

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Lucie Honzírková

IL-15/IL-15R α komplexy jako superagonisté IL-15
IL-15/ IL-15R α complexes as IL-15 superagonist

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Marek Kovář Ph.D.

Praha, 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 5. 2017

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Marku Kovářovi Ph.D. za pomoc a ochotu při psaní této práce a za trpělivost při konzultacích.

Obsah

1. Úvod	2
2. Interleukin 15	3
1.1 Exprese IL-15	3
1.2 Kontrola exprese IL-15	4
3. IL-15 receptor	5
1.3 IL-15R α	6
4. Signalizační mechanismy	7
1.4 Transprezentace	8
5. Solubilní forma IL-15R α	10
6. Biologická funkce IL-15/IL-15R α	11
1.5 IL-15 a homeostáza paměťových CD8 ⁺ T buněk	12
1.6 Vliv IL-15 na NK a NKT buňky.....	12
7. IL-15/IL-15R α komplex jako superagonista IL-15	13
8. Využití IL-15R α /IL-15 komplexů v imunoterapii.....	15
1.7 Léčba HIV	15
1.8 Transplantace kostní dřevě	16
1.9 Nádorová onemocnění.....	17
1.10 IL-15 jako adjuvants.....	18
9. Závěr	18
10. Seznam zkratk.....	19
11. Literatura	21

Abstrakt

Interleukin 15 vytváří se svým vysokoafinním receptorem IL-15R α komplex IL-15/IL-15R α . Pomocí tohoto komplexu je prezentováno IL-15 *in trans* CD122/CD132 cílovým buňkám, u kterých spouští několik signalizačních drah. IL-15 má důležitou roli v imunitním systému, neboť reguluje homeostatickou proliferaci paměťových CD8⁺ T lymfocytů a je velmi důležitý pro funkci, vývoj a homeostázu NK a NKT buněk. IL-15/IL-15R α komplex exprimovaný na povrchu buněk může plně nahradit solubilní rekombinantní IL-15/IL-15R α -Fc komplex, který má podstatně vyšší biologickou aktivitu než samotný IL-15 a chová se tak jako superagonista. IL-15/IL-15R α -Fc komplexy jsou proto potenciálně slibné pro některé klinické aplikace jako imunoterapie nádorů, léčba HIV či vylepšení vakcinace.

Klíčová slova

IL-15, IL-15/IL-15R α -Fc komplexy, paměťové CD8⁺ T lymfocyty, NK a NKT buňky, transprezentace

Abstract

Interleukin 15 binds to its high-affinity receptor IL-15R α and forms stable IL-15/IL-15R α complexes. IL-15R α presents IL-15 *in trans* to target CD122/CD132 cells, where initiates signal transduction. Interleukin 15 has important role in immune system as it – regulates the homeostatic proliferation of memory CD8⁺ T cells and it is an essential for function, development and homeostasis of NK and NKT cells. Cell surface-expressed IL-15/IL15R α complexes can be completely substituted by soluble recombinant IL-15/IL-15R α -Fc complexes, which have substantially higher biological activity in composition to free IL-15 and behave as IL-15 superagonist. IL-15/IL-15R α -Fc complexes are thus promising tool for some clinical use, i.e. cancer immune therapy, treatment of HIV or improvement of vaccination.

Key words

IL-15, IL-15/IL-15R α -Fc complexes, CD8⁺ memory T cells, NK and NKT cells, transpresentation

1. Úvod

Cytokiny jsou glykoproteiny produkované širokým spektrem buněk nejen imunitního systému v celém organismu. Vyznačují se širokou škálou funkcí jako je indukce apoptózy, regulace zánětu, proliferace a diferenciaci buněk imunitního systému. Působení cytokinů je zprostředkováno vazbou na jejich specifický receptor.

V této práci jsem se zaměřila na strukturu a funkci interleukinu 15 jakožto růstového faktoru některých buněk imunitního systému, jeho podobnost a odlišnosti s interleukinem 2, který se svou terciální strukturou řadí do stejné rodiny cytokinů. Dále jsem se zaměřila na strukturu a funkci IL-15 receptoru a jeho podjednotek a to především IL-15R α , s kterým vytváří IL-15 stabilní IL-15/IL-15R α komplexy. Znalost struktury IL-15/IL-15R α komplexu a jeho interakci s CD122/CD132 receptorovými podjednotkami je důležité k pochopení homeostázy a aktivace některých buněk imunitního systému, a to především paměťových CD8⁺ T lymfocytů, NK a NKT buněk. Dále je popsána role solubilních IL-15/IL-15R α komplexů, superagonistických forem IL-15, u kterých byla prokázána vyšší biologická aktivita jak *in vivo*, tak *in vitro* oproti samotnému IL-15. Na závěr jsem se zaměřila na roli IL-15 a IL-15/IL-15R α komplexů v imunoterapii. Zde jsem se zaměřila hlavně na a) virové onemocnění, kde samotný IL-15 hraje významnou roli v imunitní odpovědi během HIV infekce; b) nádorové onemocnění, kde IL-15 indukuje proliferaci a diferenciaci cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk, které mohou přímo zabít nádorové buňky; c) transplantace kostní dřeně. IL-15/IL-15R α komplex má potenciál pro další budoucí využití v imunoterapii a proto je na jeho studium zaměřena velká pozornost.

2. Interleukin 15

Interleukin 15 (IL-15), je 14-15 kDa velký glykoprotein, který se řadí svou terciální strukturou do rodiny cytokinů obsahujících čtyři alfa-helixové domény.¹ Dále do této rodiny cytokinů patří interleukin 2 (IL-2), interleukin 3 (IL-3), interleukin 6 (IL-6), interleukin 7 (IL-7), interleukin 9 (IL-9), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) a erythropoietin receptors (EPO).²

IL-15 je pleiotropní cytokin, který hraje významnou roli jak ve vrozené tak i v adaptivní imunitní odpovědi. Je významný pro vývoj, přežití a funkci NK buněk, NKT buněk a paměťových CD8⁺ T lymfocytů.³ IL-15 podporuje aktivaci neutrofilů, makrofágů a je důležitý i pro funkci dendritických buněk.⁴

IL-15 má mnoho funkcí, stimuluje přežívání T lymfocytů, stimuluje růst NK buněk a jejich produkci interferonu γ (IFN- γ), kostimuluje B lymfocyty a syntézu imunoglobulinů a obecně podporuje stimulaci a vývoj cytotoxických efektorových buněk.⁵ Tyto funkce jsou společné s IL-2. Myši deficientní na IL-2 či IL-2R α (CD25) trpí polyklonální lymfoproliferací, spolu s T-dependentní autoimunitou. Naproti tomu IL-15 může potlačovat aktivaci indukovanou buněčnou smrt (AICD), navíc IL-15 či IL-15R α deficientní myši mají snížený počet leukocytů v krvi.⁴

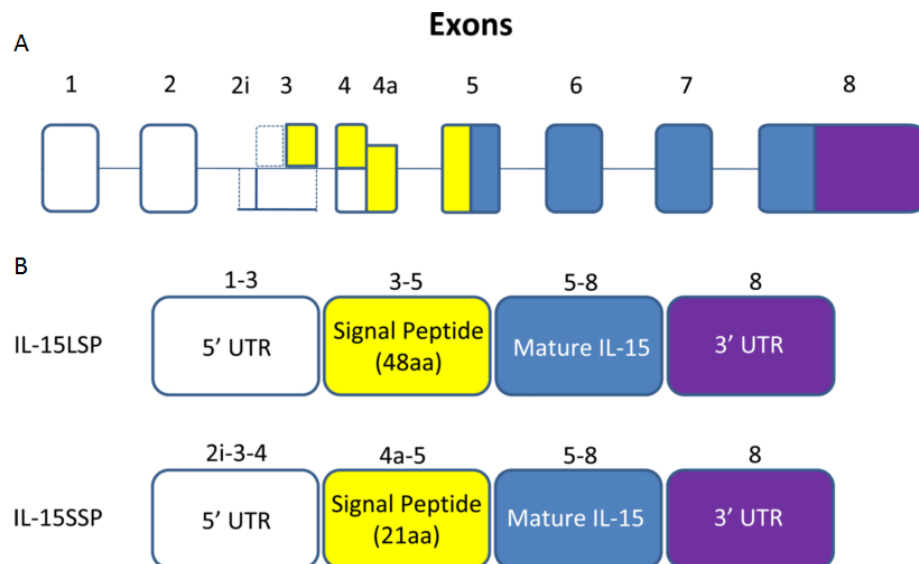
1.1 Exprese IL-15

Expresa IL-15 mRNA probíhá konstitutivně v mnoha buňkách jako např. fibroblasty, keratinocyty, epitelální buňky, monocyty, makrofágy a dendritické buňky.⁶

IL-15 je kódován genem, o velikosti 34 kb a nachází se u člověka na chromozomu 4q31 a u myši v centrálním regionu na osmém chromozomu. Mezi myším a lidským IL-15 je 73% sekvencí homologie.⁷ Lidský gen pro IL-15 tvoří 9 exonů a 8 intronů.⁸ Pouze exony 5,6,7 a 8 kódují maturovaný protein, který se skládá ze 114 aminokyselin (aa). Obsahuje dva disulfidické můstky v pozicích Cys42-Cys88 (stejně jako IL-2) a Cys35-Cys85 a dále tři asparaginové zbytky, přičemž dva jsou N-glykosylovány⁷ (Obrázek 1).

Alternativním sestřihem jsou vytvářeny u člověka dvě izoformy IL-15, které se liší délkou svého signálního peptidu. Kratší izoforma IL-15 (IL-15 SSP) obsahuje 21 aa dlouhý leader peptid, který je kódován exony 4A (119-nukleotidová sekvence vložená mezi exony 4 a 5) a 5.⁹ Tato izoforma IL-15 není sekretována, ale nachází se v jádře a cytoplazmě, na rozdíl od delší

izoformy IL-15 (IL-15 LSP) obsahující 48 aa dlouhý leader peptid, který je tvořen třemi exony (3,4 a 5). IL-15LSP byla identifikována v buňkách exprimujících IL-15 v Golgiho aparátu, časných endosomech a endoplazmatickém retikulu.⁴



Obrázek 1. (A) Gen pro IL-15 tvořený 9 exony a 8 introny. (B) Jeho dvě mRNA izoformy, které se liší délkou svého signálního peptidu. Převzato z J. C. Steel et al, Trends in Pharmacological Sciences, 2012.

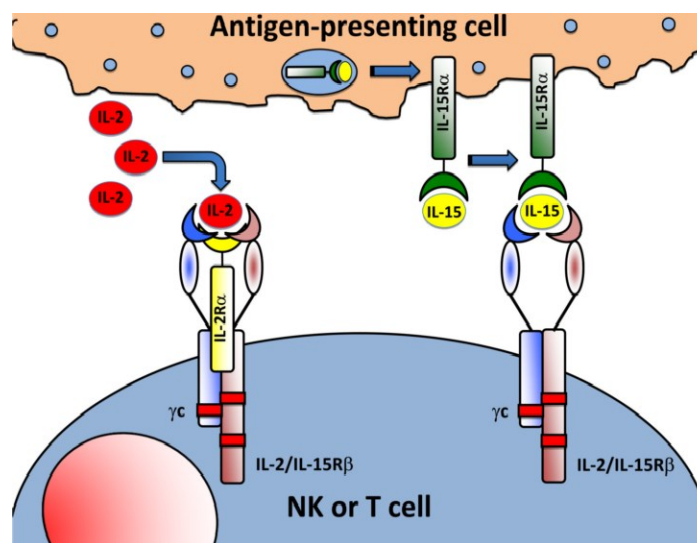
Alternativním sestřihem variabilního exonu 5 u myši vznikají dvě izoformy IL-15. Izoforma, která je lokalizována intracelulárně obsahuje alternativní exon 5. Tento alternativní exon má jiné 3'-sestřihové místo a vykazuje vyšší translační účinnost oproti izoformě, která je vytvářena vnitřním sestřihem exonu 5. Postrádá hydrofobní doménu signální sekvence svého leader peptidu v porovnání s druhou izoformou, která je kódována IL-15 mRNA s normálním exonem 5 a vytváří sekretovanou formu IL-15.¹⁰

1.2 Kontrola exprese IL-15

IL-15 mRNA je konstitutivně exprimována v mnoha tkáních (placenta, plíce, srdce, ledviny a buňky hematopoetického původu) a různými typy buněk (fibroblasty, svalové buňky, keratinocyty či nádorové buňky), na rozdíl od IL-2 ale není produkován T buňkami. Ačkoliv je mRNA exprimována v tak velkém množství buněčných typů, je těžké detekovat sekretovaný IL-15 protein v supernatanu mnoha buněk, které ho exprimují. Produkce IL-15 je kontrolována mnoha mechanismy na úrovni transkripce, translace a posttranskripčních úprav, které se jeví jako nejdůležitější.

3. IL-15 receptor

IL-15 nesdílí s IL-2 žádné signifikantní homologní sekvence na DNA úrovni, ale společně sdílí dvě receptorové podjednotky (β řetězec a γ_c řetězec), které jsou po navázání IL-15 a IL-2 jsou zodpovědné za přenos signálu. Nicméně každý z těchto cytokinů má svoji privátní receptorovou podjednotku (řetězec α). Tyto α řetězce mají společné strukturní vlastnosti, jako je velmi krátká cytoplazmatická doména, sushi doména vázající cytokin a oblast bohatou na prolin-threonin (PT region). Receptor IL-15 se skládá ze tří podjednotek: IL-15R α (CD215), která váže IL-15 s afinitou $K_a \sim 10^{-11}$ M, tzn. až tisíckrát větší než CD25 váže IL-2, IL-15R β (CD122) a IL-15R γ_c (CD132), která je společná pro IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 a IL-21 tzv. γ_c cytokiny.⁴



Obrázek 2. Interakce IL-2 a IL-15 se svými receptorovými podjednotkami. Všechny tři receptorové podjednotky pro IL-2 jsou exprimovány na těže buňce a vytváří komplex, který přímo váže IL-2. IL-15 se váže na svou receptorovou podjednotku α již intracelulárně v buňce produkující IL-15 a je v této formě transprezentován receptorovému komplexu CD122/CD132 nacházejícím se hlavně na NK nebo CD8⁺ T buňkách. Převzato z J. C. Steel et al., Trends in Pharmacological Sciences, 2012.

CD122 se skládá z 525 aa, z nichž 214 aa tvoří extracelulární segment, 25 aa tvoří transmembránový region a 286 aa tvoří cytoplasmatickou doménu. CD132 se skládá z 347 aa, z nichž 233 aa tvoří extracelulární doménu, 28 aa tvoří transmembránovou doménu a 86 aa tvoří cytoplasmatickou doménu.¹¹ Řetězce CD122 a CD132 společně tvoří dimerní receptor pro IL-2 a IL-15, který se nachází hlavně na NK buňkách, NKT buňkách a paměťových CD8⁺ T buňkách. Tento receptor váže IL-2 s intermediální afinitou $K_a = 10^{-9}$ M, oproti vysokoafinnímu trimernímu receptoru CD25/CD122/CD132, který váže IL-2 s vysokou afinitou ($K_a = 10^{-11}$ M).⁶

1.3 IL-15R α

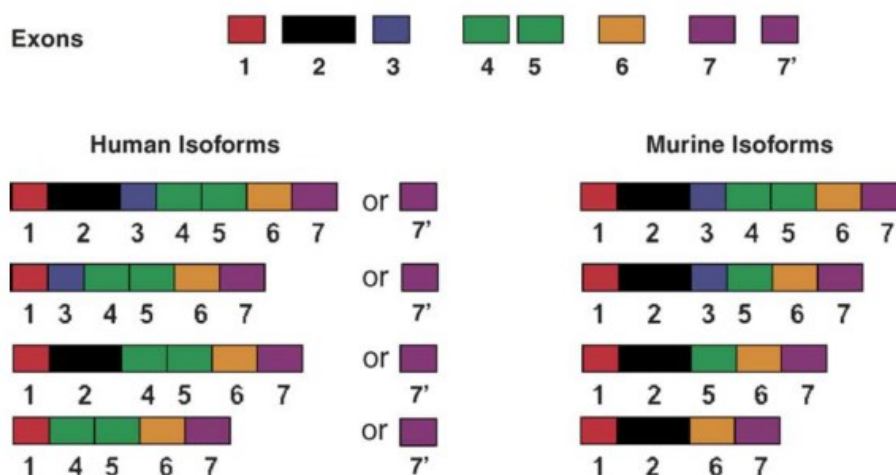
IL-15R α se skládá ze 173 extracelulárních aa, 21 aa dlouhého transmembránového úseku, 37 aa dlouhé cytoplazmatické domény, oblasti linkeru, proline-threonin (PT) bohatou doménou a 32 aa dlouhého signálního peptidu. IL-15 se váže k IL-15R α s vysokou afinitou i v nepřítomnosti CD122/CD132, na rozdíl od CD25, který se označuje jako nízko afinitní IL-2 receptor ($K_a = 10^{-8}$ M). Také receptorový komplex CD122/CD132 je schopen vázat IL-15, i když s nižší afinitou než CD25 ($K_a=10^{-9}$ M). IL-15R α se neliší od CD25 pouze afinitou ke svému ligandu, ale dále také nepřítomností druhé sushi domény a delší cytoplasmatickou doménou. Sushi doména nebo také short consensus repeats (SCR) je vazebný proteinový motiv, který obsahují i jiné proteiny, např. C1S, C1R či DAF. IL-15R α je exprimován velkým množstvím buněk jako jsou T a B buňky, makrofágy, stromální buňky thymu a kostní dřeň a v mnoha orgánech jako srdce, slezina, plíce, kostní svalstvo a játra.¹

Gen pro IL-15R α je lokalizován u člověka na chromozomu 10 a je tvořený 7 exony. U myši je pak lokalizovaný na chromozomu 2. Alternativním sestřihem genu IL-15R α může vzniknout osm rozdílných izoforem IL-15R α (viz. Obrázek 3). U lidí existují tři typy sestřihu:

- 1) alternativní využití exonu 7 nebo 7', kódující cytoplazmatickou doménu
- 2) delece exonu 3, kódujícího oblast linkeru
- 3) delece exonu 2, kódujícího sushi doménu a jaderný lokalizační signál¹²

Jsou možné také kombinace těchto tří sestřihů. Bylo prokázáno, že delecí exonu 2 a/nebo exonu 3 nedochází ke změně čtecího rámce.¹²

Exon 2, obsahující jaderný lokalizační signál je nezbytný pro vazbu ligandu a izoforma ho postrádající není schopná vázat IL-15. IL-15R α zprostředkovává transprezentaci IL-15 cílovým buňkám, které exprimují na svém povrchu CD122/CD132 receptorové podjednotky.



Obrázek 3. Schématické zobrazení lidského genu pro CD215 a jeho transkripčních produktů, převzato z Schlunsk, Stoklasek T. et al., International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2005.

4. Signalizační mechanismy

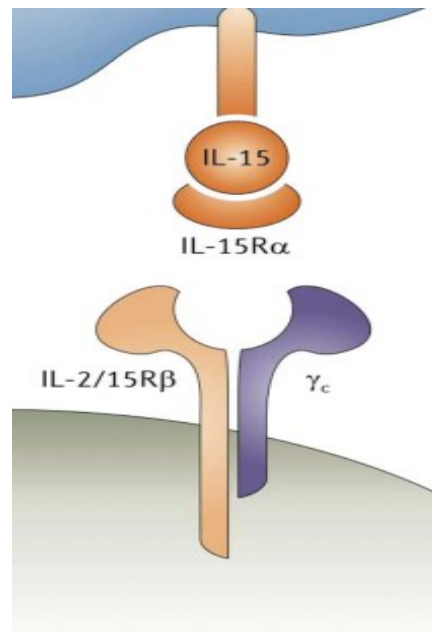
Působení IL-15 se odehrává na mnoha úrovních – zahrnuje juxtakrinní (kontakt buňka-buňka), intrakrinní (působení přímo v buňce) a reverzní signalizaci (signalizaci zpět do buňky). Takřka ve všech těchto procesech se uplatňuje IL-15R α , vytvářející s IL-15 komplex IL-15/IL-15R α .

IL-15 byl původně popsán jako solubilní molekula. Později bylo prokázáno, že IL-15 se vyskytuje také v membránově vázané formě, která představuje majoritní formu. Na membránu může být IL-15 vázán přímo dvěma způsoby - pomocí N-konce IL-15 amidovou vazbou nebo navázáním GPI kotvy k C-konci IL-15. Na membránu může být IL-15 také vázán v komplexu s IL-15R α .¹³

V lidských monocytech je IL-15 (bez tvorby IL-15/IL-15R α komplexů) konstitutivně exprimován v membránově vázané formě a jeho exprese je dále zvýšena v přítomnosti interferonu gama (IFN γ) nebo lipopolysacharidu (LPS).¹⁴ Monocyty exprimují obě izoformy IL-15. Membránově vázaný IL-15 se angažuje v juxtakrinní i reverzní signalizaci. Není stále jasné, zda se IL-15 v monocytech vyskytuje pouze samotný ukotven na membráně nebo zda i v komplexu s IL-15R α . Tato membránově vázaná forma IL-15 se také vyskytuje u lidských keratinocytů, fibroblastů a PC-3 buněk (lidská buněčná linie karcinomu prostaty).¹⁵

Membránově vázaný IL-15 po navázání solubilního IL-15R α nebo anti-IL-15 protilátky aktivuje několik downstream signálních drah, jako je fosforylace ERK1/2 a p38, patřící do MAP kinázové rodiny, a také indukci malé Rho rodiny GTPáz (Rac3).¹⁶ Aktivací Rac3 skrz receptory

spřažené s G proteiny dojde k reorganizaci cytoskeletu a tím zvýšené buněčné adhezi. Aktivací ERK1/2 a p38 dochází k zvýšené produkci a sekreci prozánětlivých cytokinů např. IL-6, IL-8.¹³



Obrázek 4. Membránově vázaný IL-15 exprimovaný na monocitech spouští po navázání na své receptorové podjednotky, které jsou exprimovány na $CD8^+$ T buňkách nebo NK buňkách, reverzní signalizaci. Převzato z Sylvia Lee a Kim Margolin, Nature Reviews Immunology, 2006.

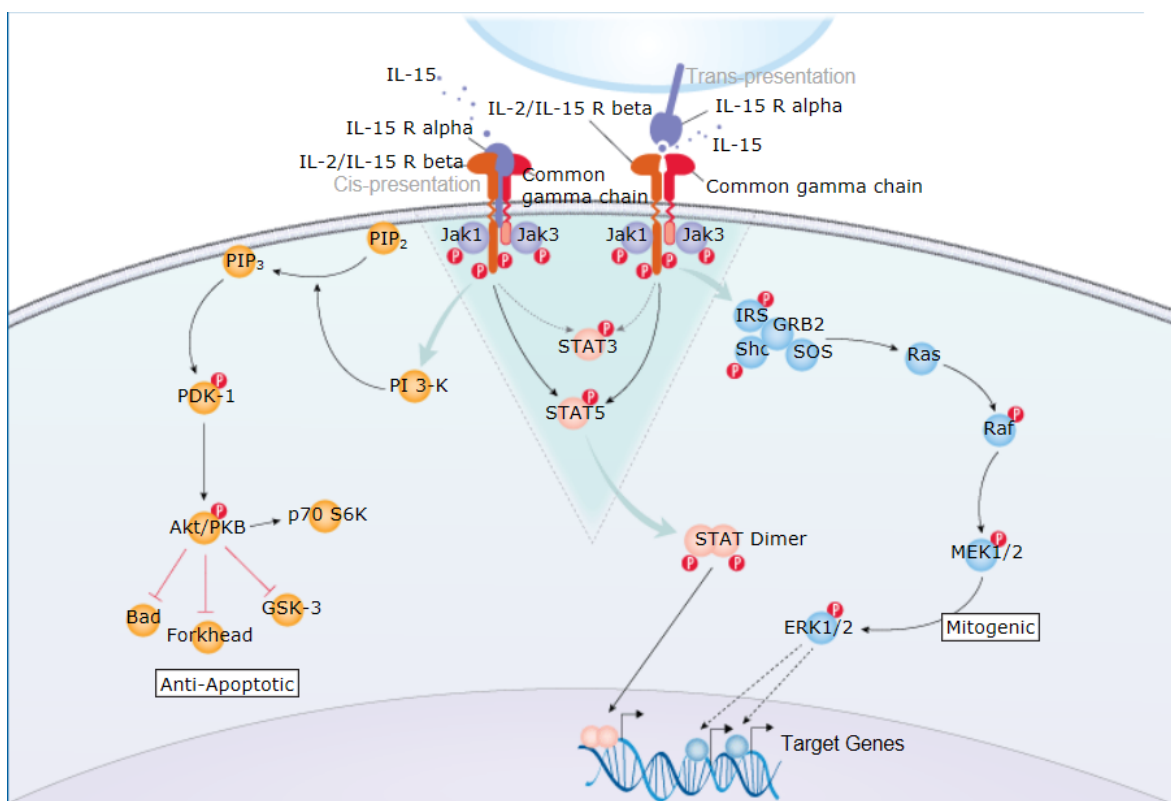
1.4 Transprezentace

Transprezentace je hlavní mechanismus působení IL-15, kdy juxtakrinní signalizační dráha začíná formací IL-15/IL-15R α komplexu a následnou prezentací IL-15 ve stabilním, membránově vázaném komplexu okolním cílovým buňkám nesoucím na svém povrchu CD122/CD132 receptor. Například monocyty, makrofágy a dendritické buňky exprimují stabilní IL-15/IL-15R α komplex už v endoplazmatickém retikulu a jsou schopné IL-15 prezentovat $CD8^+$ T, NKT a NK buňkám, které nemusí exprimovat IL-15R α pro schopnost využít IL-15 signál.¹⁷ Takto prezentovaný IL-15 spouští přes CD122/CD132 receptor signalizační dráhy aktivující JAK1 asociované s CD122 a JAK3 asociované s CD132, ty následně fosforylují STAT5 a/nebo STAT3, které vedou k aktivaci proliferace a maturaci buněk.¹⁷ Další signalizační dráhy aktivované IL-15 jsou stručně popsány níže.

Phosphatidylinositol 3-kináza (PI-3K) je lokalizován v cytoplazmě a skládá se z dvou podjednotek, p110 katalytické podjednotky a p85 regulační podjednotky. Aktivace PI-3-K vede

k fosforylaci fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu (PIP₂) na fosfatidylinositol-3-fosfát (PIP₃), který se váže na AKT. Tato interakce způsobí fosforylaci ATK, čímž ji aktivuje.¹⁶

IL-15 dále aktivuje Ras/ Raf/MEK/mitogen-activated protein kinase (MAPK). Navázáním IL-15 na receptorové podjednotky dochází k fosforylaci membránově vázaného G proteinu Ras, který zprostředkovává kontakt Raf kináz s plazmatickou membránou. Raf kinázy fosforylují mitogen-activated protein kinase (MEK), což způsobuje zvýšení jejich aktivity. Zvýšená aktivita MEK kináz aktivuje extracellular signal-regulated kinase (ERK), která následně fosforyluje p^{90RSK} kinázu, která aktivuje jaderné transkripční faktory. Jedním z nich je jaderný faktor κB (NF-κB), který reguluje buněčnou proliferaci a apoptózu.¹⁶



Obrázek 5. Signalizační dráhy spouštěné IL-15 po interakci s jeho receptorovými podjednotkami. Převzato z R&D Systems, Inc, 2012.

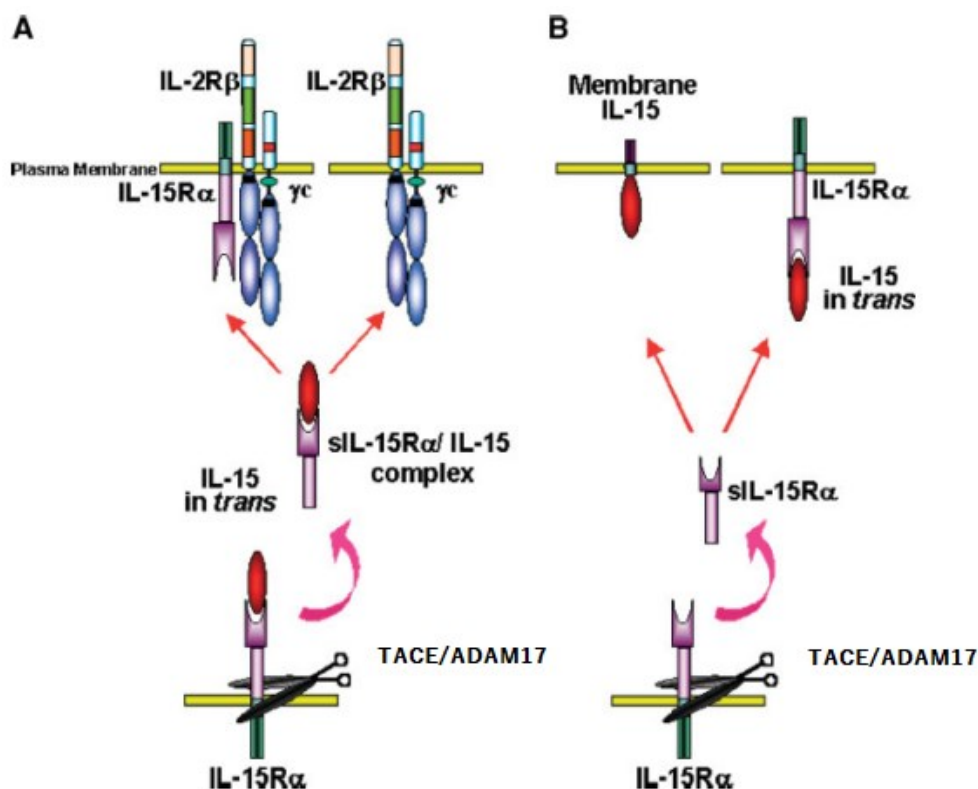
IL-15 může spouštět signalizaci také cisprezentací, kdy dochází k interakci IL-15 se signálním komplexem CD122/CD132 na povrchu téže buňky. Tento způsob signalizace umožňuje flexibilita C-konce ektodomény IL-15R α , zprostředkovaná 32 aa dlouhým linkrem, a/nebo 74 aa dlouhým PT regionem nacházející se na C-konci IL-15R α . Strukturální a biochemická data odhalily, že vysoce flexibilní vlastnosti linkeru a/nebo PT bohaté oblasti umožní prezentaci IL-15 cis nebo trans, a také že orientace IL-15 a jeho receptorových komponent na rozhraní kvartérního komplexu je stejná jak při trans tak při cisprezentaci. V souladu s tímto modelem

během cisprezentace PT region slouží k oddálení vazebné sushi domény od membrány, tak aby bylo IL-15 možno prezentovat CD122/CD132 receptoru. Stejně tak jako musí být sushi doména oddálena od membrány během transprezentace.¹⁸ Cis prezentace v porovnání s transprezentací vyvolá rychlejší, ale zato přechodnější odpověď.¹⁹

5. Solubilní forma IL-15R α

Receptor IL-15 α se vyskytuje také v solubilní formě (sIL-15R α), kdy je uvolněn z IL-15R α pozitivních buněk. Lidský solubilní IL15-R α (42kDa) je uvolňován odštěpením IL-15R α z buněčného povrchu, a to buď samotného nebo vázaného s IL-15 (Obrázek 6). V případě vzniku IL-15/sIL-15R α komplexu je odštěpení zprostředkováno pomocí TACE/ADAM17 proteínázami. sIL-15R α váže IL-15 se stejně vysokou afinitou jako membránová forma a vytváří IL-15/sIL-15R α komplexy, které mohou spouštět signalizaci IL-15R α v komplexu s IL-15 vazbou na CD122/CD132.¹⁵

Rekombinantní sIL-15R α v komplexu s IL-15 se chová jako silný IL-15 agonista, jelikož nese většinu vazebné afinity pro IL-15. Komplex sIL-15R α -sushi/IL-15 zvyšuje biologickou aktivitu IL-15 (proliferace, antiapoptický efekt) zvýšením afinity IL-15 k CD122/CD132 heterodimeru.²⁰ Přirozeně se vyskytující sIL-15R α -sushi domény jakožto produkty alternativního sestřihu při expresi IL-15R α genu (izoformy s chybějícími exony 3,4 a 5; které postrádají transmembránové domény), jsou patrně zahrnuty v IL-15 signalizaci.²⁰



Obrázek 6. (A) IL-15R α je odštěpen pomocí TACE/ADAM17 proteáz společně s IL-15 a IL-15/sIL-15R α komplex je navázán na trimerní či dimerní IL-15R komplex. (B) sIL-15R α se váže na transmembránový IL-15 a aktivuje reverzní signalizační dráhu, Převzato z Bulfone-Paus et al., BioEssays, 2006.

6. Biologická funkce IL-15/IL-15R α

Role IL-15 ve vrozeném a adaptivním imunitním systému byla prokázána na IL-15R α ^{-/-} a IL-15^{-/-} myších. Tyto myši mají normální délku života, orgánovou histologii a normální rozvoj makrofágů, B buněk, granulocytů a CD4⁺ T buněk, u těchto myší není pozorována žádná lymfoproliferace a autoimunita. Na druhou stranu u těchto myší bylo pozorováno snížení celkového množství CD8⁺ T lymfocytů ve slezině a lymfatických uzlinách. Bylo také zjištěno, že myši postrádají populaci paměťových CD8⁺ T lymfocytů (CD3⁺CD8⁺CD44^{hi}C122^{hi}), NK buněk a NKT buněk a dále populaci intraepiteliálních T lymfocytů (IEL).

U IL-15 transgenních myší bylo pozorováno zvýšené množství NK, NKT buněk a CD44^{hi}CD8⁺ T lymfocytů a fyziologická hladina CD4⁺ lymfocytů (Tabulka 1). IL-15 transgenní myši vykazují zlepšenou anti-bakteriální a protinádorovou imunitu, která však byla eliminována po depleci CD8⁺ T buněk. ⁴

	IL-15 ^{-/-} mice	IL-15R α ^{-/-} 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. Efekt zvýšené exprese IL-15R α /IL-15 na různé populace imunokompetentních buněk a imunitní odpovědi. Převzato z A Diab et al., *Cytotherapy*, 2005.

1.5 IL-15 a homeostáza paměťových CD8⁺ T buněk

IL-15 hraje důležitou roli v udržování paměťových CD8⁺ T buněk a to primárně pro regulaci tzv. homeostatické proliferace. Přítomnost IL-15 není vyžadována pro thymický vývoj CD8⁺ T lymfocytů, zatímco transprezentace IL-15 parenchymálními buňkami a buňkami kostní dřeně se podílí na homeostatickém udržení populace naivních CD8⁺ T lymfocytů.²¹ Pro udržení konstantní populace CD8⁺ T lymfocytů homeostatickou proliferací je esenciální exprese CD122 podjednotky, která 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.²² Paměťové CD8⁺ T buňky mohou exprimovat IL-15R α na svém povrchu a vázat rozpustný IL-15, což aktivuje odlišné signální dráhy oproti membránově vázanému IL-15/IL-15R α komplexu např. kinázy z rodiny Src, Lck a Fyn, které následně aktivují PI3K a MAPK signální dráhy. Signál zprostředkovaný membránově vázaným IL-15/IL-15R α komplexem přetrvává déle a je rozsáhlejší. Pravděpodobně je to způsobeno rozdílnou prostorovou a časovou distribucí kontaktu receptoru na povrchu buňky.²³

1.6 Vliv IL-15 na NK a NKT buňky

NK buňky, patří do lymfoidní linie buněk imunitního systému a jsou vývojově bližší T buňkám, než B buňkám Jsou schopné rychle rozpoznat a zabít některé nádorové a viry infikované buňky. Nemají na svém povrchu antigenně specifické receptory a rozeznávají buňky, které mají na svém povrchu abnormálně málo MHC glykoproteinů I.třídy.

Natural killer T (NKT) buňky tvoří subpopulaci T lymfocytů. Nesou na svém povrchu molekuly typické jak pro T lymfocyty, tak pro NK buňky. NKT buňky tak exprimují TCR a některé typické markery NK buněk jako například CD161 (NK1.1 u myší). NKT buňky rozpoznávají glykolipidové antigeny prezentované pomocí CD1d.

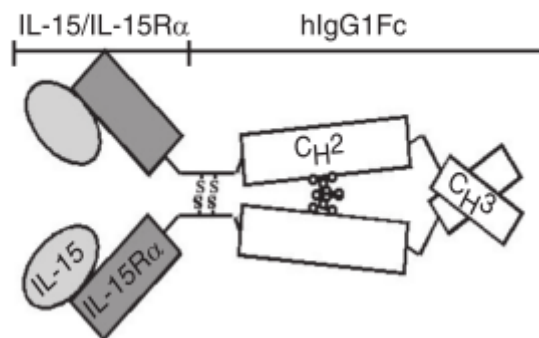
IL-15 je esenciální pro rozvoj, funkci a homeostázu NK a NKT buněk. Neaktivované NK buňky konstitutivně exprimují IL-15R α a CD122/CD132.^{24,25} Vysoká hladina exprese CD122/CD132 je nezbytná pro rozpoznání a vazbu transprezentovaného IL-15. Pro homeostázu NK buněk je IL-15 transprezentováno hlavně CD11c⁺ dendritickými buňkami, které také vyvolávají diferenciaci NK buněk regulací aktivace a inhibice Ly-49 receptorů. Absenci NK a NKT buněk můžeme pozorovat u myší deficientních na IL-15, IL-15R α a CD122/CD132, zatímco fenotypově a funkčně normální NK a NKT buňky se nacházejí u IL-2 a IL-7 deficientních myší.²⁶ Pro vývoj a maturaci NK a NKT buněk je důležitá exprese IL-15 a IL-15R α parenchymálními a hlavně také hematopoetickými buňkami.

Expese membránově vázaných komplexů IL-15/IL-15R α je zvýšená po stimulaci Toll-like receptorů (TLR) na DC pomocí LPS gramnegativních bakterií nebo syntetickým poly I:C. Membránově vázané IL-15/IL-15R α komplexy napomáhají aktivaci NK buněk *in vivo* i *in vitro*. Aktivace NK buněk tedy zahrnuje přímý mezibuněčný kontakt DC a NK buňky při transprezentaci IL-15.²⁷

7. IL-15/IL-15R α komplex jako superagonista IL-15

IL-15 navázaný na svůj unikátní receptor IL-15R α je transprezentován T buňkám a NK buňkám, které exprimují CD122/CD132, čímž se spouští signální dráhy. Solubilní IL-15 a IL-15R α je schopný vytvořit vysokoafinní heterodimerní komplexy, které jsou odštěpené a uvolněné.²⁸ Mechanismus působení těchto imunokomplexů zahrnuje prezentaci IL-15 buněčným populacím CD8⁺ T lymfocytů, NK a NKT buněk. Komplexy IL-15/IL-15R α mají podstatně vyšší biologickou aktivitu než samotný IL-15 jak *in vitro*, tak i *in vivo*, chovají se jako IL-15 superagonisté.²⁹ Tyto komplexy jsou nyní dále modifikovány, s cílem zvýšit jejich biologickou aktivitu a působení na jednotlivé subtypy buněk. Několik takových už bylo navrženo a prozkoumáno, charakteristika několika z nich je popsána níže.

Komplexy IL-15/IL-15R α -Fc se skládají z IL-15, extracelulární domény IL-15R α a Fc části lidského IgG1 (Obrázek 7)



Obrázek 7. Schéma struktury IL-15/IL-15R α -Fc komplexu, skládajícího se z IL-15, IL-15R α a Fc regionu lidského IgG1. Převzato Sigrid Dubois et al, Journal of immunology, 2008.

Stejně jako Fc fragment z IgG1 může být použit Fc fragment z lidského IgG2 nebo IgG3, pouze konstrukt s Fc fragmentem z lidského IgG4 nevykazuje zvýšení biologickou aktivitu oproti IL-15/IL-15R α .³⁰

Rubinstein et al. (2006) ve svých výsledcích dokazují superagonistické působení komplexů. Mechanismus zvýšení biologické aktivity IL-15 pomocí IL-15R α -Fc je způsoben konformační změnou IL-15, která zvyšuje afinitu k CD122/CD132, čímž mění IL-15 v superantagonistu.

In vitro studie, provedené Rubensteinem et al. (2006) ukázaly silnou proliferaci paměťových CD8⁺ T buněk a CD122^{hi} NK buněk po přidání myšího sIL-15R α /IL-15-Fc při nízké koncentraci myšího IL-15 (5 ng/ml), ale žádnou proliferaci po přidání sIL-15R α -Fc samotného. Bylo prokázáno, že sIL-15R α /IL-15-Fc komplexy vedou ke zvýšené proliferaci naivních CD44^{low} CD122^{low} CD8⁺ T buněk pouze při vysoké koncentraci IL-15 (50ng/ml). Rubenstein et al. (2006) provedly pokus i s monomerním fragmentem IL-15R α , který neobsahuje Fc fragment z lidského IgG1 a výsledky ukázaly minimálně stejnou *in vitro* účinnost jako u dimerní formy. Dimerizace IL-15 v daném IL-15R α /IL-15-Fc komplexu se tudíž nepodílí na zvýšení biologické aktivity IL-15. Stejně výsledky jako u myší byly pozorovány u lidských IL-15/IL-15R α komplexů.²⁹

In vivo studie, provedené Rubensteinem et al. (2006) ukázaly zvýšenou expanzi NK buněk a paměťových CD8⁺ T buněk po podání preasociovaných IL-15R α /IL-15-Fc komplexů. U paměťových CD4⁺ buněk nedošlo ke stimulaci proliferace při podání s IL-15-Fc/IL-15R α , jelikož exprimují CD122 na nižší hladině než paměťové CD8⁺ T lymfocyty.²⁹ Stoklase et al. (2006) ukazují podobné výsledky a navíc prokázali, že u B lymfocytů nedošlo k žádné imunitní odpovědi na IL-15 samotný či v komplexu.³¹ Počet NK a CD8⁺ T buněk *in vivo* závisí na transprezentaci IL-15 pomocí IL-15R α . Bylo jednoznačně prokázáno, že *in vivo* proliferace cílových

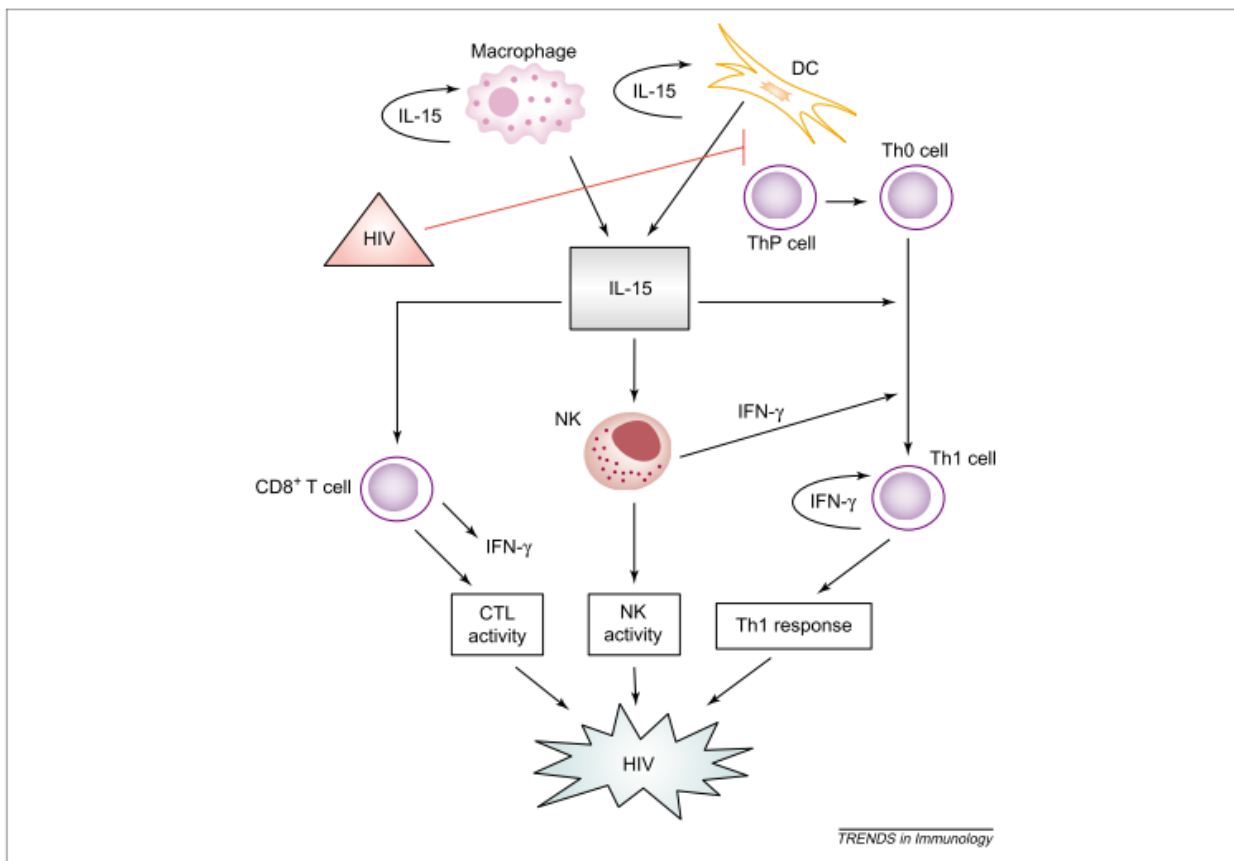
buněčných populací byla mnohem vyšší při použití IL-15R α /IL-15-Fc komplexů než IL-15 samotného.

8. Využití IL-15R α /IL-15 komplexů v imunoterapii

IL-15-Fc/IL-15R α IL- komplexy mají výrazně vyšší biologickou aktivitu a výhodnější farmakologické vlastnosti v porovnání se samotným IL-15. Příkladem může být až dvacetkrát delší poločas setrvání v séru, schopnost nahrazení přirozené transprezentace IL-15 a účinné navození efektorových funkcí v cílových buňkách. Tyto vlastnosti předurčují IL-15R α /IL-15-Fc komplexy k využití v případech, kde se již ukazuje pozitivní vliv aplikace IL-15.

1.7 Léčba HIV

IL-15 hraje důležitou roli v imunitní odpovědi během HIV infekce. HIV pacienti vykazují defektní produkci IL-15.⁴ Významnou roli při kontrole HIV infekce hrají HIV-specifické CD8⁺ T lymfocyty, které vykazují sníženou hladinu anti-apoptických molekul Bcl-2 a Bcl-x, jejichž funkci naopak zvyšují komplexy IL-15/IL-15R α -Fc. HIV-specifické CD8⁺ T lymfocyty jsou senzitivní k FasL-indukované apoptóze a z tohoto důvodu jsou zabíjeny HIV-infikovanými buňkami.³² IL-15 tuto FasL-indukovanou apoptózu u HIV-specifických CD8⁺ T buněk značně inhibuje (Obrázek 8). *In vitro* studie prokázaly, že podání IL-15 u HIV infikovaných pacientů zvyšuje aktivitu jejich neutrofilů a dále efektorové funkce a schopnost přežití NK buněk. CD8⁺ T lymfocyty z HIV infikovaných pacientů po aplikaci IL-15 se podílely na významném zlepšení anti HIV- imunitní odpovědi, a to na rozdíl od pacientů, kterým byla aplikována IL-2 nebo IL-7.³³



Obrázek 8. Role IL-15 v imunitní odpovědi během HIV infekce, převzato Claudio M. Mastroianni et al., Trends in Immunology, 2004.

1.8 Transplantace kostní dřeně

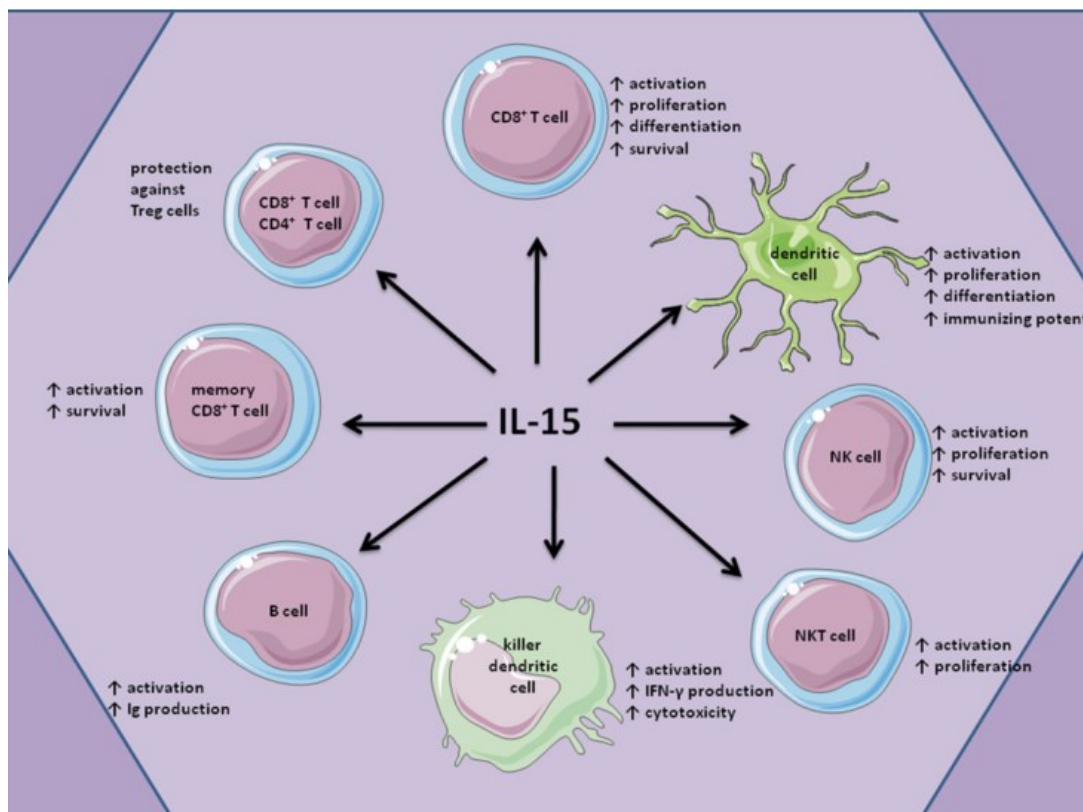
Opožděná rekonstituce imunitního systému je pozorována po transplantaci hematopoetických kmenových buněk kostní dřeně (HSCT) od dárce a je asociována s vyšším rizikem oportunistických infekcí. Tyto infekce mají na výsledek transplantace větší vliv, než například recidiva chronické myelogenní leukémie u pacientů, kteří prodělali alogenní HSCT od nepříbuzného donora.³⁴ Studie provedené Katsanis et al. (1996) prokázaly, že IL-15 zvyšuje počet T buněk a jejich cytolytickou aktivitu v syngenním myším HSCT modelu, a dále také protinádorovou aktivitu u myši nesoucí nádor po syngenní HSCT. Post-transplantační podání IL-15 ukázalo snížení apoptózy CD8⁺ T lymfocytů, díky zvýšené expresy Bcl-2 proteinu. Post-transplantační podání IL-15 ukázalo signifikantní zvýšení počtu donorových CD8⁺ T lymfocytů, NK a NKT buněk u příjemců po alogenní HSCT. Hlavní komplikací alogenní HSCT je reakce štěpu proti hostiteli (Graft-versus-host disease; GvHD), která nebyla zhoršena podáním IL-15 v recipientech T- depletovaných HSCT.³⁵ Tyto výsledky poukazují na potenciální využití IL-15/IL-R α -Fc komplexů i komplexů v procesu HSCT, kde zlepšují počet a aktivitu T a NK buněk a nezhoršují GvHD.

1.9 Nádorová onemocnění

Nejdůležitější efektorové buňky v protinádorové imunitě jsou cytotoxické CD8⁺ a NK buňky, které mohou přímo zabíjet nádorové buňky. IL-15 má pozitivní efekt na CD8⁺ a NK buňky a zároveň ochraňuje T buňky před AICD způsobenou Fas-FasL interakcí mediovanou apoptózu T buněk.

In vitro studie dokázaly, že IL-15 podporuje expanzi a přežívání T a NK buněk. IL-15 také zvyšuje expanzi EBV-specifických CTL a proliferaci a *in vitro* protinádorovou aktivitu periferních $\gamma\delta$ T lymfocytů, izolovaných z pacientů trpících glioblastomy.⁴ Studie na myších modelech, které porovnávaly účinky IL-2 a IL-15 na expanzi nádorově specifických CD8⁺ T lymfocytů, ukazují rozdíly mezi působením těchto dvou cytokinů. Buňky expandované v přítomnosti IL-2 vykazovaly efektorový paměťový fenotyp a produkovaly IFN- γ a IL-10, avšak nikoliv IL-2. Naopak buňky v přítomnosti IL-15 získaly fenotyp centrálních paměťových T lymfocytů, produkovaly IFN- γ a IL-2, ale ne IL-10; tyto buňky také po přenesení do myší nesoucích nádor zpomalily růst nádoru a prodloužily jejich přežití.³⁶

Munger et al. (1995) ukázali potlačení metastatického procesu u nádorového modelu karcinomu plic MCA-205 po aplikaci IL-15. V další studii aplikace IL-15 vedla k inhibici růstu nádoru u myší s rhabdomyosarkomem. Podání IL-15 podpořilo přežívání adoptivně přenesených nádorově specifických CTL, na rozdíl od podání IL-2 ve stejném modelu.³⁷ Podle typu nádoru je protinádorová imunita indukovaná aplikací IL-15 zprostředkována CD8⁺ T lymfocyty a NK buňkami, nebo jen jednou z těchto uvedených populací.³⁸



Obrázek 9. Protinádorová aktivita IL-15 a schopnost IL-15 aktivovat protinádorové mechanismy imunitního systému, z nichž je nejpodstatnější aktivace CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk. M. Jakobisiak et al., Cytokine and Growth Factor Reviews, 2011.

1.10 IL-15 jako adjuvants

IL-15 je zvyšuje efektivitu buněčné i humorální imunitní odpovědi na infekční patogeny. Studie na preklinických myších modelech ukázaly, že současné podávání experimentálních vakcín HIV a IL-15 vede ke zlepšení CD8⁺ T lymfocytární odpovědi, které obsahují env a gag proteiny. Podání vakcín s IL-15 má prokazatelně dlouhodobější vliv na buňky imunitního systému v porovnání s IL-2.³⁹ Stejně výsledky byly získány při imunizaci proti tetanovému toxoidu, herpes viru a hepatitidě typu B.⁴

9. Závěr

Interleukin 15 je pleiotropní cytokin, který hraje důležitou roli ve vrozené ale i adaptivní imunitě. Je konstitutivně exprimován mnoha buněčnými typy a to především monocyty, makrofágy a dendritickými buňkami. Biologická aktivita IL-15 je zajištěna navázáním IL-15 na receptorovou podjednotku IL-15R α s kterou vytváří IL-15/IL-15R α komplex. Tyto komplexy jsou exprimovány na povrchu výše zmíněných buněk a transprezentovány CD8⁺ T buňkám, NK a NKT buňkám, u kterých spouští signalizační dráhy vedoucí k proliferaci a zesílení efektorových funkcí těchto buněk. IL-15 hraje důležitou roli v udržení paměťových CD8⁺ T lymfocy-

tů a je důležitý pro rozvoj, funkci a homeostázu NK a NKT buněk. Působení IL-15 a IL-15R α má významný terapeutický efekt a to zejména při léčbě nádorových onemocnění, HSTC, léčba HIV a při vakcinaci. Právě pro zesílení IL-15 účinků *in vitro* a především *in vivo*, se ukázaly jako velmi potentní solubilní rekombinantní IL-15/IL-15R α -Fc komplexy, které působí jako IL-15 superagonista. Jednou z výhod těchto solubilních IL-15/IL-15R α -Fc komplexů je to, že působí nejen lokálně, ale i parakrinně či endokrinně a současně ovlivňují podstatu a/nebo délku trvání signálních procesů a dostupnost IL-15. IL-15/IL-15R α komplexy jsou dále modifikovány, čímž je dosaženo jejich vyšší aktivity a lepších vlastností při působení v imunitním systému. Pozorované účinky na jednotlivé populace buněk predeterminují tyto komplexy pro budoucí uplatnění např. v posílení imunitních odpovědí a podpoře obnovení imunitního systému. V budoucnu bude zajímavé využití těchto modifikovaných IL-15/IL-15R α komplexů v řadě klinických aplikací, kde se už prokázala pozitivní aplikace IL-15.

10. Seznam zkratk

Aa	aminokyselina
AICD	aktivací-indukovaná buněčná smrt
APC	antigen prezentující buňky
Bcl-2	anti apoptický protein
CTL	cytotoxické T lymfocyty
DC	dendritické buňky
EBV	Epstein-Barrové virus
EPO	erithropoetin
ERK	extracellular signal-regulated kinase
Fc	Fc fragment protilátky (obsahující 2x(CH2 +CH3))
G-CSF	faktor stimulující růst granulocytů
GM-CSF	faktor stimulující růst granulocytů a makrofágů
GvHD	Graft-versus-host disease
HSCT	hematopoetické buňky kostní dřeně
IEL	intraepiteliální T lymfocyty
IFN γ	interferon gama
IL	interleukin
kDa	kilodalton

LPS	lipopolysacharidy
MAPK	mitogen-activated protein kináza
NF- κ B	jaderný faktor κ B
NK	přirození zabíječi
NKT	subpopulace T-lymfocytů s vlastnostmi T i NK buněk
PC-3	lidská buněčná linie nádoru prostaty
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	fosfatidylinositol-3-fosfát
PI-3K	Phosphatidylinositol 3-kináza
Rac3	malý G-protein z Ras superrodiny
RTK	receptorová tyrosin kináza
TNF α	nádory nekrotizující faktor α

11. Literatura

1. Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, et al. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.* 1995;14(15):3654-3663.
2. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(18):6934-6938. doi:10.1073/pnas.87.18.6934.
3. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science.* 1994;264(5161):965-968. doi:10.1126/science.8178155.
4. Diab A, Cohen A, Alpdogan O, Perales M-A. IL-15: targeting CD8+ T cells for immunotherapy. *Cytotherapy.* 2005;7(1):23-35. doi:10.1016/S1465-3249(05)70786-6.
5. Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, et al. Reverse signaling through membrane-bound interleukin-15. *J Biol Chem.* 2004;279(40):42192-42201. doi:10.1074/jbc.M403182200.
6. Anderson DM, Kumaki S, Ahdieh M, et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem.* 1995;270(50):29862-29869. doi:10.1074/jbc.270.50.29862.
7. Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, Waldmann TA. IL-15: A pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity.* 1996;4(4):329-336. doi:10.1016/S1074-7613(00)80246-0.
8. Fehniger T a, Caligiuri M. Interleukin 15 : biology and relevance to human disease Review article Interleukin 15 : biology and relevance to human disease. *Blood.* 2001;97(1):14-32. doi:10.1182/blood.V97.1.14.
9. Tagaya Y, Kurys G, Thies T a, et al. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(26):14444-14449. doi:10.1073/pnas.94.26.14444.
10. Nishimura H, Yajima T, Naiki Y, et al. Differential Roles of Interleukin 15 mRNA Isoforms Generated by Alternative Splicing in Immune Responses in Vivo. *J Exp Med.* 2000;191(1):157-170. doi:10.1084/jem.191.1.157.
11. Steel JC, Waldmann TA, Morris JC. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(1):35-41. doi:10.1016/j.tips.2011.09.004.
12. Dubois S, Magrangeas F, Lehours P, et al. 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(38):26978-26984. doi:10.1074/jbc.274.38.26978.
13. Neely GG, Epelman S, Ma LL, et al. Monocyte surface-bound IL-15 can function as an

- activating receptor and participate in reverse signaling. *J Immunol.* 2004;172:4225-4234. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4225.
14. Musso T, Calosso L, Zucca M, et al. Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood.* 1999;93(10):3531-3539. doi:10.1182/blood-2012-07-446492.
 15. 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(4):362-377. doi:10.1002/bies.20380.
 16. Lee JT, McCubrey J a. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK.* 2002;16(January):486-507. doi:10.1038/sj.leu.2402460.
 17. Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15R α recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity.* 2002;17(5):537-547. doi:10.1016/S1074-7613(02)00429-6.
 18. Olsen SK, Ota N, Kishishita S, et al. Crystal structure of the interleukin-15/interleukin-15 receptor α complex: Insights into trans and cis presentation. *J Biol Chem.* 2007;282(51):37191-37204. doi:10.1074/jbc.M706150200.
 19. Perdreau H, Mortier E, Bouchaud G, et al. Different dynamics of IL-15R activation following IL-15 cis- or trans-presentation. *Eur Cytokine Netw.* 2010;21(4):297-307. doi:10.1684/ecn.2010.0207.
 20. Mortier E, Quémener A, Vusio P, et al. 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(3):1612-1619. doi:10.1074/jbc.M508624200.
 21. 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 U S A.* 2004;101(15):5616-5621. doi:10.1073/pnas.0307442101.
 22. Intlekofer A, Takemoto N, Wherry E, et al. Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1236-1244. doi:10.1038/ni0106-113.
 23. Sato N, Patel HJ, Waldmann T a, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:588-593. doi:10.1073/pnas.0610115104.
 24. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, et al. Reversible Defects in Natural Killer and Memory CD8 T Cell Lineages in Interleukin 15-Deficient Mice. *J Exp Med.* 2000;191(5):771-780. doi:10.1084/jem.191.5.771.
 25. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity.* 1998;9(5):669-676.

doi:10.1016/S1074-7613(00)80664-0.

26. Kündig TM, Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, Horak I. Immune Responses in Interleukin-2-Deficient Mice. *Sci VO* - 262. 1993;(5136):1059. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?authtype=shib&custid=s1240919&profile=eds>.
27. Lucas M., Schachterle W. et al. Natural Killer Cell-Mediated Control of Infections Requires Production of Interleukin 15 by Type I IFN-Triggered Dendritic Cells. *Clin Lymphoma*. 2010;9(1):19-22. doi:10.3816/CLM.2009.n.003.Novel.
28. Bergamaschi C, Jalah R, Kulkarni V, et al. Secretion and biological activity of short signal peptide IL-15 is chaperoned by IL-15 receptor alpha in vivo. *J Immunol*. 2009;183(5):3064-3072. doi:10.4049/jimmunol.0900693.
29. Rubinstein MP, Kovar M, Purton JF, et al. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R α . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(24):9166-9171. doi:10.1073/pnas.0600240103.
30. Dubois S, Patel HJ, Zhang M, Waldmann TA, Müller JR. Preassociation of IL-15 with IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and CD8⁺/CD44^{high} T cells and its antitumor action. *J Immunol*. 2008;180(4):2099-2106. doi:180/4/2099 [pii].
31. Stoklasek TA, Schluns KS, Lefrancois L. Combined IL-15/IL-15R α Immunotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo. *J Immunol*. 2006;177(9):6072-6080. doi:10.4049/jimmunol.177.9.6072.
32. Mueller YM, De Rosa SC, Hutton JA, et al. Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8⁺ T cells. *Immunity*. 2001;15(6):871-882. doi:10.1016/S1074-7613(01)00246-1.
33. Mastroianni CM, D'Etorre G, Forcina G, Vullo V. Teaching tired T cells to fight HIV: Time to test IL-15 for immunotherapy? *Trends Immunol*. 2004;25(3):121-125. doi:10.1016/j.it.2004.01.002.
34. Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, et al. Comparison of Immune Reconstitution After Unrelated and Related T-Cell-Depleted Bone Marrow Transplantation: Effect of Patient Age and Donor Leukocyte Infusions. *Blood*. 1999;93(2):467-481.
35. Alpdogan O, Eng JM, Muriglan SJ, et al. Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2005;105(2):865. doi:10.1182/blood-2003-09-3344.Supported.
36. Wysocka M, Benoit BM, Newton S, Azzoni L, Montaner LJ, Rook AH. Enhancement of the host immune responses in cutaneous T-cell lymphoma by CpG oligodeoxynucleotides and IL-15. *Immunity*. 2004;104(13):4142-4149. doi:10.1182/blood-2004-03-1190.Supported.
37. Roychowdhury S, May KF, Tzou KS, et al. Failed adoptive immunotherapy with tumor-specific T cells: Reversal with low-dose interleukin 15 but not low-dose interleukin 2.

Cancer Res. 2004;64(21):8062-8067. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1860.

38. Meazza R, Lollini PL, Nanni P, et al. Gene transfer of a secretable form of IL-15 in murine adenocarcinoma cells: Effects on tumorigenicity, metastatic potential and immune response. *Int J Cancer.* 2000;87(4):574-581. doi:Doi 10.1002/1097-0215(20000815)87:4<574::Aid-Ijc18>3.3.Co;2-K.
39. Oh S, Berzofsky JA, Burke DS, Waldmann TA, Perera LP. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(6):3392-3397. doi:10.1073/pnas.0630592100.