling, inflammation and arthritis: Crossed signals: the role of interleukin-15 and -18 in autoimmunity. *Rheumatology* 2008; **47**: 1269–1277.
- [15] CHAE DW, NOSAKA Y, STROM TB, MASLINSKI W. Distribution of IL-15 Receptor α -Chains on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Effect of Immunosuppressive Drugs on Receptor Expression. *J Immunol* 1996; **157**: 2813–2819.
- [16] CHIBA K. A new orally active anti-rheumatic drug targets IL-15 and IL-17. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2007; **30**: 375–382.
- [17] CHIRIFU M, HAYASHI C, NAKAMURA T, TOMA S, SHUTO T, YAMAGATA Y, DAVIS SJ, IKEMIZU S. Crystal structure of the IL-15-IL-15R α complex, a cytokine-receptor unit presented in trans. *Nature Immunol* 2007; **8**: 1001–1007.
- [18] DI SABATINO A, CALAROTA SA, VIDALI F, MACDONALD TT, CORAZZA GR. Role of IL-15 in immune-mediated and infectious diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; **22**: 19–33.
- [19] DINIZ SN, PENDELOSKI KP, MORGUN A, CHEPELEV I, GERBASE-DELIMAM, SHULZHENKO N. Tissue-specific expression of IL-15R α alternative splicing transcripts and its regulation by DNA methylation. *Eur Cytokine Netw* 2010; **21**: 308–318.

- [20] DUBOIS S, MAGRANGEAS F, LEHOURS P, RAHER S, BERNARD J, BOISTEAU O, LEROY S, MINVIELLE S, GODARD A, JACQUES Y. Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor α -chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression. *J Biol Chem* 1999; **274**: 26978–26984.
- [21] 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. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 4851–4861.
- [22] ELDER JT. IL-15 and psoriasis: another genetic link to Th17? *J Invest Dermatol* 2007; **127**: 2495–2497.
- [23] FERRARI-LACRAZ S, XIN XIAO Z, YON SU K, LI Y, MASLINSKI W, XIAN CHANG L, STROM TB. An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection. *J Immunol* 2001; **167**: 3478–3485.
- [24] FERRARI-LACRAZ S, ZANELLI E, NEUBERG M, DONSKOY E, KIM YS, ZHENG XX, HANCOCK WW, MASLINSKI W, LI XC, STROM TB, MOLL T. Targeting IL-15 receptor-bearing cells with an antagonist mutant IL-15/Fc protein prevents disease development and progression in murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2004; **173**: 5818–5826.
- [25] FERRARI-LACRAZ S, ZHENG XX, FUEYO AS, MASLINSKI W, MOLL T, STROM TB. CD8⁺ T cells resistant to costimulatory blockade are controlled by an antagonist interleukin-15/Fc protein. *Transplantation* 2006; **82**: 1510–1517.
- [26] FINCH D, MIDHA A, BUCHANAN C, COCHRANE D, CRAGGS RI, CRUWYS S, GRAHAMES C, KOLBECK R, LOWE DC, MALTBY J, PATTISON DV, VOUSDEN KA, WARD A, SLEEMAN MA, MALLINDER PR. Identification of a potent anti-IL-15 antibody with opposing mechanisms of action *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol* 2011; **162**: 480–490.
- [27] FITZGERALD D, PASTAN I. *Pseudomonas* exotoxin and recombinant immunotoxins derived from it. *Ann NY Acad Sci* 1993; **685**: 740–745.
- [28] GABAY C, MCINNES IB. The biological and clinical importance of the 'new generation' cytokines in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009; **11**: 230 (doi: 10.1186/ar 2680).
- [29] GIRIJG, KUMAKI S, AHDIEH M, FRIEND DJ, LOOMISA, 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.
- [30] 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.
- [31] HATAKEYAMA M, TSUDO M, MINAMOTO S, KONO T, DOI T, MIYATA T, MIYASAKA M, TANIGUCHI T. Interleukin-2 receptor β chain gene: Generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNA's. *Science* 1989; **244**: 551–556.
- [32] KIM YS, MASLINSKI W, ZHENG XX, STEVENS AC, LI XC, TESCH GH, KELLEY VR, STROM TB. Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fc γ 2a protein blocks delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 1998; **160**: 5742–5748.
- [33] KUNZ M, IBRAHIM SM. Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. *Mediat Inflamm* 2009; **2009**: 97928 Epub Oct 26.
- [34] LIU X, ZUO Y, ZHANG W, YANG D, XIONG C, ZHANG X. Expression of interleukin-15 and its receptor on the surface of stimulated human umbilical vein endothelial cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2009; **29**: 527–534.
- [35] LORENZEN I, DINGLEY AJ, JACQUES Y, GRÖTZINGER J. The structure of the interleukin-15 α receptor and its implications for ligand binding. *J Biol Chem* 2006; **281**: 6642–6647.
- [36] LUNA jr LA, BACHIALI, NOVAES E BRITO RR, EID RG, SUGURI VM, OLIVEIRA PW, GREGORIO LC, VAISBERG M. Immune responses induced by *Pelargonium sidoides* extract in serum and nasal mucosa of athletes after exhaustive exercise: Modulation of secretory IgA, IL-6 and IL-15. *Phytomedicine* in press;
- [37] MINAMI Y, KONO T, MIYAZAKI T, TANIGUCHI T. The IL-2 receptor complex: Its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 245–267.
- [38] MIRANDA-CARÚS ME, BALSAA, BENITO-MIGUEL M, DE AYALA CP, MARTÍN-MOLA E. IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: Effect of methotrexate. *J Immunol* 2004; **173**: 1463–1476.

- [39] MORTIER E, BERNARD J, PLET A, JACQUES Y. Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor α -chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J Immunol* 2004; **173**: 1681–1688.
- [40] 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 : Hyperagonist IL-15-IL-15R α fusion proteins. *J Biol Chem* 2006; **281**: 1612–1619.
- [41] MORTIER E, WOO T, ADVINCULA R, GOZALO S, MA A. IL-15R α chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med* 2008; **205**: 1213–1225.
- [42] NISHIMURA H, FUJIMOTO A, TAMURA N, YAJIMA T, WAJWALKU W, YOSHIKAI Y. A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by a nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing. *FASEB J* 2005; **19**: 19–28.
- [43] NIU YF, MAO XH. Construction and *in vitro* cytotoxic assay of a novel fusion toxin IL15-PEA Δ 293. *Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih* 2004; **24**: 991–995.
- [44] NIU YF, ZHENG Y, MAO XH. Development of a fusion toxin IL15M-PE Δ 293 based on a receptor-specific IL-15 antagonist. *Chin J Biotechnol* 2005; **21**: 42–46.
- [45] 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.
- [46] OTA N, TAKASE M, UCHIYAMA H, OLSEN SK, KANAGAWA O. No requirement of *trans* presentations of IL-15 for human CD8 T cell proliferation. *J Immunol* 2010; **185**: 6041–6048.
- [47] PERENO R, GIRON-MICHEL J, GAGGERO A, CAZES E, MEAZZA R, MONETTI M, MONACO E, MISHAL Z, JASMIN C, INDIVERI F, FERRINI S, AZZARONE B. IL-15/IL-15R α intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15R α . *Oncogene* 2000; **19**: 5153–5162.
- [48] PETTIT DK, BONNERT TP, EISENMAN J, SRINIVASAN S, PAXTON R, BEERS C, LYNCH D, MILLER B, YOST J, GRABSTEIN KH, GOMBOTZ WR. Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling. *J Biol Chem* 1997; **272**: 2312–2318.
- [49] PILSON RS, LEVIN W, DESAI B, REIK LM, LIN P, KORKMAZ-DUFFY E, CAMPBELL E, TSO JY, KERWIN JA, HAKIMI J. Bispecific Humanized Anti-IL-2 Receptor $\alpha\beta$ Antibodies Inhibitory for Both IL-2- and IL-15-Mediated Proliferation. *J Immunol* 1997; **159**: 1543–1556.
- [50] RUCHATZ H, LEUNG BP, WEI XQ, MCINNES IB, LIEW FY. Soluble IL-15 receptor α -chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: A role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology. *J Immunol* 1998; **160**: 5654–5660.
- [51] SAKAMOTO S, CAAVEIRO JMM, SANO E, TANAKA Y, KUDOU M, TSUMOTO K. Contributions of Interfacial Residues of Human Interleukin15 to the Specificity and Affinity for Its Private α -Receptor. *J Mol Biol* 2009; **389**: 880–894.
- [52] SCHLUNS KS, STOKLASEK T, LEFRANÇOIS L. The roles of interleukin-15 receptor α : Trans-presentation, receptor component, or both? *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**: 1567–1571.
- [53] ŠENOLT L, VENCOVSKÝ J, PAVELKA K, OSPELT C, GAY S. Prospective new biological therapies for rheumatoid arthritis. *Autoim Rev* 2009; **9**: 102–107.
- [54] SHANMUGHAM LN, PETRARCA C, FRYDAS S, DONELAN J, CASTELLANI ML, BOUCHER W, MADHAPPAN B, TETE S, FALASCA K, CONTI P, VECCHIET J. IL-15 an immunoregulatory and anti-cancer cytokine. Recent advances. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; **25**: 529–536.
- [55] SMITH XG, BOLTON EM, RUCHATZ H, WEI X, LIEW FY, BRADLEY JA. Selective blockade of IL-15 by soluble IL-15 receptor alpha-chain enhances cardiac allograft survival. *J Immunol* 2000; **165**: 3444–3450.
- [56] STAUBER DJ, DEBLER EW, HORTON PA, SMITH KA, WILSON IA. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 2788–2793.
- [57] STOKLASEK TA, SCHLUNS KS, LEFRANÇOIS L. Combined IL-15/IL-15R α immunotherapy maximizes IL-15 activity *in vivo*. *J Immunol* 2006; **177**: 6072–6080.
- [58] SUGAMURA K, ASAO H, KONDO M, TANAKA N, ISHII N, OHBO K, NAKAMURA M, TAKESHITA T. The interleukin-2 receptor γ chain: Its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 179–205.

- [59] TAKESHITA T, ASAO H, OHTANI K, ISHII N, KUMAKI S, TANAKA N, MUNAKATA H, NAKAMURA M, SUGAMURA K. Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor. *Science* 1992; **257**: 379–382.
- [60] TINUBU SA, HAKIMI J, KONDAS JA, BAILON P, FAMILLETTI PC, SPENCE C, CRITTENDEN MD, PARENTEAU GL, DIRBAS FM, TSUDO M, BACHER JD, KASTEN-SPORTES C, MARTINUCCI JL, GOLDMAN CK, CLARK RE, WALDMANN TA. Humanized antibody directed to the IL-2 receptor β -chain prolongs primate cardiac allograft survival. *J Immunol* 1994; **153**: 4330–4338.
- [61] USHIO H, ISHIBUCHI S, ADACHI K, OSHITA K, CHIBA K. Phenylpyrazoleamides as potent inhibitor of IL-15 dependent T cell proliferation. Part 2: Discovery of a new drug candidate, Y-320. *Lett Drug Des Discov* 2008; **5**: 292–296.
- [62] VILLADSEN LS, SCHUURMAN J, BEURSKENS F, DAM TN, DAGN?S-HANSEN F, SKOVL, RYGARD J, VOORHORST-OGINK MM, GERRITSEN AF, VAN DIJK MA, PARREN PWHI, BAADSGAARD O, VAN DE WINKEL JGJ. Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1571–1580.
- [63] VOLL RE, KALDEN JR. Do we need new treatment that goes beyond tumor necrosis factor blockers for rheumatoid arthritis? *Ann NY Acad Sci* 2005; **1051**: 799–810.
- [64] WANG D, DENG X, LENG X, MAO X. Interleukin-15 receptor-directed immunotoxins attenuate disease severity in rat adjuvant arthritis. *Mol Immunol* 2010; **47**: 1535–1543.
- [65] WANG X, RICKERT M, GARCIA KC. Structural biology: Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its α , β and γ receptors. *Science* 2005; **310**: 1159–1163.
- [66] WEI XQ, ORCHARDSON M, GRACIE JA, LEUNG BP, GAO BM, GUAN H, NIEBALA W, PATERSON GK, MCINNES IB, LIEW FY. The sushi domain of soluble IL-15 receptor α is essential for binding IL-15 and inhibiting inflammatory and allogenic responses *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 2001; **167**: 277–282.
- [67] WU X, HSUCHOU H, KASTIN AJ, HE Y, KHAN RS, STONE KP, CASH MS, PAN W. Interleukin-15 affects serotonin system and exerts antidepressive effects through IL15R α receptor. *Psychoneuroendocrinology* in press;
- [68] YABU JM, VINCENTI F. Novel immunosuppression: small molecules and biologics. *Semin Nephrol* 2007; **27**: 479–486.
- [69] ZHENG XX, GAO W, DONSKOYE E, NEUBERG M, RUEDIGER M, STROM TB, MOLL T. An antagonist mutant IL-15/Fc promotes transplant tolerance. *Transplantation* 2006; **81**: 109–116.
- [70] ZWIRNER NW, DOMAICA CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors* 2010; **36**: 274–288.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 02.05. 2011 r.

Przyjęto: 07.06. 2011 r.

Barbara Żyżyńska-Granica

Zakład Biochemii Ogólnej i Żywności, Wydział Nauki o Zdrowiu UM

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

e-mail: barbara.zyzynska@wum.edu.pl