



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUNA

**Interleukin-2 (IL-2) eta IL-15ak T
linfozitoen piztutako seinalizazio
bidezidoren sakoneko azterketa
proteomikoa**

*N. Osinalde, V. Sánchez-Quiles,
V. Akimov, B. Guerra, B. Blagoev
eta I. Kratchmarova*

710-715 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.98>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Interleukin-2 (IL-2) eta IL-15ak T linfzitoen piztutako seinalizazio bidezidorrren sakoneko azterketa proteomikoa

Osinalde N., Sánchez-Quiles V., Akimov V., Guerra B., Blagoev B., Kratchmarova I.
Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, University of Southern Denmark, Odense, Danimarka.

Kontakturako e-posta: nmo@bmb.sdu.dk

Laburpena

2-interleukina (IL-2) eta IL-15a sistema immunologikoaren erregulazioan berebiziko garrantzia daukaten bi zitokina dira, besteak beste T linfzitoen proliferazioa sustatzen dutelako. Zitokina biek bi hartzaile-azpiunitate partekatzen dituztenez (IL-2R β eta IL-2R γ) ez da harrizkoa 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-15aren arteko desberdintasunak azaltzeko ez dago argi nola den posible biek hartzaile berdinak erabili arren zeluletan erantzun desberdinak sustatea. Honen gakoa aurkitzeko asmoz, masa-espektrometria erabilita IL-2 eta IL-15ez kitzikatutako T-zeluletan piztutako seinalizazio-bidezidorrak diseinatu eta elkarren artean konparatu digutu. Gure lanak erakutsi du bi zitokinek kitzikatutako T linfzitoen seinalizazio-sareak oso parekoak izan arren, badirela ñabardura batzuk bi zitokinen arteko alde funtzionala azaltzen lagun dezaketenak.

Hitz gakoak: IL-2, IL-15, seinalizazio bidezidorrak, T linfzitoak, 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 β and IL-2R γ) and not surprisingly they exert some overlapping functions. However they also have specific and even sometimes opposing roles raising the paradigm of how they mediate distinct immune responses 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 the signaling networks triggered downstream both cytokines by mass spectrometry. 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 eta motibazioa

Agente patogenoen aurkako lehia IL-2ak eta IL-15ak berebiziko garrantzia daukate, izan ere gure immunologi-sistema pizteko ahalmena daukate, besteak beste T-zelulen proliferazioa sustatuz (Ma et al., 2006). Ez da harrizkoa bi zitokinek hainbat funtzio partekatzea, izan ere beraien seinalea zelulan zehar barreiatzeko erabiltzen dituzten bi hartzaile-azpiunitate berdinak baitira (IL-2R β eta IL-2R γ). Aldiberean 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 (Marks-Konczalik et al., 2000).

Azken hamarkadan ikerketa ugari bideratu dira IL-2 eta IL-15aren arteko paradoxa argitzera, hots, nola gauzatu dezaketen erantzun zelular desberdinak hartzaile berdinak erabiliz. Hainbat mekanismo proposatu diren arren (Ring et al., 2012; Stonier and Schluns, 2010), gai hau eztabaidagarri dirau oraindik ere. Hain zuzen ere, IL-2 eta IL-15aren arteko alde funtzionalek egundoko inplikazioak dituzte bi zitokina hauen erabileran minbizia bezalako gaitzei aurre egiteko (Waldmann, 2006). Gaur egun minbizia erasotzeko estrategiarik itxaropentsuenetakoa da immunoterapia, zeinak immunitate-

sistema indartuz tumoreak desagertaraztea du helburu. Hainbat modutan manipulatu daiteke norbanakoaren immunitate-sistema tumore zelulak modu eraginkorragoan deuseztatu ditzan. Besteak beste, gaixoetan genetikoki eraldatutako T-zelulak txertatu eta hauen hazkundera bultzatuz frogatu da posible dela tumoreak suntsitzea (Dudley and Rosenberg, 2003). Minbiziaren aurkako immunoterapian T linfzitoen hazkundera kitzikatzeko IL-2a da gaurkoz gaixoei gehien ematen zaien zitokina. Halere, IL-2aren administrazioaren ondorioz behatutako albo kalte desatseginak tarteko, minbizia erasotzeko estrategia eraginkorago eta seguruagoen garapena ezinbestekoa da (Malek and Castro, 2010). Hain justu, IL-2aren erabilerarekin lotutako kalteak eragin gabe, T linfzitoen hazkundera bultzatzeko duen ahalmena dela eta, IL-15a da etorkizunean IL-2a ordezkatzu immunoterapian erabiltzeko aukerak dituen zitokina (Jakobisiak et al., 2011). Bistakoa da IL-2a eta IL-15ak immunologia-sistema erregulatzeko duten ahalmenaren gaineko jakintza sakonagoak izugarri hedatu duela terapia berrien garapena. Hala eta guztiz ere, interleukinen erabilerak dakartzan muga eta toxizitate kontuak direla eta ezinbestekoa da IL-2a eta IL-15ak kitzikatutako seinalizazio bidezidorren are ezagumendu zehatzago bat izatea, etorkizunean eraginkoragoak eta hain oldarkorrek ez diren terapiak garatu ahal izateko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

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 batzuk seinalizazioaren hedapenean zuten funtzioa aztertzen zen. Izan ere orduko baliabideekin ezinezkoa baitzen seinalizazio-sareak, horren sistema konplexuak izanik, beraien osotasunean aztertzea.

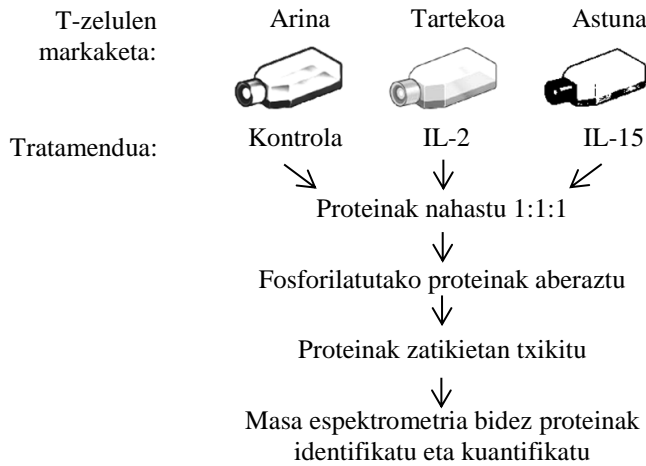
Aldiz, azken urteotan fosforilatutako proteinen aberasketa metodoetan, hala nola masa espektrometrian egondako garapenek izugarritzko bultzakada eman diote fosforilazio bidez erregulatutako seinalizazio-bidezidorren azterketari (White, 2008). Masa espektrometria (MS) proteinak identifikatzeko tresnarik erabiliena da gaur egun. Proteinak zatitu eta sortutako zatiki edo peptidoak masa espektrometroaren bidez aztertzen dira. Hain zuzen ere, zatiki horien masa hala nola zatikien apurketaren ondorioz sortutako zatiki are txikiagoen masa kalkulatu du masa-espektrometroak. Ondoren, datu guzti horiek programa informatikoen laguntzaz datu-base batekin alderatzen dira proteinaren identitatea ezagutu ahal izateko. Horrez gain, MS proteinak kuantifikatzeko ere erabili daiteke eta jada hamaika estrategia desberdin garatu dira horretarako, besteak beste SILAC (*Stable isotope labeling of aminoacids in cell culture*) delakoa (Ong et al., 2002). SILAC estrategian, zelulen proteomak masa desberdineko aminoazidoekin markatzen dira eta ondoren mota bakoitzari tratamendu ezberdin bat egokitzen zaio. Proteinak erauzi ostean, guztiak batu eta lagin bakarria bairan prozesatzen dira, azkenik MSan aztertuz. Masa diferentzia dela eta jatorri desberdineko proteinak MSan banandu egiten dira eta beraien ugaritasunak konparatuz kuantifikazio erlatiboa egiten da. Jada ikerketa askok frogatu dute SILACean oinarritutako lan-fluxuak oso egokiak direla zitokina ezberdinek piztutako bidezidorrak aztertzeko (Blagoev et al., 2003; Kratchmarova et al., 2005; Kruger et al., 2008; Osinalde et al., 2011).

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 abantailez baliatuko garelarik.

3. Emaizak

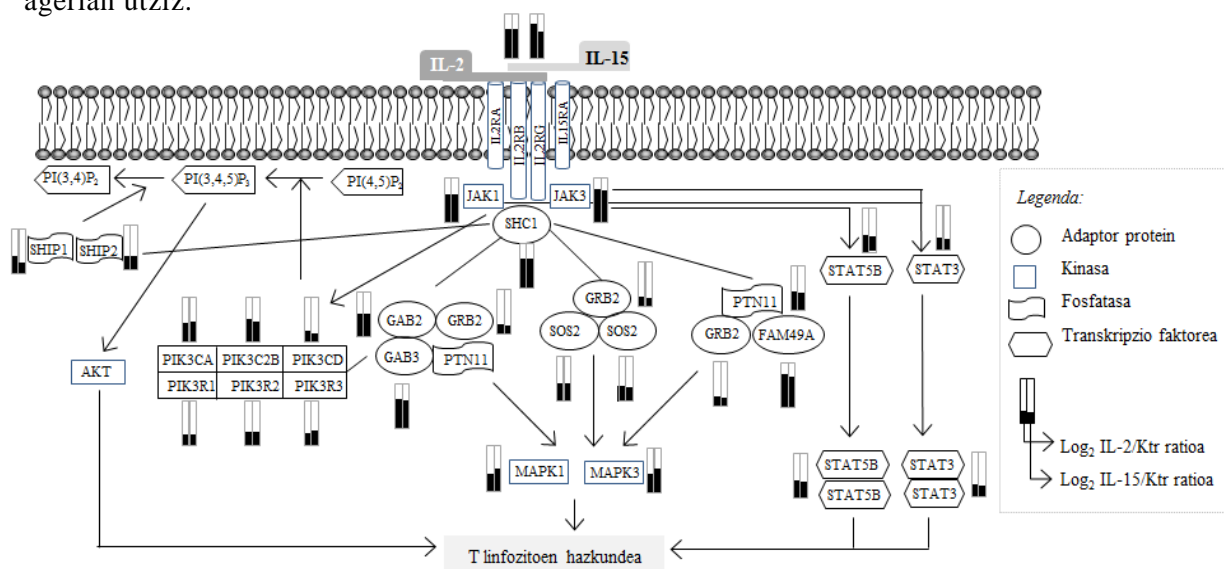
IL-2 eta IL-15ek T linfzitoetan piztutako bidezidorrak aztertzeko 1.irudian adierazitako prozedura jarraitu genuen. T-zelulen 3 populazio 3 masa ezberdineko

aminoazidoz markatu ziren; marka arinenarekin markatutako zelulak kitzikatu gabe utzi ziren kontrol gisa erabiltzeko, eta aldiz tarteko markaketarekin eta astunarekin hazitakoak IL-2 eta IL-15ez kitzikatu ziren, hurrenez hurren. Ondoren, proteinak erauzi, ekitatiboki nahastu eta antigorputzen bidez fosforilatutako proteinak aberastu ostean, hauek MS bidez analizatu ziren.



1 Irudia. IL-2 eta IL-15az kitzikatutako T linfositotan fosforilatutako proteinak detekatzeko lan-fluxua

Guztira 1255 proteina ezberdin kuantifikatu genituen egindako esperimantu beraren bi saioetan. Horietatik guztietatik IL-2 eta IL-15aren kitzikapenaren ondorioz fosforilatutako proteinak interesatzen zitzaizkigunez, kontrolarekin alderatuz baldintza horietan aberastutako proteinei erreparatu genien, hots, IL-2/Kontrol>1.5 edota IL-15/Kontrol>1.5 aurkeztzen zuten proteinei. Orotara 41 proteina aberastu ziren T-zelulak zitokinekin 5 minutuz kitzikatu ostean. IL-2 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 duten hainbat proteina egokitzaila, kinasa, fosfatasia eta transkripzio faktore, besteak beste. 2.irudian ikus daitekeen bezala, egindako esperimantuan batutako datu guztiakin gai izan ginen IL-2ak eta IL-15ak piztutako seinalizazio-sare nagusiak berreraikitzeo, MSan oinarritutako estrategiaren ahalmena agerian utziz.

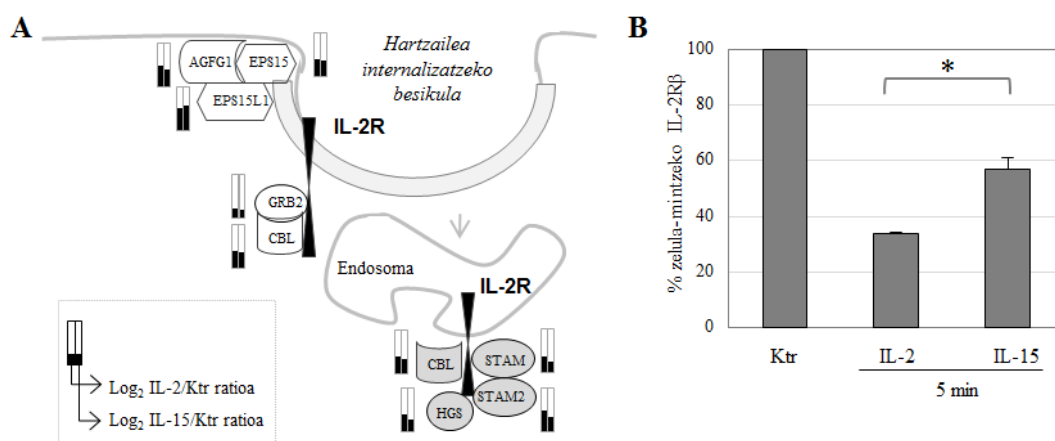


2 Irudia. IL-2 eta IL-15ak sustatutako seinalizazio bidezidorren berreraikitzea

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 lortutako emaitzak ia berdinak dira. Horrenbestez, beste hainbat lanekin bat eginez (Arneja et al., 2014; Zambricki et al., 2005), ondorioztatu daiteke IL-2ak eta IL-15ak piztutako seinalizazio bidezidorrak oso antzekoak direla T-zeluletan.

Hori horrela izanik ere eta emaitz oso nabarmenak ez izan arren, gure datuek erakusten zuten interleukina hartzaileen barneratze prozesuan eta horrenbestez seinalearen indargetzean parte hartzen zuten proteina batzuk neurri desberdinean fosforilatzen zirela IL-2 eta IL-15ez kitzikatutako T linfozitoetan. Proteina talde hau, 3a irudian grisez margotuta azaltzen da eta bi aldiz gehiago aberastu ziren IL-2aren bidezko tratamenduaren ondorioz IL-15arekin alderatuz, guzti honek iradokitzen duelarik seinalearen ahultze mekanismoak sustatuago daudela IL-2z tratatutako zeluletan.

Hipotesi hori frogatzeko, bi zitokinek partekatzen duten, eta zelulen mintzean txertatuta dagoen IL-2R β hartzailea antigorputz fluoreszente batekin markatu zen. Ondoren zelulak IL-2 eta IL-15ekin inkubatu ziren 5 minutuz eta berriz ere zelulen gainazaleko fluoreszentzia neurtu zen fluxu zitometriaz. 3b irudian ikus daitekeen bezala, IL-15ez tratatutako zeluletan mintzeko IL-2R β -aren %40a desagertu zen, IL-2z kitzikatutako zeluletan berriz desagertpena are nabarmenagoa zen, % 60koa hain zuzen ere.



3. irudia. IL-2ak seinalizazio indargetzeko mekanismoak IL-15ak baino arinago pizten ditu. (A) Proteomikako analisisian identifikatu eta kuantifikatutako proteinak zeintzuek interleukina hartzaileen barneratze-prozesuan parte hartzen duten. (B) IL-2 eta IL-15 zitokinek partekatzen duten IL-2R β hartzailearen presentzia tratatu gabeko eta zitokinekin tratatutako T linfozitoen mintzean, ehunekotan adierazita. (*t-test p<0,05)

Emaitza hauek baieztatzen zuten jada proteomikako datuek iradokitzen zutena, hots, IL-15arekin alderatuz IL-2ak arinago edo indartsuago pizten dituela seinalearen ahultze mekanismoak T-zeluletan, honek berebiziko eragina duelarik seinalearen beraren iraunkortasunean.

4. Ondorioak

Orohar, jarraitutako lan-fluxua IL-2 eta IL-15ak sustatutako seinalizazio bidezidorrak aztertzeko oso egokia izan dela ondorioztatu daiteke. Izan ere, saiakera bakar batean gai izan baikara oso bestelako funtzioak bete arren, modu koordinatuan seinalearen hedapenean parte hartzen duten proteina ugari identifikatzeko eta horrela IL-2 eta IL-15aren bidezidorraren eskema orokor bat eraikitzeko. Beste hainbat ikerketekin bat eginez gure ikasketak erakutsi du IL-2 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 zalantzarik gabe bi zitokinek eragindako seinaleen iraunkortasuna baldintzatzen du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Arestian aipatu bezala, zelulen mintzean piztutako seinalea zelulan zehar barreiatzen da proteinen behin-behineko fosforilazio prozesuen bitartez; fosforilazio horiek zehaztuko dute bai proteinen aktibitatea, baita proteinen arteko elkarrekintzak ere. Proteina jakin baten aminoazido desberdinetan gertatzen diren fosforilazioek oso eragin desberdina izan ditazakete proteinan baitan eta hau honela izanik bidezidorren ezagumendu are zehatzago bat izateko, seinalearen hedapenean parte hartzen duten proteinek pairatzen dituzten fosforilazioak zein aminoazidotan gertatzen diren jakitea ezinbestekoa da. Zorionez, gaur egun dauden masa espektrometro sentikorrei esker posible da fosforilatutako sekuentzia baten baitan fosforilazioa zein aminoazidori dagokion zehaztea. Hori dela eta, gure hurrengo helburua IL-2ak eta IL-15ak piztutako bidezidorretan parte hartzen duten proteinek pairatzen dituzten fosforilazioak karakterizatzea izango da, hots, zehaztea zein aminoazido dauden fosforilatuta eta zein dinamika jarraitzen duten fosforilazio horiek.

6. Erreferentziak

- Arneja, A., Johnson, H., Gabrovsek, L., Lauffenburger, D.A., and 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. *J Immunol* 192, 123-135.
- Blagoev, B., Kratchmarova, I., Ong, S.E., Nielsen, M., Foster, L.J., and Mann, M. (2003). A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nat Biotechnol* 21, 315-318.
- Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2003). Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature reviews Cancer* 3, 666-675.
- Jakobisiak, M., Golab, J., and Lasek, W. (2011). Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 22, 99-108.
- Kratchmarova, I., Blagoev, B., Haack-Sorensen, M., Kassem, M., and Mann, M. (2005). Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 308, 1472-1477.
- Kruger, M., Kratchmarova, I., Blagoev, B., Tseng, Y.H., Kahn, C.R., and Mann, M. (2008). Dissection of the insulin signaling pathway via quantitative phosphoproteomics. *PNAS* 105, 2451-2456.
- Ma, A., Koka, R., and Burkett, P. (2006). Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annual review of immunology* 24, 657-679.
- Malek, T.R., and Castro, I. (2010). Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 33, 153-165.
- Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J.M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (2000). IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *PNAS* 97, 11445-11450.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and 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.
- Osinalde, N., Moss, H., Arrizabalaga, O., Omaetxebarria, M.J., Blagoev, B., Zubiaga, A.M., Fullaondo, A., Arizmendi, J.M., and Kratchmarova, I. (2011). Interleukin-2 signaling pathway analysis by quantitative phosphoproteomics. *Journal of proteomics* 75, 177-191.
- 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.
- Stonier, S.W., and Schluns, K.S. (2010). Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunol Lett* 127, 85-92.

- Waldmann, T.A. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 6, 595-601.
- White, F.M. (2008). Quantitative phosphoproteomic analysis of signaling network dynamics. *Current opinion in biotechnology* 19, 404-409.
- Zambricki, E., Shigeoka, A., Kishimoto, H., Sprent, J., Burakoff, S., Carpenter, C., Milford, E., and McKay, D. (2005). Signaling T-cell survival and death by IL-2 and IL-15. *Am J Transplant* 5, 2623-2631.

7. Eskerrak eta oharrak

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