



Doctoral Thesis

The receptors for Interleukin-4- and Interleukin-13: in vivo and in vitro studies characterizing their distribution, regulation, and signal transduction in human target cells

Author(s):

Lugli, Serena M.

Publication Date:

1996

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001696022> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss ETH No. 11881

**The Receptors for Interleukin-4 and
Interleukin-13: *In Vivo* and *in Vitro* Studies
Characterizing their Distribution, Regulation, and
Signal Transduction in Human Target Cells**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY OF ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
SERENA M. LUGLI
dipl. Natw. ETH Zürich
born July 17, 1967
citizen of Luzern (LU), and Italy

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. F. E. Würzler, examiner
Dr. R. Moser, co-examiner
Dr. B. D. Car, co-examiner

Zürich, 1996

Zusammenfassung

Die Interleukine IL-4 und IL-13 sind funktionell und strukturell verwandte, hochwirksame Mediatoren des Immunsystems. Sie weisen pleiotropische Effekte auf Zellen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Ursprungs auf, und regulieren hauptsächlich inflammatorische und allergische Reaktionen. So veranlassen sie Endothelzellen zur spezifischen Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1. Dieses befähigt wiederum zirkulierende Eosinophile selektiv an inflammatorisch-aktivierte Endothel zu adhären, was deren Extravasation und Akkumulation ins perivaskuläre Gewebe zur Folge hat.

Auf ihren Zielzellen binden IL-4 und IL-13 an spezifische Transmembranrezeptoren. Der IL-4-spezifische Rezeptor ist die 130 kDa schwere IL-4R α -Kette, welche IL-4 mit hoher Affinität bindet (K_D 20 - 300 pM). Für IL-13 werden zur Zeit zwei spezifische Rezeptorketten postuliert. Bis anhin wurden je eine Rezeptorkette im Menschen und eine in der Maus charakterisiert. Obwohl beide ein Molekulargewicht von 65 - 75 kDa besitzen, sind keine Sequenzhomologien vorhanden. Der humane IL-13R weist zudem hohe Affinität für IL-13 (K_D ~ 250 pM) auf, während der murine Rezeptor, auch IL-13R α genannt, IL-13 mit relativ niedriger Affinität (K_D ~ 2-10 nM) bindet. Die Rezeptorketten für IL-4 und IL-13 sind fähig durch Heterodimerisierung mit individuellen Partner-Rezeptoruntereinheiten hochaffine Rezeptorkomplexe zu bilden.

So bindet IL-4 gemäss dem gegenwärtigen Modell an zwei Rezeptortypen. Der Typ I IL-4R besteht aus der IL-4R α -Kette und der sogenannten allgemeinen γ -Kette, die von den Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15 gemeinsam beansprucht wird. Der Typ II IL-4R setzt sich aus der IL-4R α -Kette und der "murinen" IL-13R α -Kette (Typ II A) oder dem "humanen" IL-13-bindenden Rezeptor (Typ II B) zusammen. Der humane Typ I IL-4R wurde *in vivo* immunhistochemisch auf Lymphozyten (vorwiegend T-Zellen) und der Typ II auf glatten Muskelzellen, sowie kapillären und venulären Endothelzellen nachgewiesen. Die Abwesenheit der Typ-I-spezifischen γ -Kette auf Endothelzellen konnte mittels Durchflusszytometrie, und Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion bestätigt werden. Der Typ I stellt somit die lymphozytär-hämatopoetische Form des IL-4Rs und der Typ II die vaskuläre Form dar. Die endotheliale Expression von VCAM-1 durch IL-4 ist folglich ein Typ-II-spezifischer Effekt. Dieser wurde zudem, durch eine Kombination von IL-4 und IL-13, auf nicht-additive Weise induziert. Einzig eine inaktive mutante

Form von IL-4 (IL-4Y124D), welche an die IL-4R α -Kette bindet, konnte den Effekt von nativem IL-4 und IL-13 hemmen. Dieser Befund spricht für die IL-4R α -Kette als gemeinsam verwendete Kette des Typ II Rezeptorkomplexes, die von beiden Zytokinen der Signalübermittlung dient. Sie ist auch die spezifische Ligand-bindende Kette des Typ I Rezeptorkomplexes.

Der vaskuläre Rezeptorkomplex besitzt *in vitro* Bindungsstellen mit ähnlicher Affinität für IL-4 (200 Bindungsstellen/Zelle, $K_d \sim 30$ pM) und für IL-13 (700 Bindungsstellen/Zelle, $K_d \sim 60$ pM), was einem Verhältnis von 1:3 entspricht. Radiomarkierte IL-4- und IL-13-Cross-Linking-Experimente haben die 130 kDa-Bande als die IL-4-bindende Kette und die Bande bei 65 - 75 kDa als die IL-13-bindende Kette des vaskulären Rezeptorkomplexes eindeutig identifiziert. Transkripte für diese mutmassliche "humane" IL-13R α -Kette konnten, unter Annahme homologer Sequenzen zwischen Maus und Mensch, mittels RT-PCR auf Endothelzellen nachgewiesen werden.

Die IL-4R α -Kette liess sich *in vitro* auf Lymphozyten durch IL-4 und auf Endothelzellen durch TNF, IL-1 oder LPS um ein 2- bis 3-faches induzieren. Dies bestätigt die IL-4R α -Kette als die einzige, selektiv- und subtypspezifisch-regulierbare Einheit beider IL-4R Typen, da die Expression der IL-13R α -Kette durch TNF unverändert blieb. Der TNF-Effekt war zudem mit Hilfe von selektiven TNF-Mutanten eindeutig dem p55-TNFR zuzuordnen.

TNF-Aktivierung führt zu einem numerischen Ausgleich der auf ruhenden Endothelzellen exprimierten Rezeptoruntereinheiten, was einem neuen Verhältnis von 1:1 entspricht. Die Zunahme des hochaffinen Typ II A Rezeptors, wahrscheinlich auf vermehrte Heterodimersierung zurückzuführen, ermöglicht eine erleichterte Signalübermittlung durch IL-4 und IL-13. Die in TNF-stimulierten Endothelzellen erhöhte Aktivierung des IL-4-spezifischen, signalübermittelnden STAT-Proteins (Stat6) konnte dies bestätigen.

Die vorliegende Studie hatte die Charakterisierung der Expression funktioneller und hochaffiner Rezeptorkomplexe für IL-4 und IL-13 auf human Zielzellen zum Ziel. Die wichtige Rolle von TNF in der Endothelaktivierung wurde bestätigt, da TNF, die Expression der IL-4R α -Kette regulierend, zu einer Zunahme des hochaffinen vaskulären Typ II Rezeptorkomplexes führt, welche die endotheliale Empfänglichkeit für IL-4 und IL-13 fördert. Die vorliegenden Befunde bezüglich Verteilung, Expression und Regulation der Rezeptoren für IL-4 und IL-13 in lymphozytären und vaskulären humanen Zielzellen unterstützen die pathophysiologisch signifikante Funktion dieser beiden Zytokine während inflammatorischer und allergischer Immunantworten.

Summary

Interleukins IL-4 and IL-13 are functionally and structurally related cytokines, with their principal site of action in the immune system. They exert largely overlapping, pleiotropic functions on cells of hematopoietic and non-hematopoietic origin, and are thought to play a significant regulatory role during inflammatory and allergic reactions. IL-4 and IL-13 induce the expression of the adhesion molecule VCAM-1, on endothelial cells, thereby enabling circulating eosinophils to selectively adhere to activated endothelium at sites of inflammation, followed by their extravasation and accumulation in perivascular tissues. IL-4 and IL-13 bind to specific transmembrane receptors present on their target cells. The IL-4-specific receptor is the 130 kDa IL-4R α -chain (IL-4R α), which binds IL-4 with high affinity (K_d 20 - 300 pM). IL-13 has been proposed to bind two different receptor chains, since two distinct IL-13 binding proteins have recently been characterized in man or mouse. Although these putative IL-13 receptors are 65 - 75 kDa in size, they demonstrate no sequence-homology. In addition, the human IL-13 receptor (IL-13R) exhibits high affinity for IL-13 (K_d ~ 250 pM), while the murine receptor, termed IL-13R α , binds murine IL-13 with a relatively low affinity (K_d 2 - 10 nM). These receptor chains are capable of forming a high affinity receptor complex through heterodimerization of individual partner subunits.

According to the currently proposed model, IL-4 binds two types of receptor complexes. The type I IL-4R consists of the IL-4-specific α -chain and the so-called common γ -chain, which is otherwise shared by the receptors for IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, and IL-15. The type II IL-4R is composed of the IL-4R α and the "murine" IL-13R α (type II A) or the "human" IL-13-binding protein (type II B).

The *in vivo* distribution pattern of the human type I and II IL-4Rs was characterized by immunohistochemistry of human tissues and tissues from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). The type I receptor was present on lymphocytes, predominantly T cells, while the type II was identified on smooth muscle cells, capillary and venular endothelial cells. The lack of the type-I-specific γ -chain on endothelial cells was confirmed by radioligand cross-linking, flow cytometry and RT-PCR. The type I IL-4R represents the lymphocytic-hematopoietic form of the receptor, while the type II IL-4R was shown to be the vascular form of the high affinity IL-4 receptor complex. Induction of endothelial expression of VCAM-1 by IL-4 can therefore be ascribed to the type II IL-4R. IL-4 and IL-13 were shown to exert a similar, non-additive effect on induction of

VCAM-1. A mutant, nonsignaling form of IL-4 (IL-4Y124D), capable of binding to the IL-4R α , inhibited this induction by native IL-4 and IL-13. The IL-4R α appears to be the common shared signaling subunit which forms the heterodimeric type II IL-4/IL-13 receptor complex as well as serving as the principle ligand binding subunit in the type I receptor complex.

In vitro analyses of the endothelial type II receptor complex revealed a single class of binding sites exhibiting similar high affinity for both IL-4 (200 binding sites/cell, K_d 30 pM) and IL-13 (700 binding sites/cell, K_d 60 pM), with an approximate numeric ratio of 1:3, respectively. Radioligand cross-linking studies revealed a banding pattern in which the 130 kDa subunit was clearly identified as the specific IL-4-binding protein, while the band at 65 - 75 kDa was shown to be the IL-13-binding subunit of the vascular type II receptor complex. Exploiting the likely high sequence-homology with the murine IL-13 receptor and sensitive RT-PCR methodology, transcription of the putative human IL-13R α was shown in HUVECs. The expression of the IL-4R α was shown to be upregulated by IL-4 on lymphocytes, whereas TNF, IL-1 and LPS induced IL-4R α expression on endothelial cells. This upregulation was approximately 2 to 3 fold for both cell types. The IL-4R α is therefore likely to be the unique regulatory subunit of the type I and II IL-4Rs, since the IL-13R α expression was not altered following stimulation with TNF. Experiments with TNF-mutants selective for either the p55 or the p75 TNFR showed TNF-induction of the IL-4 receptor expression on endothelial cells to be unequivocally transduced through the p55 TNFR. TNF-mediated activation of endothelial cells in culture corrects the numerical imbalance of the receptor subunits present on resting endothelial cells, with expression of the two presently demonstrated subunits approaching a ratio of 1:1. Upregulation of the vascular type II IL-4R would therefore likely enhance heterodimerization, and facilitate signaling through the type II receptor complex. This is consistent with the observed increased activation of the IL-4-specific, signal-transducing STAT protein (Stat6) on TNF-primed endothelial cells.

The objective of the present study was to characterize the expression of high affinity receptors for IL-4 and IL-13, being largely restricted to lymphoid and vascular structures. TNF was confirmed as the major mediator of endothelial activation by correcting the basal disequilibrium between the receptor subunits, and heightening endothelial cell responsiveness to IL-4 and IL-13, supporting a significant pathophysiological role for these T_H2 cytokines in modulating vascular functions during inflammatory or allergic events.