

Interleukiini 4 (IL-4) analogien vaikutus tyypin I ja II IL-4-reseptoreissa

Anu Moisander
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen Yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Toukokuu 2016

Tampereen Yliopisto
Lääketieteen Yksikkö
Allergian immunologiset mekanismit – tutkimusryhmä

Anu Moisander: Interleukiini 4 (IL-4) analogien vaikutus tyypin I ja II IL-4-reseptoreissa

Kirjallinen työ, s.22
Ohjaaja: LT Ilkka Junntila
Toukokuu 2016

Avainsanat: IRS-2, IL-4R, γ c, IL-13R α 1, immunologia, solusignalointi

Tiivistelmä

IL-4 on pleiotrooppinen sytokiini, jonka merkitys korostuu erityisesti immunijärjestelmän allergia- ja parasiittivasteissa, joissa sen tuotannosta vastaavat erityisesti basofiilit ja CD4-T_H2-solut. Se ohjaa naivien CD4⁺ T-solujen kypsymistä allergisille vasteille tyypilliseen T_H2-polarisaatioon toimien samalla T_H1-polarisaatioon ohjaavan IFN- γ :n vastavaikuttajana, aikaansaa IgE-vasta-ainetuotannon B-soluissa ja makrofagien vaihtoehtoaktivaatiota, voimistaa solujen MHC II pintaproteiinien ekspressiota ja lisää limaneritystä sekä pikarisolujen proliferaatiota limakalvoilla. Sen vaikutuksen välittää IL-4 reseptori, jota ekspressoidaan lähes kaikissa elimistön soluissa. IL-4 reseptori koostuu kahdesta eri ketjusta ja sitä on kahta erilaista tyyppiä: tyypin I ja tyypin II reseptori. Ne eroavat toisistaan sekundääriketjun osalta. Tyypin I reseptorissa sekundääriketjuna toimii γ c ja tyypin II reseptorissa IL-13R α 1. Viimeaikaiset kehitysaskeleet sytokiiniainalogien tuotannossa ovat mahdollistaneet spesifisesti tiettyyn reseptorityyppiin kohdistettujen sytokiinien valmistuksen.

Tässä tutkimuksessa tutkittiin rekombinantisti tuotettujen IL-4-analogien (RGA ja KFR) vaikutusta tyypin I reseptoria ja molempia reseptorityyppejä ilmentävissä solulinjoissa ja verrattiin niistä saatuja tuloksia villin tyypin (WT) IL-4:än. Määrityksen kohteena oli insuliinireseptori substraatti – 2 (IRS-2) signalointimolekyylin aktivaatio. Kaupallisten vasta-aineiden epäspesifisyydestä johtuen tulokset jäivät tilastollisesti merkityksettömiksi.

Sisällys

Sivu

1 Johdanto	4
1.1 IL-4	4
1.2 IL-4 reseptori	5
1.3 IL-4R:n aktivaatio ja solunsisäinen signalointi	6
1.3.1 IL-4R:n aktivaatio	6
1.3.2 IRS ja STAT-6	8
1.4 IL-4R ja IL-4:n sitoutuminen	9
1.4.1 IL-4R ja IL-4:n sitoutumiskohdat	9
1.4.2 Sitoutumisenergia	10
1.5 IL-4 analogit	10
2 Käsittely	11
2.1 Aineisto ja metodit	11
2.1.1 Solulinjat	12
2.1.2 Sytokiinit ja stimulaatio	12
2.1.3 IRS-2:n keräys	12
2.1.4 Fosforylaation osoitus Western Blot – menetelmällä	13
2.1.5 Vertailukelpoisuuden osoitus	13
2.1.6 Tulosten analysointi	14
2.2 Tulokset	14
2.2.1 Ramos – B-solulinja	14
2.2.2 U937 – monosyyttilinja	15
3 Pohdinta	17
3.1 Tulosten pohdinta	17
3.2 Tulevaisuudennäkymät	18
4 Lähteet	20

1 Johdanto

1.1 IL-4

Ihmisen interleukiini (IL) 4 (IL-4) on pieni pleiotrooppinen sytokiini, jonka muodostavat neljä antiparalleelista heliksiä, ja niitä yhdistävät silmukat. Se tunnistettiin ensimmäistä kertaa B-soluja stimuloivan tekijä 1:n kaltaisena proteiinina, ja kuuluu sytokiiniperheen I lyhytketjuisten α -heliksien ryhmään yhdessä IL-2, IL-3, IL-5, GM-CSF, IL-7, IL-9, IL-13, ja IL-15:n kanssa. (1)

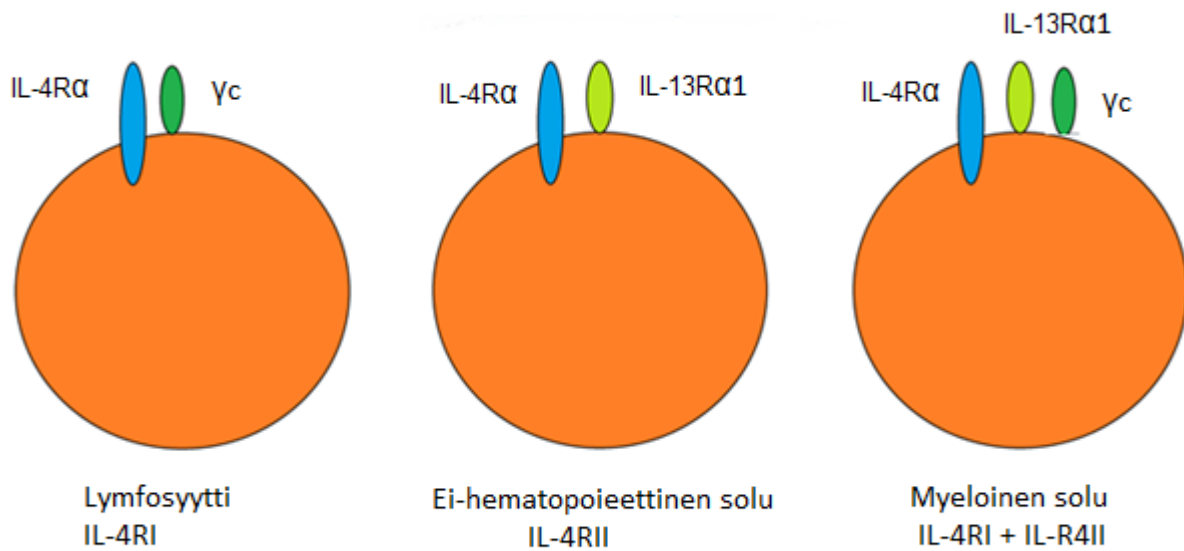
IL-4:n merkitys korostuu erityisesti immunijärjestelmän allergia- ja parasiittivasteissa, joissa sen in vivo tuotannosta vastaavat erityisesti basofiilit ja T_H2 -solut (2 & 3). Myös tyypin 2 luontaisten lymfoidien solujen (ILC2) on ehdotettu tuottavan IL-4:ä osana suoliston parasiittivastetta (4). Se ohjaa erilaistumattomien $CD4^+$ T-solujen kypsymistä allergisille vasteille tyypilliseen auttaja-T-solu (T_H)2- polarisaatioon toimien samalla T_H1 -polarisaatioon ohjaavan IFN- γ :n vastavaikuttajana, estää T_H17 solujen erilaistumista, aikaansaa tyypin IgE vasta-ainetuotannon B-soluissa, aktivoi makrofageja, voimistaa MHC II pintaproteiinien ekspressiota antigeeniesittelyn lisäämiseksi ja lisää limaneritystä sekä pikarisolujen proliferaatiota limakalvoilla (5,6 & 7).

Hiljattain on myös tunnistettu uusi T_H9 -auttajasolutyyppi, jonka synnylle IL-4 on välttämätön. Se muistuttaa suurelta osin T_H2 -soluja, ja niiden solutyypin välillä esiintyykin merkittävää plastisiteettia eli T_H2 -solut voivat edelleen erilaistua T_H9 -soluiksi. T_H9 -soluja esiintyy erityisesti allergiasta kärsivien perifeerisessä verenkierrrossa, sekä terveellä että atooppisella iholla ja astmaatikkojen hengitysteissä. Niillä näyttää myös olevan merkitystä syöpää kohtaan suuntautuvissa immunologisissa vasteissa sekä suolen autoimmuunisairauksissa. Toisin kuin T_H2 -solut T_H9 -solut eivät kuitenkaan kykene itsenäiseen IL-4 tuotantoon. (8)

IL-4 vaikuttaa voimakkaasti immuunijärjestelmään ja immuunivasteiden syntyyn. Se ohjaa solujen erilaistumista ja toimintaa useissa eri vaiheissa. Sen vaikutuksen välittää IL-4 reseptori, jota ekspressoidaan lähes kaikissa elimistön soluissa. (9)

1.2 IL-4 reseptori

IL-4 – reseptori (IL-4R) on heterodimeerinen luokan I sytokiinireseptori, josta on löydetty kaksi erilaista muotoa. Ne on nimetty tyyppin I ja tyyppin II IL-4 reseptoreiksi. Molemmat IL-4 reseptorityypit koostuvat spesifisestä korkean affiniteetin IL-4R α ketjusta, mutta poikkeavat toisistaan dimeerin toisten ketjujen osalta. Lymfaattiset solut ekspressoivat pinnallansa pääosin vain IL-4RI:tä ja ei-hematopoeettiset solut IL-4RII:tä. Myeloiset solut ekspressoivat molempia reseptorityyppejä (kuva1). (6, 10 & 11)



Kuva 1: IL-4R:n eri tyyppien ekspresio lymfosyyttien, ei-hematopoeettisten solujen ja myeloisten solujen solukalvoilla.

IL-4RI:ssä IL-4R α on dimerisoitunut alunperin IL-2 reseptorin rakenteena tunnistetun yleisen γ c-ketjun kanssa, jota ilmennetään IL-4RI:n ja IL-2R:n lisäksi myös interleukiinien 7, 9, 15 ja 21 reseptoreissa. IL-4R α varmistaa kuitenkin sen, että tyyppin I IL-4 reseptorin vaste on spesifinen IL-4:lle. Yhdessä γ c-ketjun kanssa IL-4R α muodostaa Y:n muotoisen dimeerin, johon IL-4 sitoutuu kolmesta eri kohdasta, I, IIa ja IIb:stä. Tyyppin I reseptorin merkitys immuunivasteen synnyn kannalta korostuu erityisesti CD4⁺ T_H2 ja T_H9 differentiaatiossa, joita ei tapahdu IL-4RI geenin puuttuessa. (8, 10, 11, 12 & 13)

IL-4RII on pääasiassa ei-hematopoeettisten solujen pinnalla ilmennetty reseptori, joka koostuu IL-4R α :sta ja sen kanssa dimerisoituneesta IL-13R α 1:sta. IL-4 sitoutuu ensin IL-4R α -ketjuun, ja tämän

jälkeen IL-4R α /IL-4 -kompleksi sitoutuu IL-13R α -ketjuun. Rakenteeltaan IL-13R α muistuttaa läheisesti tyypin I reseptoreissa esiintyvää γ c-ketjua. IL-4 sitoutuu IL-4RII:een neljässä eri kohdassa, jotka on nimetty I, IIa, IIb ja III:ksi. (6, 10, 11, 14, 15 & 16)

Koska tyypin II IL-4 reseptori koostuu myös IL-13R α 1-ketjusta, se ei ole spesifinen vain IL-4:lle, vaan reagoi myös IL-13 – stimulaation toimien IL-13 reseptorina. Tällöin IL-13 sitoutuu ensin IL-13R α :an ja sitten IL-13R α /IL-13 -kompleksi IL-4R α :an. Sytokiinien aikaansaamien vasteiden suuruuden suhde on riippuvainen solupopulaation IL-4R α ja IL-13R α 1 ketjujen ekspression suhteesta sekä IL-4 ja IL-13:n konsentraatioiden suhteesta. IL-13-sytokiinin osalta on syytä todeta, että IL-13R α 1-ketjun lisäksi on myös tunnistettu IL-13R α 2-ketju, jonka affinitetti IL-13:lle on merkittävästi IL-13R α 1-ketjua suurempi. IL-13R α 2 ketjun aktivaatio ei kuitenkaan johda IL-13R α 1:lle tyypilliseen Jak/STAT aktivaatioon, ja siksi sitä onkin pidetty mahdollisena IL-13:n antagonistina; korkeasta ligandin sitomiskyvystä johtuen se voi periaatteessa neutralisoida biologisesti aktiivista IL-13:ta kudoksissa. Solupinnan IL-13R α 2-reseptoriketjulla on kuitenkin myös merkitystä solunsisäisessä signaloinnissa. (17) Tyypin II reseptoreiden kyvyn tuottaa sekä IL-13:lle että IL-4:lle spesifisiä solunsisäisiä signaaleita merkitys korostuu erityisesti limakalvovasteissa. Esimerkiksi astman aikana IL-13:n on osoitettu toimivan reaktion ensivaiheessa ja IL-4:n merkityksen korostuvan astmareaktion pitkittyessä. (6, 10, 11, 14, 15 & 16)

1.3 IL-4R:n aktivaatio ja solunsisäinen signalointi

1.3.1 IL-4R:n aktivaatio

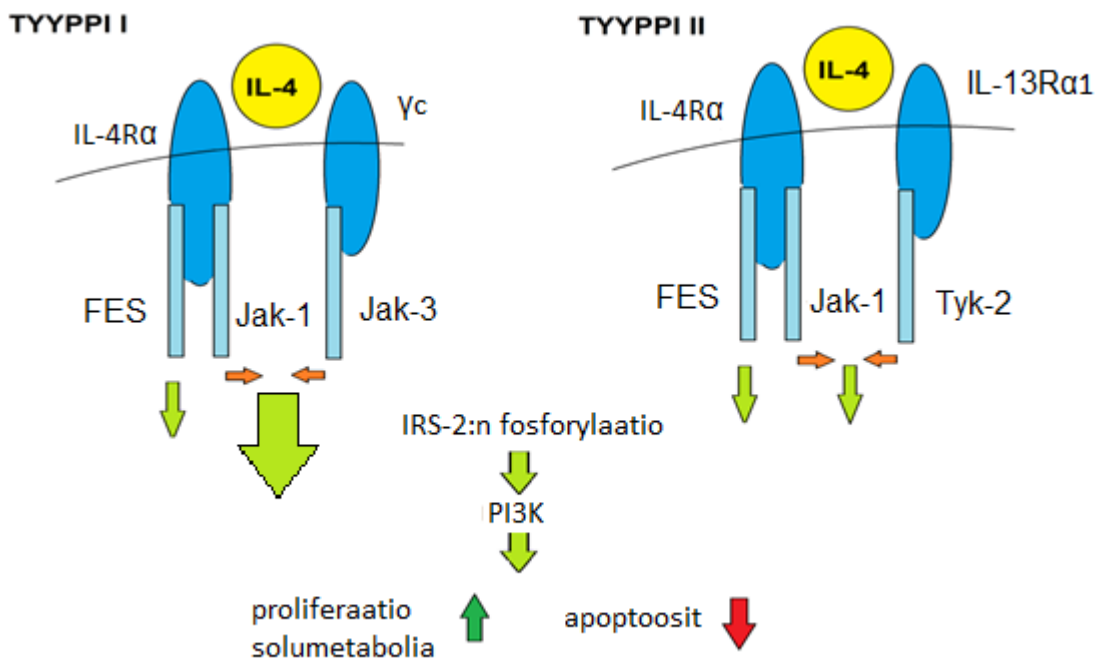
IL-4R:n ekstrasellulaarinen aktivoituminen käynnistää useita intrasellulaarisia signalointijärjestelmiä. Näistä merkittävimmät ovat IL-4 sitoutumisen aikaansaama IL-4R α -ketjun itsensä sekä siihen liittyneiden insuliinireseptori substraatin (IRS) -1/2:n ja signaalin välittäjä ja transkription aktivoija 6:n (STAT6) fosforylaatio. Tämä johtaa geeniluennan muutosten kautta proteiinisynteesin sekä solumetabolian muutoksiin, jotka aikaansaavat solupopulaatiosta riippuen T_H2 ja T_H9 tyyppien immuunivasteiden synnyn ja IgE-tuotannon lisääntymisen sekä proliferaation ja apoptoosin eston. Myös muiden signalointimolekyylien kuten Shc:n, FRIP:n ja SHIP:n on

osoitettu fosforyloituvan IL-4-stimulaation seurauksena ja johtavan mm. ras/MAP-reitin aktivaatioon ja solujen mitoottisen aktiivisuuden lisääntymiseen. (7, 8, 15, 18, 19)

IL-4:n on osoitettu sitoutuvan ensiksi reseptorien IL-4R α -ketjuihin [10], joiden fosforylaation se aiheuttaa. IL-4R α :an sitoutuneet Jak1- ja Fes-kinaasit välittävät ekstrasellulaarisen sytokiinin sitoutumisen reseptoriin intrasellulaarisesti fosforyloimalla tyrosiiniaminohappoja sen α -ketjun solunsisäisessä hännässä ja siihen liittyvissä IRS-1/2- ja STAT6-signalointimolekyyleissä. (20, 21 & 22)

IL-4R α -ketjun lisäksi IL-4 reseptori koostuu joko γ c- tai IL-13R1 α -ketjusta, joista jompikumpi sitoutuu solun pinnalla ensin syntyneeseen IL-4/IL-4R α 1-dimeeriin. Tyypin I reseptorissa γ c ketjuun liittyy Jak3, ja tyypin II reseptorissa IL-13R1 α -ketjuun liittyy Jak3:a läheisesti muistuttava Tyk2. (15 & 22)

IL-4:n sitoutuminen IL-4 reseptoriin aikaansaa IRS-1/2:n fosforylaation joko IL-4R α :an liittyvän Jak-1 ja heterodimeerin γ c-ketjun Jak-3 tai IL-13R α 1-ketjun Tyk-2 aktivaation kautta tai suoraan aktivoimalla IL-4R α :an liittyvän Fes:in (15 & 20). On kuitenkin syytä olettaa, että γ c-ketjuun liittyvän Jak3:n kyky fosforyloida IL-4 vasteen kannalta merkityksellisempää IRS-2:ta on huomattavasti suurempi kuin Jak1, Tyk2 tai Fes:n. Heller ym. (2008) osoittivat, että IL-4R α ja γ c -ketjuista koostuva IL-4RI aikaansaa huomattavasti suuremman IRS-2-vasteen kuin IL-4RII, jossa γ c ketjua ei ole, huolimatta siitä, että IRS-2:n fosforylaatiovaste IGF-1:lle on samanlainen. (23) IRS-1/2:n fosforylaatio aikaansaa sytoplasmisten signalointimolekyylien, erityisesti PI3K:n, Src homology 2 (SH2)-komponenttien aktivaation. IRS-1/2-aktivaatiolla on lähinnä apoptoosia estäviä ja proliferaatiota lisääviä sekä solumetabolialla kiihdyttäviä ominaisuuksia (kuva 2). (18, 24, 25 & 26)



Kuva 2: IRS-2:n fosforylaatio IL-4R:n aktivaation seurauksena.

1.3.2 IRS ja STAT-6

IRS-2 on yksi neljästä erilaisesta IRS-proteiinista, jotka ylläpitävät solumetabolialia, solujen erilaistumista ja proliferaatiota. IRS-proteiinit eroavat toisistaan paitsi rakenteen, myös niitä ilmentävien kudoksien osalta. Ne välittävät useiden eri kasvutekijöiden reseptoreiden tyrosiinikinaasiaktiivisuuden SH2-signaalintimolekyyleille. IRS-1 aikaansaa PI3K, Grb-2, SHPTP-2 ja fosfolipaasi C γ :n aktivaation, mutta IRS-2 ja IRS-4 eivät aktivoi SHPTP-2:tä ja IRS-3 ei aktivoi fosfolipaasi C γ :tä. IRS-3 on myös muita IRS-proteiineja pienempi ja rakenteellinen homologia sen ja muiden IRS-proteiinien välillä on vähäisempää kuin muiden IRS-proteiinien keskenään. (27)

IRS-1:n merkitys korostuu erityisesti luurankolihasissa sekä rasvasoluissa ja IRS-2:n maksa- sekä haiman β -soluissa. IL-4:n solunsisäisen IRS-signaloinnin kannalta IRS-2:ta pidetään merkittävimpänä IRS-proteiinina. IRS-1 ja IRS-2 knock-out hiiret kärsivät metabolisista sairauksista, erityisesti glukoosinsiedon puutteista ja synnynnäisestä insuliiniresistenssistä, sekä merkittävistä kasvun ja elinten kehityksen häiriöistä, mutta IRS-3 knock-out hiiret eivät juuri poikkea tavanomaisista hiiristä ja IRS-4 knock-out hiiret kärsivät vähäisestä glukoosin siedon

heikkenemisestä. Sekä IRS-1 että IRS-2 hallitsematon ja liiallinen ilmentyminen assosioituu useisiin eri syöpiin, kuten rinta- eturauhas ja kolorektaalisyöpään. (27)

Fosforyloimaton STAT6 on sitoutunut IL-4R α -ketjuun, jossa on kiinnittymiskohdat useammalle kuin yhdelle STAT6-molekyylille kerrallan. Tyrosiiniamiinohappojen fosforylaation jälkeen STAT6 muodostaa dimeerin, joka kulkeutuu tumaan ja aikaansaa muutoksia geenitranskriptiossa. Allergisissa vasteissa STAT6:n fosforylaatio on välttämätön T_H2 ja T_H9 vasteen synnyssä, MHC-luokan pintaproteiinien tuotannon voimistamisessa ja IgE-vasta-aineiden synteisissä. (7, 8, 18, 22, 28 & 29)

1.4 IL-4R ja IL-4:n sitoutuminen

1.4.1 IL-4R ja IL-4:n sitoutumiskohdat

IL-4:n on osoitettu sitoutuvan ensin sille korkean affiniteetin omaavaan IL4-R α :an, jolloin muodostuu IL-4/IL-4R α -kompleksi. Vasta IL-4/IL-4R α 1-kompleksin muodostumisen jälkeen se sitoutuu dimeerin γ c- tai IL-13R α 1-ketjuun, joiden affiniteetti IL-4:lle ei ole fysiologisesti merkittävä ilman edeltävää IL-4R α -vuorovaikutusta. IL-4 muodostaa sidoksia reseptoriensa kanssa neljällä eri alueella, jotka on nimetty I, IIa, IIb ja III:ksi. Näistä I sijaitsee IL-4R α :ssa. IIa ja IIb sijaitsevat IL-4R α :n ja γ c tai IL-13R α 1 muodostaman Y:n muotoisen reseptoridimeerin haara-alueella. Alue III sijaitsee IL-13R α 1-ketjussa. Koska tyypin I reseptori ei sisällä IL-13R α 1-ketjua, ei IL-4–III – sitoutumista tapahdu kuin tyypin II reseptorivuorovaikutuksessa. Tyypin I reseptorin γ c-ketju sen sijaan muodostaa alueella IIa van der Waals – vuorovaikutuksia, joita ei ole havaittu IL-13R α 1:n yhteydessä. (11)

Tyypin I reseptorissa IL-4R α :n tyrosiini(Tyr)13, Tyr183, seriini(Ser)70 ja asparagiinihappo(Asp)72 muodostavat polaarisia sidoksia IL-4:n A- ja C-heliksien glutamiinihappo(Glu)9 ja arginiini(Arg)88:n kanssa sitoutumiskohdassa I. IL-4/IL-4R α -kompleksi sitoutuu γ c:hen kahdessa eri kohtaa, IIa:ssa ja IIb:ssä. IIa-alueella IL-4:n merkittäviä aminohappoja ovat Arg121, Tyr124 ja Ser125 ja γ c:n glutamiini(Gln)127, kysteiini(Cys)160, Cys209. Lisäksi IIa-alueella γ c:n proliini(Pro)207 ja leusiini(Leu)208 vuorovaikuttavat IL-4:n Gln8, isoleusiini(Ile)11 ja asparagiini(Asn)15 kanssa, ja IL-

4:n Tyr103 muodostaa van der Waals -vuorovaikutuksia γ -ketjun D1-alueen EF1-silmukan kanssa. IIb-alueella γ :n fenyyialaniini(Phe)186 ja Phe297 vuorovaikuttavat IL-4:n hydrofobisen alueen Tyr150-Tyr159 kanssa. (11)

Tyypin II reseptorissa alue I on identtinen reseptorin I alueen I kanssa. Näin muodostunut IL-4/IL-4R α -kompleksi sitoutuu IL-13R α 1:an alueilla IIa, IIb ja III. Tyypin II reseptorissa IIa-alueella IL-4:n Arg121, Tyr124 ja Ser125:n vastapareina toimivat IL-13R α 1:n Cys257, Cys320 ja Tyr321. Lisäksi alueella IIa IL-4:n Gln8, Ile11 ja Asn15 vuorovaikuttavat IL-13R α 1:n lysiini(Lys)318 ja Leu319 kanssa. Alueella IIb IL-13R α 1:n Pro189 ja Pro300 vuorovaikuttavat γ :n Phe186 ja Phe297:n tavoin IL-4:n hydrofobisen Tyr150-Tyr159 -alueen kanssa. Vain tyypin II reseptorin vuorovaikutuksissa esiintyvällä alueella III IL-13R α 1:n aminohapot Lys76-Ile78 vuorovaikuttavat IL-4:n aminohappojen Asn105-treoniini(Thr)108 kanssa. Alue III on merkittävä myös tyypin II reseptorin toimiessa IL-13:n reseptorina. Tällöin siihen kuitenkin sitoutuvat eri aminohapot, kuin IL-4-vuorovaikutuksessa. (11)

1.4.2 Sitoutumisenergia

LaPorte ym.(2010) osoittivat tutkimuksessaan (11), että vapaan energian muutos IL-4/IL-4R α -kompleksin sitoutuessa sekä γ - että IL-13R α 1-ketjuun on lähes sama ($\Delta G = -8,6$ kcal/mol γ :lle ja $-8,7$ kcal/mol IL-13R α 1:lle). Näistä γ :n sitoutumista IL-4/IL-4R α :aan ohjaa kuitenkin voimakkaammin entalpiian ($\Delta H = -11,7$ kcal/mol, $\Delta S = -10,5$ cal/molK) ja IL-13R α 1:n sitoutumista IL-4/IL-4R α :aan entropian ($\Delta H = -4,8$ kcal/mol, $\Delta S = 13,0$ cal/molK) muutos. Todennäköistä onkin, että IL-4/IL-4R α -kompleksin muodostumisen jälkeen vapaiden γ ja IL-13R α :n määrä solukalvolla määrittää kumpi IL-4R muodostuu (30).

1.5 IL-4 analogit

IL-4 reseptorin tarkan proteiinirakenteen selvittäminen on mahdollistanut tietyille reseptoridimerisaatiolle spesifisten IL-4 analogien valmistamisen. Aikaansaamalla pistemutaatioita

IL-4 geeniin on kyetty tuottamaan sytokiineja, joiden laskennallinen affiniteetti IL-4R:iin riippuu merkittävästi reseptorin heikon affiniteetin ketjun rakenteesta. (31)

Junttila ym. (31) kehittivät IL-4:stä sen D-heliksin pistemutaatioiden avulla erityisiä super-sytokiineja, superkiineja, joiden affiniteetti IL-4R:n γ c ja IL-13 α RI-ketjuihin eroaa merkittävästi villin tyyppin IL-4:stä. Erityisen voimakkaasti γ c:n kanssa ja villin tyyppin IL-4:ää heikommin IL-13R α 1 kanssa vuorovaikuttava IL-4 superkiini nimettiin RGA:ksi. RGA:ssa Lys117 korvattiin arginiinilla, Arg121 glutamiinilla, Tyr124 tryptofaanilla ja Ser125 fenyylialaniinilla. IL-13R α 1-ketjun kanssa villin tyyppin IL-4 voimakkaammin ja γ c:n kanssa heikommin vuorovaikuttava superkiini nimettiin KFR:ksi. Pistemutatuina aminohappoina toimivat Arg121, joka korvattiin lysiinillä, Tyr124, joka korvattiin fenyylialaniinilla, ja Ser125, joka korvattiin arginiinilla.(31)

RGA:n ja KFR:n kykyä stimuloida IL-4 vasteita arvioitiin mittaamalla STAT6-fosforylaatiota useissa eri solulinjoissa. RGA osoittautui fysiologisilla pitoisuuksilla noin 10-kertaa KFR:ää tehokkaammaksi vain tyyppin I reseptoria ekspressoivassa Ramos-solulinjassa, mutta konsentraatiota kasvatettaessa saavutetut fosforylaation maksimi-arvot eivät eronneet toisistaan. KFR oli 3-10 kertaa tehokkaampi kuin IL-4 ja RGA vain tyyppin II reseptoria ekspressoivassa A549-solulinjassa. Molempia reseptorityyppejä ekspressoivassa U937-solulinjassa erot sytokiinien välillä olivat hyvin vähäisiä, joskin RGA aikaansai hieman muita voimakkaamman vasteen. (31)

Samassa tutkimuksessa todettiin myös, että vaikka erot superkiinien ja villin tyyppin IL-4:n välillä jäivät alkuperäistä arviota vaatimattomammiksi, korostuvat niiden väliset erot tilanteissa, joissa reseptoriketjuja on solujen pinnoilla rajoitetusti. Tutkimus keskittyi STAT6-vasteiden mittaamiseen. Tässä tutkimuksessa oli tarkoitus tutkia IL-4:n toista merkittävää signalointireittiä eli IRS-2:n fosforyloitumista. (31)

2 Käsittely

2.1 Aineisto ja metodit

2.1.1 Solulinjat

Tutkimukseen valittiin ihmisen immortalisoidut solulinjat U937 ja Ramos, joista U937 on sekä tyypin I että tyypin II IL-4 reseptoria ekspressoiva monosyyttilinja ja Ramos vain tyypin I IL-4 reseptoria ekspressoiva B-solulinja. Ylläpidimme solukantoja 10 % inaktivoitua nautaeläimen sikiön seerumia sisältävässä RPMI-1640 kasvatusmediassa, johon lisättiin L-glutamiinia ja streptomysiiniä. Sytokiinistimulaatiota edeltävästi pyrimme laskemaan solujen luontaisen IRS-2 fosforylaation tason mahdollisimman matalaksi siirtämällä solut 14–20 tunniksi starvaatioliuokseen, jonka seerumipitoisuus oli 1 %, mutta joka muilta ominaisuuksiltaan vastasi täysin solujen kasvatusmediaa.

2.1.2 Sytokiinit ja stimulaatio

Käytimme solustimulaatiossa ihmisen villin tyypin (WT) IL-4:ää ja kahta, rekombinaatiotekniikalla valmistettua, IL-4 pistemutaatiovarianttia (RGA ja KFR). Näistä RGA on suunniteltu sitoutumaan paremmin erityisesti tyypin I ja KFR puolestaan tyypin II IL-4 reseptoriin. RGA:n vuorovaikutus IL-13R α 1 kanssa on myös huomattavasti WT:tä heikompi samoin kuin KFR:n vuorovaikutus γ c:n kanssa on WT:sen nähden huomattavasti vähäisempää. Stimuloimme sekä Ramos että U937 soluja 30 minuutin ajan 37 °C lämpötilassa sytokiinkonsentraatioilla 1 ng/ml ja 10 ng/ml kutakin IL-4 analogia.

2.1.3 IRS-2:n keräys

Stimulaation jälkeen pesimme solut käyttäen PBS-liuosta, siirsimme ne jääastiaan fosforylaation muutosten pysäyttämiseksi ja lysisimme ne Triton X + vanadaatti – liuoksella. Solukalvojen täydellisen hajoamisen jälkeen poistimme näytteistä suurimmat soluelimet ja solukalvon kappaleet sentrifugoimalla ja lisäsimme talteen kerättyyn solulimaan IRS-2 – vasta-aineen ja sen kanssa yhteensopivat proteiiniseparaasihelmet. Jätimme näytteet jatkuvaan liikkeeseen

kylmähuoneeseen 14–20 tunnin ajaksi mahdollisimman täydellisen sitoutumisen aikaansaamiseksi. Tämän jälkeen pesimme näytteet PBS-liuoksella, lisäsimme niihin natriumdodekyylisulfaatti-puskuria proteiinien tertiäärirakenteen rikkomiseksi ja kuumensimme ne 95 °C lämpötilaan 5 min ajaksi proteiiniseparaasihelmiä irrottamiseksi.

2.1.4 Fosforylaation osoitus Western Blot-menetelmällä

Western Blot tekniikkaa hyväksi käyttäen osoitimme kustakin näytteestä IRS-2 molekyylin fosforylaation määrän. Ensiksi erotimme IRS-2:n mahdollisista epäpuhtauksista natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesin avulla. Elektroforeesigeelistä siirsimme proteiinit nitriilimembraaneille, joille lisäsimme 0,1% TWEEN:iä sisältävän maito-blocking-liuoksen 45 min ajaksi. Puhdistimme membraanit blocking-liuoksesta ja siirsimme ne 14–18 tunnin ajaksi fosfotyrosiini (klooni 4G10) vasta-aineeseen. Lisäsimme fosfotyrosiini – vasta-aineesta puhdistetuille membraaneille anti-mouse – sekundäärivasta-aineen, joka oli konjugoitu HRP- molekyylin kanssa ja annoimme reagoida 45 min ajan. Kuvassimme membraanit ECL-kuvantamisaineita käyttäen. Membraanien pesuihin käytimme 0,1% TWEEN:iä sisältävää TBS-liuosta, jonka vaihdoimme kaksi kertaa kunkin pesun aikana poistaaksemme mahdollisimman suuren osan sitoutumattomista reagensseista.

2.1.5 Vertailukelpoisuuden osoitus

Tulosten vertailukelpoisuuden varmistamiseksi osoitimme membraaneilta myös IRS-2 molekyylin kaikkien muotojen määrän yhteneväisyyden eri näytteiden välillä. Tätä varten strippasimme membraaneilta fosforylaatiota osoittaneet fosfotyrosiini – vasta-aineet ja niihin sitoutuneet sekundäärivasta-ainekompleksit. Siirsimme membraanit uudelleen maito-blocking – liuokseen 45 min ajaksi ja puhdistamisen jälkeen lisäsimme niille IRS-2 – vasta-aineen 20 tunnin ajaksi. Sekundäärivasta-aineeksi valitsimme IRS-2 vasta-aineen kanssa yhteensopivan anti-rabbit – vasta-aineen, johon oli myös konjugoitu ECL-kuvantamisaineiden avulla osoitettavissa oleva HRP-

molekyyli. Membraanien pesuihin käytimme samaa TBS-liuosta kuin aiemmin. Tulokset kuvasimme röntgenfilmille.

2.1.6 Tulosten analysointi

Muunsimme röntgenfilmille tallentuneet tulokset digitaalisen muotoon käyttämällä Epson XP205 -skanneria. Tämän jälkeen analysoimme kuvat käyttäen ImageJ-ohjelmaa. Laskin jokaisesta mittauksesta fosforyloitunut IRS-2/IRS-2 –suhteen. Vertailukelpoisten arvojen saamiseksi suhteutimme saadun tuloksen kontrollinäytteen tulokseen (taulukot 1 ja 2).

2.2 Tulokset

2.2.1 Ramos – B-solulinja



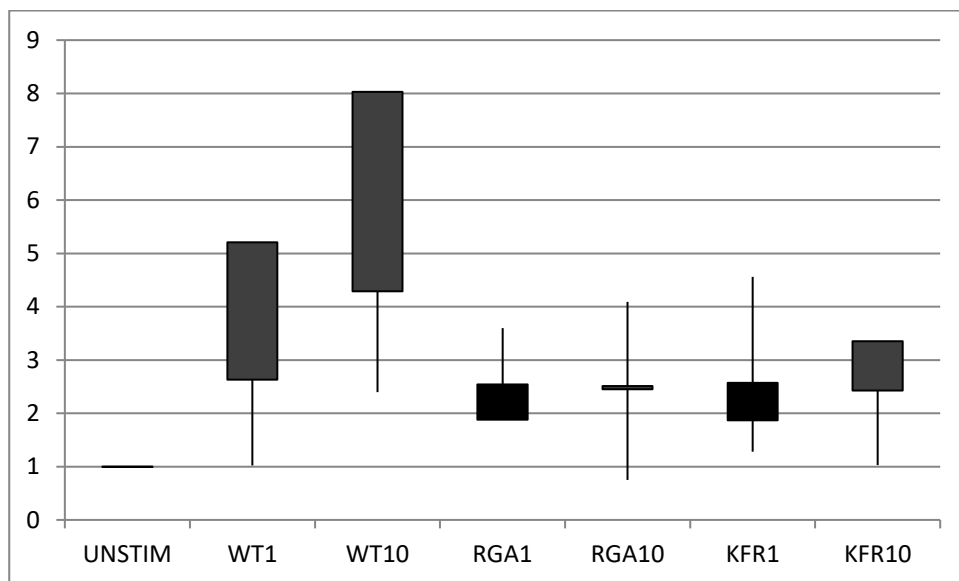
Kuva 3: Fosfotyrosiinivasta-aineella leimattu Western Blot Ramos-solulinjasta. Järjestyksessä vasemmalta oikealle stimuloimaton, WT 1ng/ml, RGA 1ng/ml, KFR 1ng/ml, WT10ng/ml, RGA 10ng/ml ja KFR10ng/ml.

Kuvassa 3 on esitetty malli Ramos-solulinjalla saaduista fosforylaatiotuloksista. Tulokset vaihtelivat suuresti mittauskerrasta toiseen, kuten taulukosta 1 käy ilmi. Keskiarvojen perusteella kaikki sytokiinit tuottivat n. 2,5-kertaisen fosforylaatiotason verrattuna stimuloimattomaan näytteeseen, kun sytokiinikonsentraatio oli 1ng/ml. Konsentraation kasvaessa 10ng/ml:aan vain ihmisen luontainen WT IL-4 sai aikaan merkittävästi lisääntynyttä fosforylaatiota.

RAMOS				keskiarvo
UNSTIM	1	1	1	1
WT1	5,21	1,67	1,02	2,63
WT10	8,03	2,40	2,44	4,29
RGA1	1,88	3,60	2,14	2,54
RGA10	2,51	4,09	0,75	2,45
KRF1	1,87	4,56	1,28	2,57
KRF10	3,35	2,90	1,03	2,43

Taulukko 1: Kolmesta mittauksesta saadut suhteelliset arvot IRS-2:n foforylaatiolle Ramos-solulinjassa.

Mittaustuloksista piirretty kuvaaja 1 osoittaa, mitaustulosten suuren vaihtelun. Koska näytteiden välinen hajonta on niin suurta, ei tuloksia voida pitää tilastollisesti merkittävänä.



Kuvaaja 1: Tulokset Ramos-solulinjasta.

2.2.2 U937 – monosyyttilinja



Kuva 4: Fosfotyrosiinivasta-aineella leimattu Western Blot U937-solulinjasta. Järjestyksessä vasemmalta oikealle stimuloimaton, WT 1ng/ml, WT 10ng/ml, RGA 1ng/ml, RGA 10ng/ml, KFR 1ng/ml ja KFR10ng/ml.

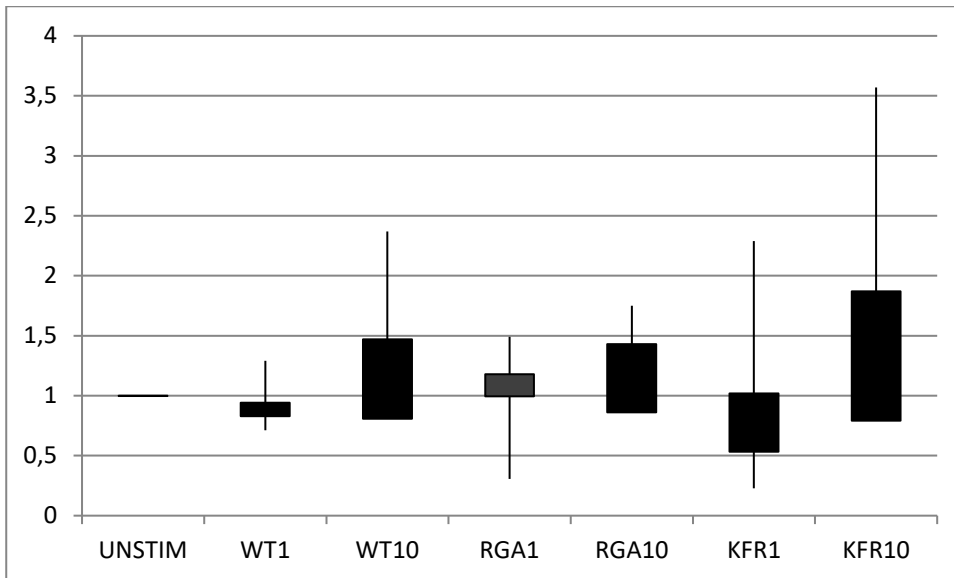
Kuvassa 4 on esitetty esimerkki U937-solulinjasta saaduista fosfotyrosiinivasta-aineleimatuista Western Blot –tuloksista. Taulukkoon 1 on koottu kolmen erillisen mittauskerran tulokset, jotka on suhteutettu stimuloimattomaan kontrollinäytteeseen.

Konsentraatiolla 1ng/ml stimuloituissa näytteissä ei keskiarvojen perusteella ole tapahtunut merkittävää IRS-2:n fosforylaation lisääntymistä. Konsentraation kasvattaminen kymmenkertaiseksi 10ng/ml:ään lisäsi fosforylaatiota sytokiinista riippumatta noin 1,5-kertaiseksi. KFR konsentraatiolla 10ng/ml lisäsi fosforylaatiota hieman RGA:ta ja WT:ä enemmän 1,87-kertaiseksi.

U937				keskiarvo
UNSTIM	1	1	1	1
WT1	0,829	0,711	1,29	0,942
WT10	0,808	1,22	2,37	1,47
RGA1	1,18	1,49	0,307	0,995
RGA10	0,862	1,68	1,75	1,43
KFR1	0,533	0,228	2,29	1,02
KFR10	0,792	3,57	1,233	1,87

Taulukko 2: Kolmesta mittauksesta saadut suhteelliset arvot IRS-2:n fosforylaatiolle U937-solulinjassa.

Kuvaaja 3 osoittaa saatujen mittaustulosten suuren vaihteluvälin ja sen, että tulokset asettuvat suurelta osin päällekkäin. Tulokset jäävätkin tilastollisesti merkityksettömiksi.



Kuvaaja 2: U937-solulinjasta saadut tulokset.

3 Pohdinta

3.1 Tulosten pohdinta

Tulokset IL-4 analogien merkityksestä IRS-2-molekyylin tyrosiinifosforylaatioon jäivät molempien solulinjojen osalta merkitsemättömiksi. Odotuksena oli, että sekä tyypin I että tyypin II reseptoreita ekspressoiva U937-linja olisi reagoanut yhtäläisesti kaikilla sytokiineilla ja vain tyypin I reseptoria ekspressoiva Ramos-linja ei olisi vastannut KFR:ään lähes lainkaan. Kuitenkin U937 vastasi hieman muita voimakkaammin KFR:ään ja Ramos ei osoittanut merkittävää eroa fosforylaatioissa KFR:n ja RGA:n välillä, mutta reagoi voimakkaasti WT:sen.

Tutkimukseni kohtasi monenlaisia ongelmia niin vasta-aineiden, menetelmän kuin soluvasteiden rajoitusten osalta.

Fosfotyrosiinivasta-aine tuotti mittauksissa lisähuuhteluista huolimatta runsaasti taustaa vaikeuttaen fosforylaation luotettavaa mittausta. Se myös reagoi muiden separaasin näytteeseen kuljettamien proteiinien kanssa.

IRS-2-vastaainetta käytettiin kahdessa eri vaiheessa tutkimusta. Sen avulla kerättiin IRS-2 solulysaatista. Mikäli sen määrä tai kyky sitoa IRS-2:ta oli riittämätön, voisi se selittää tulosten epäjohdonmukaisuutta. Lisäksi sen avulla määritettiin näytteiden kokonais-IRS-2. Koska tutkimuksessa mitattiin fosforyloituneen IRS-2:n osuutta kokonais-IRS-2:sta, johtaisivat virheelliset mittaustulokset tässä vaiheessa myös täysin vääristyneeseen lopputulokseen.

Tulosten analysointiin käytettävään ImageJ-ohjelmaan liittyy aina myös jonkin verran mittaajalähtöistä virhettä. Ohjelman käyttäjän on itse arvioitava piirretyltä käyrältä näytebandin alkamis- ja loppumiskohdat. Varsinkin silloin, kun taustaa on runsaasti, kuten tässä tutkimuksessa käytetyn fosfotyrosiinivasta-aineen kohdalla, on vaikea luotettavasti määrittää näytebandien rajoja.

Samoilla sytokiineilla tehdyissä muissa tutkimuksissa on raportoitu vain 3-10 kertaa spesifisempiä vasteita STAT-järjestelmän aktivaatiossa tyypin I reseptorissa (26). Lisäksi voi olla, ettei tiettyä raja-arvoa enempää IRS-2:n fosforylaatiota tapahdu, vaikka fosforyloimatonta proteiinia olisi jäljellä. Onkin siis mahdollista, ettei sytokiinistimulaation seurauksena IRS-2:n fosforylaatitasossa tapahdu erityisen suuria eroja, ja ettei Western Blot menetelmänä ole riittävän tarkka erottelemaan näitä.

3.2 Tulevaisuudennäkymät

CD4⁺ solujen T_H-polarisaation valinta ohjaa voimakkaasti immunipuolustuksen toimintaa. IL-4:n suuri merkitys immunijärjestelmän suuntaamisessa kohti T_H2 ja T_H9 vasteita ja pois T_H1 sekä T_H17 vasteista tekee IL-4 reseptorista ja sen eri tyyppien sytokiinivasteiden kartoittamisesta merkityksellisen tutkimusalan niin allergian, parasiittien torjunnan kuin erilaisten ei-toivottujen T_H1-vasteiden hillinnän kannalta. Tulevaisuudessa IL-4 reseptorin toiminnan tarkempi tuntemus voi ohjata uusien entistä vähäisempiä sivuvaikutuksia tuovien lääkehoitomuotojen kehitykseen sekä tuoda uusia lääkehoitomahdollisuuksia autoimmuunitautien hoitoon. (20, 32)

Myös liiallinen IL-4 aktivaatio johtaa erilaisten sairauksien syntyyn. Astmassa ja allergiassa havaitaan haitallista IgE-tuotannon lisääntymistä sekä mm. hengitysteiden epiteelisolujen hypertrofiaa ja kiihtynyttä limaneritystä. Tulehduksellisissa suolistosairauksissa IL-4 johtaa

tulehdusprosessia ylläpitävien T_H9 solujen syntyyn. Myös idiopaattisissa interstitielleissä pneumonioissa eli IIP-sairauksissa on osoitettu IL-4R α :n sekä liittyvän fibrotisoitumisen alkamiseen, että yhdessä IL-13R α 2:n kanssa ylläpitävän jo alkanutta fibrotisoitumista. Siispä myös selektiivisillä IL-4 antagonisteilla voi olla tulevaisuudessa suurtakin kliinistä merkitystä. (8, 32, 33)

Aiemmin IL-4 terapeuttista käyttöä ovat rajoittaneet siihen liittyneet rajut sivuvaikutukset, erityisesti vascular leak syndrome, mutta edistysaskeleet IL-4 analogien tuotannossa ovat tehneet siitä jälleen mielenkiintoisen lääketutkimuksen alan. Erinomainen esimerkki tästä on faasin III lääketutkimuksiin edennyt astman hoitoon kehitetty IL-4-mutantti Pitrakinra, joka on toistaiseksi osoittautunut erittäin lupaavaksi. Se on kompetitiivinen IL-4:n ja IL-13:n antagonisti, joka estää tehokkaasti niiden aikaansaamien tulehduksellisten vasteiden syntyä, erityisesti lymfosyyttien tyyppin T_H2 immuunivasteiden kehittymistä. Pistemutaatiot Arg121 asparagiinihapoksi ja Tyr124 asparagiinihapoksi estävät IL-4/IL-4R α -kompleksin sitoutumisen γ - tai IL-13R α 1-ketjuihin. Nämä aminohapot sijaitsevat LaPorten ym. (11) kuvaamalla IL-4:n reseptorien Ila-alueella. Myös tässä tutkimuksessa käytetyissä RGA ja KFR superkiineissä oli tehty mutaatiot näihin samoihin aminohappoihin, mikä viittaa niiden erityiseen merkitykseen IL-4:n ja sen reseptorien vuorovaikutuksissa sekä osoittaa niiden olevan muunneltavissa tavalla, joka säilyttää IL-4:n vuorovaikutusominaisuudet IL-4R α :n kanssa. (11, 31, 34)

Astman hoitoon on kehitetty myös muita interleukiineihin kohdistuvia lääkkeitä. Mepolitsumabi, IL-5-mutantti, on osoittautunut tehokkaaksi erittäin voimakkaassa, oraalista prednisolonihoitoa vaativassa astmassa, jossa ysköksissä on esiintynyt eosinofiliaa. Sen käyttö on mahdollistanut oraalisen, merkittäviä haittavaikutuksia aiheuttavan, prednisoloniannoksen pienentämisen. [35] Lebrikitsumabi, IL-13-vasta-aine, on parantanut huonossa hoitotasapainossa olevien aikuisten astmapotilaiden FEV₁-arvoja, mutta samalla aiheuttaa haittavaikutuksia tuki- ja liikuntaelimestössä [36]. Dupilumabi, joka on IL-4R α -vasta-aine, vähensi astman pahenemiskausia ja paransi astman hoitotasapainoa sekä astmaan liittyvien biomarkereiden arvoja, kun keskivaikeasta tai vaikeasta astmasta ja eosinofiliasta kärsineet aikuispotilaat, jotka käyttivät päivittäin inhaloitavia kortikosteroideja ja pitkävaikutteisia β -agonisteja, lopettivat kortikosteroidien ja β -agonistien käytön. Dupilumabi aiheutti kuitenkin pahoinvointia, päänsärkyä, nuhaa ja injektioaikojen tulehdusta. (37)

Tulevaisuudessa erilaisten biologisten hoitojen kliininen merkitys tulee lisääntymään voimakkaasti. Myös sytokiineihin kohdistuvat tai niitä apunaan käyttävät hoidot yleistyvät. Sytokiinien ja niiden

reseptoreiden rakenteiden tullessa tunnetuiksi ja lääkemolekyylien tuotantotekniikoiden kehittyessä sekä hinnan laskiessa tullaan biologisia hoitoja kokeilemaan yhä useammille potilaille, joilla perinteiset lääkkeet eivät ole tuottaneet riittävää vastetta. Onkin tärkeää tuntee näiden terapiakäyttöön valjastettujen sytokiiniinien toiminta ja siihen vaikuttavat tekijät mahdollisimman tarkasti, jotta syntyvät haittavaikutukset voidaan ennustaa ja mahdollisesti myös estää tai lieventää niitä muokkaamalla lääkeaineita toivotun kaltaisiksi.

4 Lähteet

- (1) Walter MR, Cook WJ, Zhao BG, Cameron RP Jr, Ealick SE, Walter RL Jr, Reichert P, Nagabhushan TL, Trotta PP, Bugg CE. 1992. Crystal structure of recombinant human interleukin-4. *J. Biol. Chem.* 267:20371-6
- (2) Seder RA, Paul WE. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T-cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12:635-73
- (3) Chen HJ, Paul WE. 1997. Cultured NK1.1(+)/CD4(+) T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. *J. Immunol.* 159:2240-49
- (4) Pelly VS, Kannan Y, Coomes SM, Entwistle LJ, Rückerl D, Seddon B, MacDonald AS, McKenzie A, Wilson MS. 2016. IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of TH2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Mucosal Immunol.* Feb 17. doi: 10.1038/mi.2016.4
- (5) Paul WE, Zhu J. 2010. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? *Nature Reviews Immunology* 10:225-235
- (6) Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* 17:701-38
- (7) Kovanen PE, Leonard WJ. 2004. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the γ_c -dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunological Reviews* 202:67-83
- (8) Kaplan MH. 2013 Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev.* 252(1):104-15
- (9) Paul WE. 1991. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77:1859-70
- (10) Wang X, Lupardus P, LaPorte SL, Garcia KC. 2009. Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 27:29-60
- (11) LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, Colf LA, Qi X, Heller NM, Keegan AD, Garcia KC. 2008. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell* 132(2):259-72
- (12) Ozaki K, Leonard WJ. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J. Biol. Chem.* 277:29355-8
- (13) Russel SM. 1993. Interleukin-2 Receptor γ Chain: A Functional Component of the Interleukin-4 Receptor. *Science* 262:1880-3
- (14) Wills-Karp M. 2004. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol. Rev.* 202:175-90
- (15) Jiang H, Harris MB, Rothman P. 2000. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:1063-70
- (16) Lin J-X, Migone TS, Tsang M, Friedmann M, Weatherbee JA, Zhou L, Yamauchi A, Bloom ET, Mietz J, John S. 1995. The role of shared receptor motifs and common stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13 and IL-15. *Immunity*

2:331-339

- (17) Lupardus PJ, Birnbaum ME, Garcia KC. 2010. Molecular Basis for Shared Cytokine Recognition Revealed in the Structure of an Unusually High Affinity Complex between IL-13 and IL-13R α 2. *Structure* Mar 10;18(3):332-42
- (18) Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, Keegan AD. 2003. IL-4 and IL-13 signaling connections maps. *Science* 300:1527-9
- (19) Nelms K, Snow A, Hu-Li J, Paul WE. 1998. FRIP, a Hematopoietic Cell-Specific rasGAP-Interacting Protein Phosphorylated in Response to Cytokine Stimulation. *Immunity* 9:13-24
- (20) Müller TD, Zhang J-L, Sebald W, Duschi A. 2002. Structure, binding and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1592:237-50
- (21) Izuhara K, Feldman RA, Greer P, Harada N. 1994. Interaction of the c-fes proto-oncogene product with the interleukin-4 receptor. *J. Biol. Chem.* 269:18623-9
- (22) Leonard WJ, O'Shea JJ. 1998. JAKS AND STATS: Biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* 18:293-322
- (23) Heller NM, Qi X, Junttila IS, Shirey KA, Vogel SN, Paul WE, Keegan AD. 2008. Type I IL-4 Receptors Selectively Activate IRS-2 to Induce Target Gene Expression in Macrophages. *Sci Signal.* Dec 23; 1(51): ra17.
- (24) Ihle JN, Kerr IM. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends in Genetics* 11:69-74
- (25) Zamorano J ym. 1996. IL-4 protects cells from apoptosis via the insulin receptor substrate pathway and a second independent signaling pathway. *J. Immunol.* 157:4926-34
- (26) Wang HY, Zamorano J, Keegan AD. 1998. A Role for the Insulin-Interleukin (IL)-4 Receptor Motif of the IL-4 Receptor α -Chain in Regulating Activation of the Insulin Receptor Substrate 2 and Signal Transducer and Activator of Transcription 6 Pathways. *J. Biol. Chem.* 273:9898-905
- (27) Giovannone B, Scaldaferrri ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Fusco A, Sbraccia P, Borboni P, Lauro R, Sesti G. 2000. Insulin Receptor Substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metabol Res Rev* Nov-Dec;16(6):434-41.
- (28) Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. 1996. Stat6 Is Required for Mediating Responses to IL-4 and for the Development of Th2 Cells. *Immunity* 4:313-9
- (29) Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE. 2001. Stat6 is Necessary and Sufficient for IL-4's Role in Th2 Differentiation and Cell Expansion. *J. Immunol.* 166:7276-81
- (30) Junttila IS, Mizukami K, Dickensheets H, Meier-Schellersheim M, Yamane H, Donnelly RP, Paul WE. 2008. Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4R α , IL-13R α 1, and γ c regulates relative cytokine sensitivity. *J Exp Med.* Oct 27;205(11):2595-608
- (31) Junttila IS, Creusot RJ, Moraga I, Bates DL, Wong MT, Alonso MN, Suhoski MM, Lupardus P, Meier-Schellersheim M, Engleman EG, Utz PJ, Fathman CG, Paul WE, Garcia KC. 2012. Redirecting cell-type specific cytokine responses with engineered interleukin-4 superkines. *Nat Chem Biol.* Dec;8(12):990-8.
- (32) Andrews A-L, Holloway JW, Holgate ST, Davie DE. 2006. IL-4 Receptor α Is an Important Modulator of IL-4 and IL-13 Receptor Binding: Implications for the Development of Therapeutic Targets. *J. Immunol.* 176:7456-6
- (33) Jakubzick C, Kunkel SL, Puri RK, Hogaboam CM. 2004. Therapeutic targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells in pulmonary fibrosis. *Immunol Res.*30(3):339-49.
- (34) Antoniu SA, Cojocaru I. 2010. Pitrakinra for asthma. *Expert Opin Biol Ther.* Nov;10(11):1609-15
- (35) Bel EH, Wenzel SE, Thompson PJ, Prazma CM, Keene ON, Yancey SW, Ortega HG, Pavord ID; SIRIUS Investigators. 2014. Oral glucocorticoid-sparing effect of mepolizumab in eosinophilic asthma. *N Engl J Med.* Sep 25;371(13):1189-97
- (36) Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR, Harris JM, Scheerens H, Wu LC, Su Z, Mosesova S, Eisner MD, Bohlen SP, Matthews JG. 2011. Lebrikizumab treatment in

adults with asthma. *N Engl J Med.* Sep 22;365(12):1088-98

(37) Wenzel S1, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, Wang L, Kirkesseli S, Rocklin R, Bock B, Hamilton J, Ming JE, Radin A, Stahl N, Yancopoulos GD, Graham N, Pirozzi G. 2013. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med.* Jun 27;368(26):2455-66