

# 2-Interleukina (IL-2) eta IL-15 seinalizazio-bidezidorrak T linfuzitoetan: antzekoak baina aldi berean ezberdinak

*Nerea Osinalde\**

Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, Farmazia Fakultatea  
(UPV/EHU)

*Virginia Sánchez Quiles, Vyacheslav Akimov, Blagoy Blagoev, Irina Kratchmarova*

Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, University of Southern Denmark  
(SDU)

*Miren Josu Omaetxebarria*

Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
(UPV/EHU)

\* nerea.osinalde@ehu.eus

DOI: 10.1387/ekaia.14584

Jasoa: 2015-06-01

Onartua: 2015-06-17

**Laburpena:** 2-interleukina (IL-2) eta IL-15 zitokinek berebiziko garrantzia daukate sistema immunologikoaren erregulazioan, besteak beste T linfuzitoen proliferazioa sustatzen dutelako. Zitokina biek bi hartzaille-azpiunitate partekatzen dituztenez (IL-2R $\beta$  eta IL-2R $\gamma$ ) ez da harriztekoa teilkatutako hainbat funtzio izatea, baina bai da harrigarria, ordea, bakoitzak erantzun immunologiko espezikoak eta maiz kontrajarriak eragitea. Nahiz eta mekanismo asko proposatu diren IL-2 eta IL-15 arteko desberdintasunak azaltzeko, ez dago argi nola den posible biek, hartzaille berdinak erabiltzen dituztelarik, zeluletan erantzun desberdinak sustatzea. Horren gakoak aurkitzeko asmoz, IL-2 eta IL-15ez kitzikatutako T-zeluletan piztutako seinalizazio-bidezidorrak aztertu eta elkarren artean konparatu ditugu, masa-espektrometria erabilita. Gure lanak erakutsi du bi zitokinek kitzikatutako T linfuzitoen seinalizazio-sareak oso parekoak izan arren, badirela ñabardura batzuk bi zitokinen arteko alde funtzionala azaltzen lagun dezaketanak.

**Hitz gakoak:** IL-2, IL-15, seinalizazio bidezidorrak, T linfuzitoak, masa-espektrometria.

**Abstract:** IL-2 and IL-15 are key cytokines regulating the immune system in part by promoting T-cell proliferation. Both cytokines signal through the same receptor subunits (IL-2R $\beta$  and IL-2R $\gamma$ ) and not surprisingly they exert some overlapping functions. However they also have specific and even sometimes opposing roles raising the para-

digm of how they mediate distinct immune reponses by using the same receptors. Although several options have been suggested, it remains controversial the molecular mechanism underlying the functional dichotomy of IL-2 and IL-15. Aiming to find the key to answering such enigma, we assessed and compared by mass spectrometry the signaling networks activated by both cytokines. Our study revealed that the transduction pathways initiated by IL-2 and IL-15 are highly similar but not identical since we detected faint differences that may account for the functional discrepancy observed between both cytokines.

**Keywords:** IL-2, IL-15, signaling pathways, T lymphocytes, Mass Spectrometry.

## 1. SARRERA

Agente patogenoen aurkako lehia IL-2ak eta IL-15ak berebiziko garrantzia daukate; izan ere, gure immunologia-sistema pizteko ahalmena daukate, besteak beste T-zelulen proliferazioa sustatuz [1]. Ez da harritzekoa bi zitokinek hainbat funtzio partekatzea, izan ere haien seinalea zelulan zehar barreiatzeko erabiltzen dituzten bi hartzaile-azpiunitate berdinak baitira (IL-2R $\beta$  eta IL-2R $\gamma$ ). Aldi berean, baina, zitokina bakoitza gai da besteak bete ezin ditzakeen funtzio espezifikoak betetzeko. Esaterako, IL-2ak norberaren aurka jarduten duten T-zelulak deuseztatu ditzake eta, aldiz, IL-15a gai da prozesu hori bera galarazteko [2].

Azken hamarkadan ikerketa ugari bideratu dira IL-2 eta IL-15 arteko paradoxa argitzera, hots, nola gauzatu ditzaketen erantzun zelular desberdinak hartzaile berdinak erabiliz. Hainbat mekanismo proposatu diren arren [3, 4], gai honek eztabaidagarri dirau oraindik ere. Hain zuzen ere, IL-2 eta IL-15 arteko alde funtzionalek berebiziko inplikazioak dituzte bi zitokinen erabileran minbizia bezalako gaitzei aurre egiteko [5]. Gaur egun minbizia erasotzeko estrategiarik itxaropentsuenetakoa da immunoterapia, zeinak immunitate-sistema indartuz tumoreak desagertaraztea duen helburu. Hainbat modutan manipulatu daiteke norbanakoaren immunitate-sistema tumore-zelulak modu eraginkorragoan deuseztatu ditzan. Besteak beste, frogatu da posible dela tumoreak suntsitzea gaixoetan genetikoki eraldatutako T-zelulak txertatu eta haien hazkundera bultzatuz [6]. Minbiziaren aurkako immunoterapian T linfzitoen hazkundera kitzikatzeke IL-2a da gaurkoz gaixoei gehien ematen zaien zitokina. Halere, IL-2aren administrazioaren ondorioz behatutako albo-kalte desatseginak direla eta, ezinbestekoa da minbizia erasotzeko estrategia eraginkorrigo eta seguruagoak garatzea [7]. Hain justu, IL-15a da etorkizunean IL-2a ordezkatzuz immunoterapian erabiltzeko aukerak dituen zitokina, IL-2aren erabilerarekin lotutako kalteak eragin gabe T linfzitoen hazkundera bultzatzeko duen ahalmena dela eta [8]. Bistakoa da IL-2ak eta IL-15ak immunologia-sistema erregulatzeke duten ahalmenaren gaineko jakintza sakonagoak izugarri hedatu duela tera-

pia berrien garapena. Hala eta guztiz ere, interleukinen erabilerak dakartzan muga eta toxizitate kontuak direla eta, ezinbestekoa da IL-2ak eta IL-15ak kitzikatutako seinalizazio bidezidorren are ezagumendu zehatzagoa izatea, etorkizunean eraginkorrak eta hain oldarkorrak ez diren terapiak garatu ahal izateko.

Aspalditik dakigu, interleukinak zelula-mintzean txertatuta dauden hartzaileetara lotu bezain laster, seinalea zelulan zehar barreiatzen dela, bereziki proteinetan gertatzen diren behin-behineko fosforilazio prozesuen bitartez. Gai honen inguruan gaur egun daukagun jakintza gehiena biokimikako metodo tradizionalak erabiliz bildutakoa da, non aldiro proteina bakar batek edo gutxi batzuek seinalizazioaren hedapenean zuten funtzioa aztertzen zen. Izan ere, orduko baliabideekin ezinezkoa zen seinalizazio-sareak, horren sistema konplexuak izanik, beren osotasunean aztertzea.

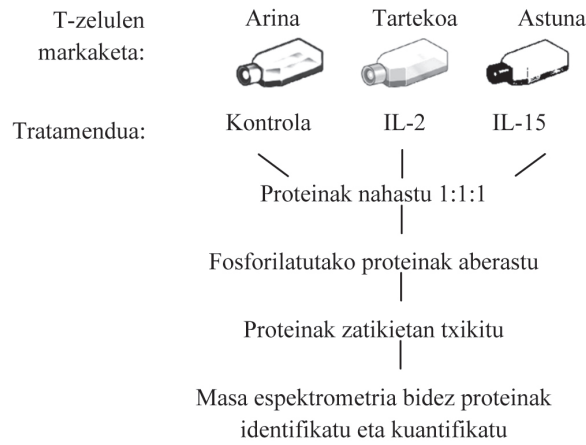
Azken urteotan, aldiz, fosforilatutako proteinen aberasketa-metodoek, hala nola masa espektrometria egondako garapenek, izugarriko bultzakada eman diote fosforilazio bidez erregulatutako seinalizazio-bidezidorren azterketari [9]. Masa-espektrometria (MS) proteinak identifikatzeko tresnarik erabiliena da gaur egun. Proteinak zatitu eta sortutako zatiki edo peptidoak masa-espektrometroaren bidez aztertzen dira. Hain zuzen ere, zatiki horien masa bai eta zatikien apurketaren ondorioz sortutako zatiki are txikiagoen masa kalkulatu du masa-espektrometroak. Ondoren, datu horiek guztiak datu-base batekin alderatzen dira programa informatikoen laguntzaz, proteinen identitatea ezagutu ahal izateko. Horrez gain, MS proteinak kuantifikatzeko ere erabil daiteke eta jada hamaika estrategia garatu dira horretarako, besteak beste SILAC (*Stable isotope labeling of amino acids in cell culture*) delakoa [10]. SILAC estrategian, zelulen proteomak masa desberdineko aminoazidoekin markatzen dira eta ondoren mota bakoitzari tratamendu bat egokitzen zaio. Proteinak erauzi ostean, guztiak batu eta lagin bakarra baliabidean prozesatzen dira, azkenik MSan aztertzeko. Masa diferentzia dela eta, jatorri desberdinetako proteinak banandu egiten dira MSan eta, haien ugaritasunak konparatuz, kuantifikazio erlatiboa egiten da. Jada ikerketa askok frogatu dute SILACean oinarritutako lan-fluxuak oso egokiak direla zitokinek piztutako bidezidorrak aztertzeko [11-14].

Hau guztia dela eta, gure ikerketaren helburua IL-2 eta IL-15 zitokinek T-zeluletan sustatutako seinalizazio-sareak aztertu eta konparatzea da, horretarako SILACean oinarritutako proteomika kuantitatiboaren abantailak baliatuko garelarik.

## 2. EMAITZAK

IL-2 eta IL-15ek T linfzitoetan piztutako bidezidorrak aztertzeko, 1. irudian adierazitako prozedura jarraitu genuen. T-zelulen 3 popula-

zio 3 masa ezberdinetako aminoazidoz markatu ziren; marka arinena-  
rekin markatutako zelulak kitzikatu gabe utzi ziren kontrol gisa era-  
biltzeko, eta tarteko markaketarekin eta astunarekin hazitakoak, aldiz,  
IL-2 eta IL-15ez kitzikatu ziren, hurrenez hurren. Ondoren, proteinak  
erauzi, ekitatiboki nahastu eta fosforilatutako proteinak antigorputzen  
bidez aberastu ostein, MS bidez analizatu ziren fosforilatutako proteina  
horiek.

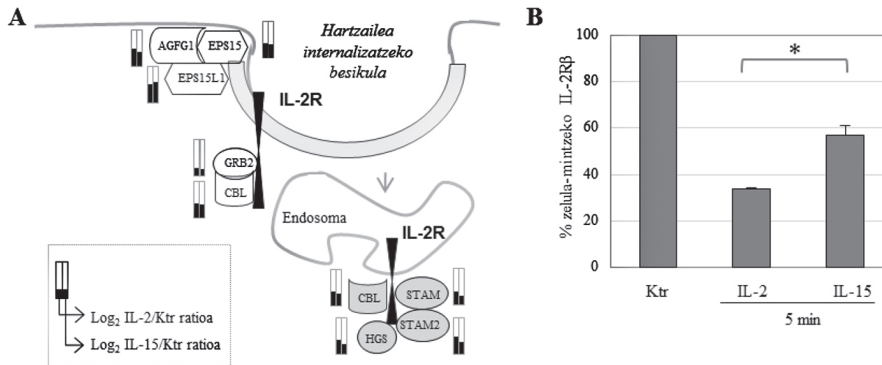


**1. irudia.** IL-2 eta IL-15az kitzikatutako T linfozitoetan fosforilatutako proteinak detekatzeko lan-fluxua.

Guztira 1255 proteina kuantifikatu genituen egindako esperimendu be-  
raren bi saioetan. Horietatik guztietatik IL-2aren eta IL-15aren kitzikape-  
naren ondorioz fosforilatutako proteinak interesatzen zitzaizkigunez, kon-  
trolarekin alderatuz baldintza horietan aberastutako proteinei erreparatu  
genien, hots, IL-2/Kontrol>1.5 edota IL-15/ Kontrol>1.5 aurkezten zuten  
proteinei. Orotara 41 proteina aberastu ziren T-zelulak zitokinekin 5 mi-  
nutuz kitzikatu ostein. IL-2aren eta IL-15aren hartzaileez gain, bidezidor  
nagusienetako proteina ugari aurkitu genituen gure azterketan, hots JAK/  
STAT, RAS/MAPK eta AKT/PI3K seinalizazio-bideetan parte hartzen du-  
ten hainbat proteina egokitzaille, hala nola kinasa, fosfatasa eta transkrip-  
zio faktore, besteak beste. 2.irudian ikus daitekeen bezala, egindako es-  
perimentuan batu ziren datu guztiekin gai izan ginen IL-2ak eta IL-15ak  
piztutako seinalizazio-sare nagusiak berreraikitzeke. MSan oinarritutako  
estrategiaren ahalmena agerian utzi zuen horrek.

2. irudiko proteina bakoitzaren ondoan, MS bidez eginiko proteinen  
kuantifikazio erlatiboaren emaitza ikus daiteke, barra beltz itxuran. Ikus  
daitekeen bezala, IL-2 eta IL-15 bidezko tratamenduen ondorioz lortu-





**3. irudia.** IL-2ak arinago pizten ditu seinalizazioa indargetzeko mekanismoak IL-15ak baino. (A) Interleukina-hartzaileen barneratze-prozesuan parte hartzen duten proteinak. Proteomika analisisian identifikatu eta kuantifikatu ziren proteina hauek. (B) IL-2 eta IL-15 zitokinek partekatzen duten IL-2Rβ hartzailearen presentzia tratatu gabeko eta zitokinekin tratatutako T linfotzitoen mintzean, ehunekoan adierazita. (\*t-test  $p < 0,05$ ).

### 3. ONDORIOAK

Oro har, jarraitutako lan-fluxua IL-2ak eta IL-15ak sustatutako seinalizazio bidezidorrak aztertze oso egokia izan dela ondorioztatu daiteke. Izan ere, saiakera bakar batean gai izan baikara, oso bestelako funtzioak bete arren, seinalearen hedapenean modu koordinatuan parte hartzen duten proteina ugari identifikatzeko, eta horrela, IL-2aren eta IL-15aren bidezidorren eskema orokor bat eraikitze. Beste hainbat ikerketarekin bat eginez, gure azterketak erakutsi du IL-2ak eta IL-15ak oso antzeko seinalizazio-ahalmena daukatela T-zeluletan. Halere, guztiz berdinak ez direla frogatu dugu; izan ere, IL-2ak seinalizazioa indargetzeko mekanismoak IL-15ak baino arinago edo eraginkorrago sustatzen ditu, eta horrek, zalan-tzarik gabe, bi zitokinek eragindako seinaleen iraunkortasuna baldintzatzen du.

### 4. ESKER ONA

Lan hau burutzeko honako erakundeen laguntza jaso dugu: Novo Nordisk Foundation, The Lundbeck Foundation eta The Augustinus Foundation.

## 5 BIBLIOGRAFIA

- [1] MA, A., KOKA, R. eta BURKETT, P. 2006. «Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis». *Annual review of immunology*, **24**, 657-679.
- [2] MARKS-KONCZALIK, J., DUBOIS, S., LOSI, J.M., SABZEVARI, H., YAMADA, N., FEIGENBAUM, L., WALDMANN, T.A. eta TAGAYA, Y. 2000. «IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 11445-11450.
- [3] RING, A.M., LIN, J.X., FENG, D., MITRA, S., RICKERT, M., BOWMAN, G.R., PANDE, V.S., LI, P., MORAGA, I., SPOLSKI, R. et al. 2012. «Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15». *Nature immunology*, **13**, 1187-1195.
- [4] TONIER, S.W. eta SCHLUNS, K.S. 2010. «Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses». *Immunology Letters*, **127**, 85-92.
- [5] WALDMANN, T.A. 2006. «The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design». *Nature Reviews Immunology*, **6**, 595-601.
- [6] DUDLEY, M.E. eta ROSENBERG, S.A. 2003. «Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer». *Nature reviews Cancer*, **3**, 666-675.
- [7] MALEK, T.R. eta CASTRO, I. 2010. «Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity». *Immunity*, **33**, 153-165.
- [8] JAKOBISIYAK, M., GOLAB, J. eta LASEK, W. 2011. «Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy». *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **22**, 99-108.
- [9] WHITE, F.M. 2008. «Quantitative phosphoproteomic analysis of signaling network dynamics». *Current opinion in biotechnology*, **19**, 404-409.
- [10] ONG, S.E., BLAGOEV, B., KRATHCMAROVA, I., KRISTENSEN, D.B., STEEN, H., PANDEY, A. eta MANN, M. 2002. «Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics». *Molecular & cellular proteomics*, **1**, 376-386.
- [11] BLAGOEV, B.; KRATHCMAROVA, I.; ONG, S.E.; NIELSEN, M.; FOSTER, L.J. eta MANN, M. 2003. «A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling». *Nature Biotechnology*, **21**, 315-318.
- [12] KRATHCMAROVA, I., BLAGOEV, B., HAACK-SORENSEN, M., KASSEM, M. eta MANN, M. 2005. «Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation». *Science*, **308**, 1472-1477.
- [13] KRUGER, M., KRATHCMAROVA, I., BLAGOEV, B., TSENG, Y.H., KAHN, C.R. eta MANN, M. 2008. «Dissection of the insulin signaling path-

- way via quantitative phosphoproteomics». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 2451-2456.
- [14] OSINALDE, N., MOSS, H., ARRIZABALAGA, O., OMAETXE BARRIA, M.J., BLAGOEV, B., ZUBIAGA, A.M., FULLAONDO, A., ARIZMENDI, J.M. eta KRATHCMAROVA, I. 2011. «Interleukin-2 signaling pathway analysis by quantitative phosphoproteomics». *Journal of proteomics*, **75**, 177-191.
- [15] ARNEJA, A.; JOHNSON, H.; GABROVSEK, L.; LAUFFENBURGER, D.A. eta WHITE, F.M. 2014. «Qualitatively different T cell phenotypic responses to IL-2 versus IL-15 are unified by identical dependences on receptor signal strength and duration». *Journal of Immunology*, **192**, 123-135.
- [16] ZAMBRICKI, E., SHIGEOKA, A., KISHIMOTO, H., SPRENT, J., BURAKOFF, S., CARPENTER, C., MILFORD, E. eta MCKAY, D. 2005. «Signaling T-cell survival and death by IL-2 and IL-15. *American Journal of Transplantation*, **5**, 2623-2631.