

**Der Einfluss von Common- γ -Ketten
Zytokinen und der Expression der
Common- γ -Ketten Rezeptoren auf die
humane T-Zellantwort**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ju-Young Kim
aus Moers

Düsseldorf, August 2024

aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie des
Universitätsklinikums Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Marc Jacobsen

2. Prof. Dr. Philipp Lang

Tag der mündlichen Prüfung: 10. März 2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
I. Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung.....	V
Summary.....	VII
1. Einleitung	1
1.1 Das humane Immunsystem	1
1.2 T-Zellen.....	1
1.2 Selbsttoleranz und Autoimmunität.....	2
1.3 Diabetes Mellitus Typ 1	3
1.3 Die gemeinsame Gamma-Kette (γ c).....	4
1.5.1 Der Interleukin-2 Rezeptor.....	5
1.5.2 Der Interleukin-7 Rezeptor.....	6
1.6 JAK/STAT Signaltransduktion	7
1.7 Regulierung des γ c-Rezeptors.....	9
1.8 Die γ c-Zytokine	10
1.8.1 IL-2.....	10
1.8.2 IL-7.....	11
1.9 Der Einfluss von γ c Zytokinen in Typ1-Diabetes.....	12
1.10 Zielsetzung.....	14
2 Veröffentlichung: High common-γ cytokine receptor levels promote expression of Interleukin- 2/Interleukin-7 receptor α-chains with implications on T-cell differentiation and function	15
4. Diskussion	29
4.1 Veränderter phänotyp in aktivierten T-Zellen nach modulation der γ c Expression	30

4.1.1	γ c-Expression in T-Zellen	30
4.1.2	Einfluss der γ c-Expression auf den Phänotyp und die Rezeptor-Expression von naiven T-Zellen: Direkte und indirekte Mechanismen der Regulation.....	30
4.1.3	Die Bedeutung der γ c-Expression und ihrer Interaktion mit Zytokinrezeptoren für die T-Zell-Funktion und Immunregulation.....	32
4.2	Die zentrale Rolle der γ c-Expression in der Regulation von T-Zellantworten und der Immunhomöostase	34
4.3	Die Rolle der γ c-Expression in der Regulation der T-Zell-Funktion und Immunantwort: Funktionelle und Signaltransduktions-Aspekte.....	36
4.4	Ausblick.....	39
Abbildungsverzeichnis		i
Literaturverzeichnis		ii
Danksagung.....		xiv
Eidesstattliche Erklärung		xv

I. Abkürzungsverzeichnis

γ c	gemeinsame gamma-Kette
<i>γc-high</i>	überexprimierte γ -Kette
<i>γc-low</i>	stark inhibierte γ c-Expression
<i>γc-medium-low</i>	moderat inhibierte γ c-Expression
AICD	aktivierungsinduzierten Zelltod (Activation Induced Cell Death)
CBA	zytometrische Bead-Analyse (Cytometric Bead Array)
CD	Unterscheidungsgruppen (cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA
DN	Doppel-Negativ-T-Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Durchflusszytometrie-Analyse (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor
IFN γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IL-2R α	Interleukin-2 receptor α -Kette
IL-2R β	IL-2 receptor β -Kette
IL-7R α	Interleukin-7 receptor α -Kette
ILC	angeborene lymphoide Zellen (innate lymphocytes)
JAK	Janus Kinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
PBMCs	mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
pSTAT	phosphoryliertes STAT
RNA	Ribonukleinsäure
shRNA	kleine Haarnadel-Ribonukleinsäure (small hairpin RNA)
SLE	systemischem Lupus erythematodes
STAT	Proteine zur Signaltransduktion und Aktivierung der Transkription (signal transducers and activators of transcription)
T1D	Typ-1-Diabetes

TCR	T-Zell-Rezeptor
TFH	Follikuläre T-Helferzellen
TH	Helfer-T-Zelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
Treg	regulatorische T-Zellen
X-SCID	X-Chromosomal vererbte schwere kombinierte Immundefizienz (X-linked severe combined immunodeficiency)

Zusammenfassung

Zytokine der common- γ (γ c) Rezeptorfamilie sind essenziell für die Differenzierung von T-Zellen und spielen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. Die Verfügbarkeit des γ c-Rezeptors (CD132) für assoziierte Rezeptorketten beeinflusst maßgeblich die Funktionen von T-Zellen. Angeregt durch die Beobachtung einer erhöhten γ c-Expression auf CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit Typ-1-Diabetes (T1D) durch Seyfarth et al. (1), untersuchte diese Studie die Auswirkungen unterschiedlicher γ c-Expressionen in aktivierten naiven T-Zellen. Der Fokus lag dabei auf den Common- γ -Zytokinrezeptoren für IL-7 und IL-2, die eine wesentliche Rolle in der Autoimmunantwort von T-Zellen spielen.

Um die Auswirkungen der γ c-Expression auf die T-Zellfunktion zu untersuchen, wurde die γ c-Expression in menschlichen primären naiven T-Zellen mittels lentiviraler Transduktion mit *small hairpin* (sh)RNAs und γ c-cDNA moduliert. Drei shRNA-Varianten mit unterschiedlicher Hemmungskraft (sh468, sh590 & sh653) und eine cDNA-Variante wurden identifiziert und verwendet. Die γ c-cDNA führte zu einer Erhöhung der γ c-Expression um etwa 30%. Sh468 zeigte den stärksten Effekt auf die γ c-Expression mit einer mittleren Hemmung von 83%. Sh590 hemmte die γ c-Expression um etwa 73%, während sh653 die geringste Hemmung der γ c-Expression mit 52% aufwies. Aufgrund der erheblichen negativen Auswirkungen auf die T-Zell-Überlebensfähigkeit *in vitro* wurden Zellen mit sh468-induzierter niedriger γ c-Expression nicht für weitere Untersuchungen herangezogen. Um die unterschiedlichen γ c-Expressionsniveaus widerzuspiegeln, erhielten die mit cDNA transduzierten T-Zellen die Bezeichnung " γ c-high", die mit sh653 transduzierten T-Zellen die Bezeichnung " γ c-medium-low" und die mit sh590 transduzierten T-Zellen die Bezeichnung " γ c-low". Anschließend wurden die T-Zellen mit unterschiedlicher γ c-Expression hinsichtlich ihrer Effekte auf den Phänotyp und deren Funktion nach Aktivierung analysiert.

Zunächst wurde die Expression der γ c-, IL-2R α - und IL-7R α -Kette in aktivierten nicht modulierten T-Zellen untersucht. Die γ c- und IL2R α -Ketten zeigten in den ersten Tagen einen starken Anstieg der Expression, der danach schnell wieder abnahm. Für

IL7R α wurde ein schneller Abfall der Expression bis Tag 1 festgestellt, gefolgt von einer stetigen erneuten Expression. Eine Restimulation am Tag 3 führte zu einer vorübergehenden Verringerung der IL7R α -Expression, die sich jedoch danach erholte. Die Modulation der T-Zellen zeigt, dass eine hohe γ c-Expression (γ c-high) eine signifikant erhöhte Expression der IL-2R α Kette sowie eine erhöhte Re-Expression der IL-7R α Kette nach der Aktivierung induziert. Die Hemmung der γ c-Expression führte zu einer unterschiedlichen Beeinflussung des T-Zell-Phänotyps: γ c-low T-Zellen wiesen eine signifikant geringere Expression von IL-2R α und IL-7R α sowie eine beeinträchtigte Proliferation auf. Im Gegensatz dazu zeigten γ c-medium low T-Zellen keine signifikant veränderte Expression von IL-2R α und IL-7R α , wiesen jedoch ebenfalls eine beeinträchtigte Proliferation auf. Darüber hinaus sezernierten γ c-high T-Zellen signifikant höhere Konzentrationen von Effektor-Zytokinen wie IFN- γ und IL-6 und zeigten eine erhöhte Phosphorylierung des Signaltransduktors und Aktivators der Transkription 5 (STAT5) sowie eine vermehrte Phosphorylierung von pSTAT1 und pSTAT3 nach der Aktivierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Schließlich wurde eine schnellere Transition hin zu einem CD45RO-positiven Effektor-/Gedächtnis-Phänotyp, bei CD4+ γ c-high T-Zellen beobachtet.

Die Studie zeigt, dass eine verstärkte γ c-Expression die Expression von IL-2R α und IL-7R α auf aktivierten naiven T-Zellen deutlich erhöht und signifikante Auswirkungen auf die T-Zell-Differenzierung und die Produktion von Effektor-Zytokinen hat. Darüber hinaus kommt es zu Veränderungen in den Zytokinsignalkaskaden.

Dies unterstreicht die Bedeutung der Regulation der γ c-Expression für die T-Zell-Funktion und γ c-vermittelte Signalwege bei Autoimmunerkrankungen, wie Typ-1-Diabetes (T1D). Frühere Studien hatten bereits eine erhöhte γ c-Expression und ein verändertes γ c/IL-2R α -Verhältnis in T-Zellen von T1D-Patienten gezeigt. Die vorliegende Studie bestätigt diese Befunde und deutet darauf hin, dass eine Dysregulation von γ c diese Veränderungen verursacht. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Auswirkungen auf regulatorische T-Zellen zu verstehen.

Summary

Common gamma chain (γ_c) receptor cytokines are essential for T cell differentiation and play a central role in the pathogenesis of autoimmune diseases. The availability of the γ_c receptor (CD132) for associated receptor chains significantly influences the functions of T cells. Motivated by the observation of increased γ_c expression on CD4⁺ T cells in patients with type 1 diabetes (T1D) by Seyfarth et al. (1), this study investigated the effects of different γ_c expressions in activated naive T cells. The focus was on the common γ_c cytokine receptors for the cytokines IL-7 and IL-2, which play an important role in the autoimmune response of T cells.

To investigate the effects of γ_c expression on T cell function, γ_c expression in human primary naive T cells was modulated using lentiviral transduction with small hairpin (sh)RNAs and γ_c -cDNA. Three shRNA variants with different inhibitory effects (sh468, sh590 & sh653) and one cDNA variant were identified and used. The γ_c -cDNA resulted in an approximately 30% increase in γ_c expression. Sh468 showed the strongest effect on γ_c expression with an average inhibition of 83%. Sh590 inhibited γ_c expression by about 73%, while sh653 showed the least inhibition of γ_c expression at 52%. Due to the significant negative effects on T cell survival in vitro, cells with sh468-induced low γ_c expression were not used for further studies. To reflect the different γ_c expression levels, the T cells transduced with cDNA were designated " γ_c -high", those transduced with sh653 were designated " γ_c -medium-low", and those transduced with sh590 were designated " γ_c -low". The T cells with different γ_c expressions were then analyzed for their effects on phenotype and function after activation.

First, the expression of the γ_c , IL-2R α , and IL-7R α chains was examined in activated non-modulated T cells. The γ_c and IL2R α chains showed a strong increase in expression in the first few days, which then declined rapidly. For IL7R α , a rapid decrease in expression was observed until day 1, followed by a steady re-expression. Restimulation on day 3 led to a temporary decrease in IL7R α expression, which however recovered thereafter. Modulation of the T cells showed that high γ_c expression (γ_c -high) induces significantly increased expression of the IL-2R α chain as well as increased re-expression of the IL-7R α chain after activation. Inhibition of γ_c

expression led to a differential effect on T cell phenotype: γ c-low T cells showed significantly lower expression of IL-2R α and IL-7R α as well as impaired proliferation. In contrast, γ c-medium-low T cells did not show significantly altered expression of IL-2R α and IL-7R α , but also showed impaired proliferation. In addition, γ c-high T cells secreted significantly higher concentrations of effector cytokines such as IFN- γ and IL-6 and showed increased phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) as well as increased phosphorylation of pSTAT1 and pSTAT3 after activation at different time points. Finally, a faster transition to a CD45RO-positive effector/memory phenotype was observed in CD4+ γ c-high T cells.

The study shows that enhanced γ c expression significantly increases the expression of IL-2R α and IL-7R α on activated naive T cells and has significant effects on T cell differentiation and effector cytokine production. In addition, changes in cytokine signaling cascades occur. This underlines the importance of regulation of γ c expression for T cell function and γ c-mediated signaling pathways in autoimmune diseases such as type 1 diabetes (T1D). Previous studies have already shown increased γ c expression and an altered γ c/IL-2R α ratio in T cells from T1D patients. The present study confirms these findings and suggests that dysregulation of γ c causes these changes. Further studies are needed to understand the effects on regulatory T cells.

1. Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Das humane Immunsystem spielt eine entscheidende Rolle beim Schutz des Menschen vor Krankheiten und Infektionen. Traditionell wird das Immunsystem in zwei Hauptkomponenten unterteilt: das angeborene und das adaptive Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem, bestehend aus Haut, NK-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, fungiert als erste Abwehrlinie gegenüber Pathogenen (2, 3). Diese Komponenten ermöglichen eine schnelle und unspezifische Reaktion gegenüber einer Vielzahl von Krankheitserregern und fremden Substanzen.

Das adaptive Immunsystem, repräsentiert durch B- und T-Zellen, spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung spezifischer Immunantworten. Diese Antworten werden zu einem späteren Zeitpunkt aktiviert und richten sich gezielt gegen Pathogene (4).

Durch die enge Koordination zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem wird eine umfassende und effektive Immunantwort sichergestellt, die den Organismus vor einer Vielzahl potenzieller Bedrohungen schützt.

1.2 T-Zellen

T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle im adaptiven Immunsystem, indem sie ein immunologisches Gedächtnis entwickeln und so zu einer langanhaltenden Immunität beitragen. Die T-Zellen werden anhand der Oberflächenmoleküle CD8 oder CD4 in zwei Gruppen unterteilt (5). Zu Beginn werden sogenannte Thymozyten im Thymus gebildet und durchlaufen dort eine positive und negative Selektion. Die Thymozyten, die diese Selektion überstehen, werden in die Peripherie entlassen und als naive T-Zellen bezeichnet. Naive T-Zellen hatten noch keinen Antigenkontakt und zeichnen sich durch ihr Expressionsmuster CD45RA+/CD45RO- auf ihrer Zelloberfläche aus. Sobald T-Zellen auf ihr spezifisches Antigen treffen, verändert sich das Expressionsmuster zu CD45RA-/CD45RO+, wie es bei präaktivierten T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen zu sehen ist (6). Neben dem veränderten Expressionsmuster ändern sich auch die funktionellen

Eigenschaften der T-Zellen. Naive T-Zellen exprimieren hauptsächlich das Zytokin IL-2, während aktivierte T-Zellen ein breites Spektrum an Zytokinen produzieren und aussenden.

Die CD8 T-Zellen im Immunsystem spielen eine entscheidende Rolle, indem sie Antigene durch ihre T-Zellrezeptoren erkennen, die von anderen Zellen über das MHC-I-Molekül präsentiert werden. Nach der erfolgreichen Antigenerkennung durchlaufen die CD8 T-Zellen eine Reihe von Prozessen, darunter Aktivierung, Proliferation und Differenzierung zu Effektor-T-Zellen. Diese Effektor-T-Zellen verwenden zytotoxische Moleküle, um die Erreger zu zerstören.

CD4 T-Zellen erkennen präsentierte Fremdpeptide über MHC-II-Moleküle (7). Nach der Erkennung des Antigens können naive CD4-T-Zellen verschiedene Differenzierungswege einschlagen und Untergruppen von Effektorzellen bilden. Diese Effektorzellen setzen unterschiedliche immunologische Moleküle frei und erfüllen verschiedene immunologische Funktionen. Die bedeutendsten CD4-Untergruppen sind TH1, TH2, TH17 und TFH, die ihre Zielzellen aktivieren, sowie regulatorische T-Zellen (Treg), die das Ausmaß einer Immunaktivierung begrenzen (8). Ein Teil der entstandenen Effektor-T-Zellen entwickelt sich zu Gedächtnis-T-Zellen, während die Mehrheit der T-Zellen eliminiert wird. Bei einer erneuten Konfrontation mit dem spezifischen Antigen werden die Gedächtnis-T-Zellen reaktiviert, begleitet von einer beschleunigten Proliferation. Dies führt zu einer effizienteren Eliminierung des Erregers im Vergleich zur ersten Infektion (9). Zwei der wichtigsten Moleküle in der T-Zell-Entwicklung sind die Zytokine Interleukin-2 und Interleukin-7, welche im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen.

1.2 Selbsttoleranz und Autoimmunität

Das Immunsystem, ein komplexes Netzwerk aus Zellen und Organen, stellt die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen eindringende Pathogene, Toxine und andere Fremdstoffe dar. Seine einzigartige Fähigkeit liegt in der präzisen Unterscheidung zwischen "Selbst" und "Nicht-Selbst": körpereigene Strukturen werden toleriert, während Eindringlinge eliminiert werden. Im Zentrum dieses fein abgestimmten Abwehrsystems steht die Selbsttoleranz, ein Mechanismus, der verhindert, dass sich das Immunsystem gegen den eigenen Körper richtet (10). Diese fundamentale Toleranz wird in den primären lymphatischen Organen,

Thymus und Knochenmark, etabliert. Hier werden Lymphozyten, die Vorläuferzellen der Immunabwehr, auf ihre Selbstreaktivität getestet (11, 12). Im Thymus erhalten die Lymphozyten von spezialisierten Zellen wie medullären Thymusepithelzellen, dendritischen Zellen und Makrophagen Antigenpräsentationen (12). Lymphozyten, die körpereigene Peptide mit hoher Affinität binden, werden durch negative Selektion eliminiert. So wird sichergestellt, dass autoreaktive Zellen, die fälschlicherweise körpereigene Strukturen angreifen könnten, aus dem Immunsystem entfernt werden. Versagt der Mechanismus der Selbsttoleranz, kommt es zur Autoimmunität: Das Immunsystem wendet sich gegen den eigenen Körper und attackiert körpereigene Zellen und Gewebe. Dies kann eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen auslösen, die durch autoreaktive T-Lymphozyten und Autoantikörper im Blut charakterisiert sind (9, 13). Die genauen Mechanismen, die zum Verlust der Selbsttoleranz führen, bleiben trotz intensiver Forschung noch weitgehend ungeklärt. Die Behandlung von Autoimmunerkrankungen zielt meist darauf ab, die überschießende Immunreaktion zu unterdrücken. Immunsuppressiva oder anti-inflammatorische Medikamente kommen zum Einsatz, um die Symptome zu lindern. Weltweit leiden schätzungsweise 100 Millionen Menschen an mehr als 80 verschiedenen Autoimmunerkrankungen (14).

1.3 Diabetes Mellitus Typ 1

Typ-1-Diabetes (T1D) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch die Zerstörung der pankreatischen Beta-Inselzellen (Betazellen) gekennzeichnet ist. Die überwiegende Mehrheit der T1D-Patienten entwickelt die ersten klinischen Symptome im Kindesalter, und der symptomatische Krankheitsbeginn geht mit einem massiven Rückgang der Betazellfunktion einher (etwa 10 % der verbleibenden C-Peptid-Serumspiegel) . Im unvermeidlichen Krankheitsverlauf nimmt die Betazellfunktion stetig ab, was bei der Mehrheit der T1D-Patienten zu niedrigen (oft nicht nachweisbaren) C-Peptid-Serumspiegeln führt. Tiermodelle und genetische Studien verdeutlichen die wichtige Rolle autoimmunbasierter Mechanismen bei T1D. T-Zellen sind zentrale Effektoren in der Krankheitsentstehung, und infiltrierende autoreaktive T-Zellen charakterisieren die Entzündung der Pankreasinseln, die für die Zerstörung der Betazellen verantwortlich ist. Die Häufigkeit von T-Zellen, die spezifisch für Betazell-Epitope sind, ist bei Patienten jedoch gering, und neuere

Studien deuten auf eine generell abweichende Effektorzellantwort bei T1D hin. Chronisch aktivierte T-Zellen wurden bei kürzlich diagnostizierten T1D-Patienten gefunden, aber die genaue Rolle und Bedeutung dieser T-Zellen in der Krankheitsentstehung bleibt unklar. Aktivierte T-Zellen hatten Gedächtnis-Effektorphänotypen und waren überwiegend IFN- γ -produzierende TH1-Zellen, aber auch TH17-Zellen und TH1/TH17-Zellen wurden gefunden. Insbesondere TH1-Zellen sind zentral für die Krankheitsentstehung, aber die Ursache für die chronische Aktivierung bleibt unklar. T1D-assoziierte genetische Varianten weisen auf eine möglicherweise beeinträchtigte Regulation aktivierter Effektorzellen hin. Regulatorische T-Zellen (Tregs) haben das Potenzial, pathogene Effektorzellen zu hemmen, aber eine beeinträchtigte Treg-Funktion wurde bei T1D festgestellt.

1.3 Die gemeinsame Gamma-Kette (γ c)

Die Common Gamma-Kette (γ c), auch bekannt als CD132, ist eine essenzielle Untereinheit der γ c-Rezeptorfamilie, die für die Signaltransduktion verschiedener Zytokine wie IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 verantwortlich ist und eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und dem Überleben von T-Zellen spielt. Die γ c wurde ursprünglich als Teil des IL-2-Rezeptors (IL-2R) identifiziert. Später fand man bei der Untersuchung der Krankheit X-chromosomal vererbter schwerer kombinierter Immundefizienz (X-SCID) heraus, dass die γ c neben dem IL-2 Rezeptor auch andere Rezeptoren beeinflusste. Bei Patienten mit X-SCID wurden Mutationen im IL2RG-Gen, das für die Kodierung von γ c verantwortlich ist, festgestellt. Diese Mutationen führen dazu, dass die Patienten weder T- noch NK-Zellen exprimieren können, was darauf hinweist, dass γ c eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und dem Überleben dieser Zellen spielt (15). Im Gegensatz dazu zeigen andere Mutationen, die zu einer IL2-Defizienz führen, nur verminderte T-Zellantworten, jedoch keine Veränderungen in den Mengen an T- und NK-Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Mutationen nicht nur den IL-2R betreffen, sondern auch andere Rezeptoren beeinflussen könnten (16). Diese Annahme wurde in weiteren Studien verfolgt und bestätigt. Die dabei identifizierten Rezeptoren wurden als γ c-Rezeptorfamilie zusammengefasst und sind alle Mitglieder der Typ I-Zytokin-Rezeptor-Familie.(17). Alle Rezeptoren dieser Familie und deren zugehörigen Zytokine haben einen wichtigen Einfluss auf das

Immunsystem und definieren das funktionelle Schicksal von T-Zellen im Rahmen des adoptiven Zelltransfers.

Dennoch wurde bislang keine genaueren Untersuchungen zur γc durchgeführt, um ihre Expressionseigenschaften, regulatorischen Mechanismen und zugehörigen Faktoren eingehend zu erforschen. Es wurde bislang allgemein angenommen, dass γc kontinuierlich exprimiert wird und als Adapterprotein fungiert, das bei der Übertragung von Zytokinsignalen beteiligt ist (17). In den letzten Jahren gab es jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass γc eine wichtige regulatorische und funktionelle Rolle spielt. In dieser Arbeit liegt der Hauptfokus auf die γc -Rezeptoren IL-2R und IL-7R bei aktivierten T-Zellen.

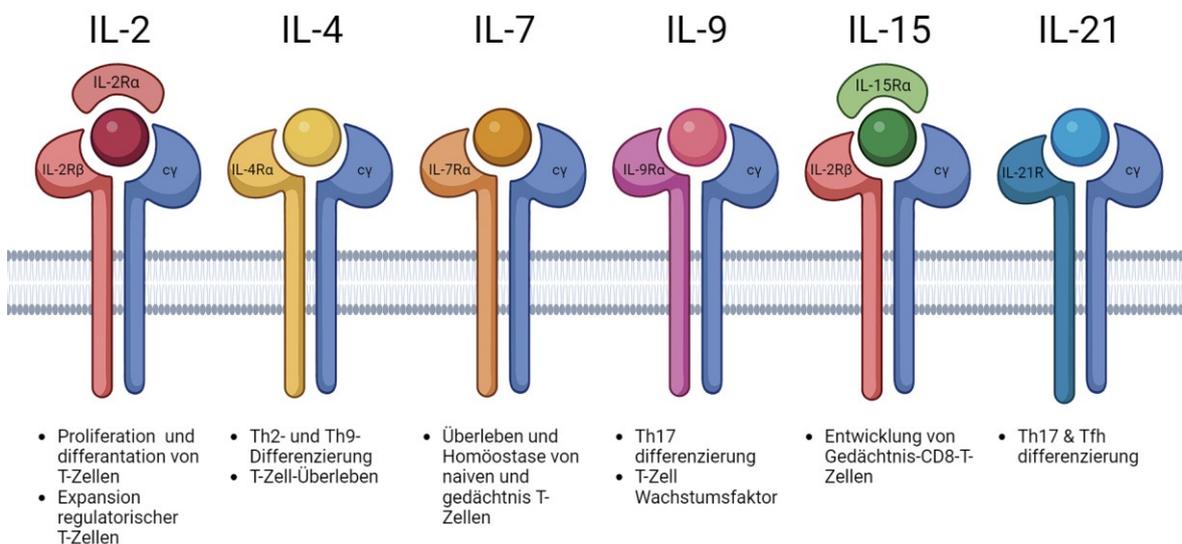


Abbildung 1 Die gemeinsamen Signalwege der γc -Zytokin-Familie haben einen Einfluss auf das funktionelle Schicksal von T-Zellen im Rahmen des adoptiven Zelltransfers. Diese Zytokine, nämlich IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21, interagieren mit ihren einzigartigen Zytokin-Rezeptoren. Die Signalwege, die von diesen Rezeptoren ausgehen, führen zu vielfältigen biologischen Ergebnissen, die wiederum die Differenzierung, Effektorfunktion und Gedächtnisentwicklung von T-Zellen beeinflussen.

1.5.1 Der Interleukin-2 Rezeptor

Der Interleukin-2 Rezeptor (IL-2R) besteht aus den Untereinheiten IL-2R α (CD25), IL2-R β (CD122) und γc (CD132), die zusammen eine hohe Affinität zu IL-2 aufweisen. Jede dieser Ketten zeigt allein eine geringe bis keine Bindungsaffinität zu IL-2 und kann keine eigenständige Signalübertragung vermitteln (18–20). Erst durch die Heterodimerisierung von IL-2R β und γc entsteht eine mittlere Affinität zu IL2, die in Kombination mit dem Zytokin ein effektives Signal an die Zelle vermittelt (21, 22). Die dritte Untereinheit, CD25, ist für die Bildung eines hoch affinen IL-2R-

Komplexes notwendig (18, 23). Der vollständige Komplex, der alle Ketten kombiniert, zeigt die stärkste Affinität zu IL-2 und vermittelt die meisten biologischen Effekte von IL-2 in vivo (24). Generell wird CD25 nach einer Zellaktivierung schnell an der Zelloberfläche hochreguliert und gilt daher auch als Aktivierungsmarker (25). Aktivierte T-Zellen, regulatorische T-Zellen (Tregs) (Malek und Bayer, 2004) und NK-Zellen (Becknell und Caligiuri, 2005) exprimieren hohe Mengen an CD25, und die Expression des hochaffinen IL-2R ist größtenteils auf diese Zellpopulationen beschränkt (26, 27).

Die Bildung des IL-2-IL-2R-Komplexes führt zur intrazellulären Signaltransduktion, die die Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalwege, die Phosphorylierung des Signaltransduktors und Aktivators der Transkription 5 (STAT5) und die STAT5-abhängige Genregulation aktiviert (28). Während STAT5 nach IL-2-Bindung in allen T-Zell-Subpopulationen ähnlich aktiviert wird, ist der PI3K-Signalweg in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschiedlich aktiviert und wird in CD4⁺Foxp3⁺ Treg aufgrund der hohen Expression der Phosphatase PTEN in diesen Zellen nicht induziert (29).

1.5.2 Der Interleukin-7 Rezeptor

Der Interleukin-7 Rezeptor (IL-7R) ist ein Heterodimer bestehend aus der IL-7R α Kette (CD127) und γ c (CD132) (25, 30, 31). Der Interleukin-7 Rezeptor teilt sich dabei die IL-7R α Kette mit dem Thymus Stroma-Lymphopoietin (TSLP) Rezeptor, während die γ c mit den Rezeptoren für Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-9, IL-15 und IL-21 geteilt wird (32–35). Dabei unterliegt IL-7R α einer starken Regulation während der T-Zellentwicklung.

IL-7R wird zunächst auf gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen (CLP) im Knochenmark induziert. Sowohl hämatopoetische Stammzellen (HSCs) als auch CLPs können wahrscheinlich frühe Vorläuferzellen der T-Zell-Linie erzeugen, die keine Expression von IL-7R α aufweisen. In den folgenden Differenzierungsschritten wird IL-7R α auf Doppel-Negativen-Thymozyten exprimiert, was die Umstrukturierung der T-Zellen-Rezeptor-Gene fördert, dann auf Doppel-Positiven-Thymozyten herunterreguliert und schließlich von Einzel-Positiven-Thymozyten wieder exprimiert. Diese wandern in die Peripherie und bilden den Pool naiver T-Zellen (36, 37). Naive, reife T-Zellen benötigen Signale von selbst-Peptid-MHC-

Komplexen und IL-7, um zu überleben (38). Nach der Aktivierung verlieren die meisten reifen, antigen-spezifischen T-Zellen die Expression von IL-7R α . Nur eine kleine Population von Effektor-T-Zellen behält IL-7R α an der Oberfläche, was zwar eine Markierung für Gedächtnis-T-Zellen darstellt, sie aber nicht direkt in solche umwandelt. (39). Der IL-7R wird vornehmlich von Zellen mit lymphoider Abstammung, wie sich entwickelnden B- und T-Zellen, reifen T-Zellen, und dendritischen Zellen und in geringen Mengen auch von Neuronen und Astrozyten exprimiert.

1.6 JAK/STAT Signaltransduktion

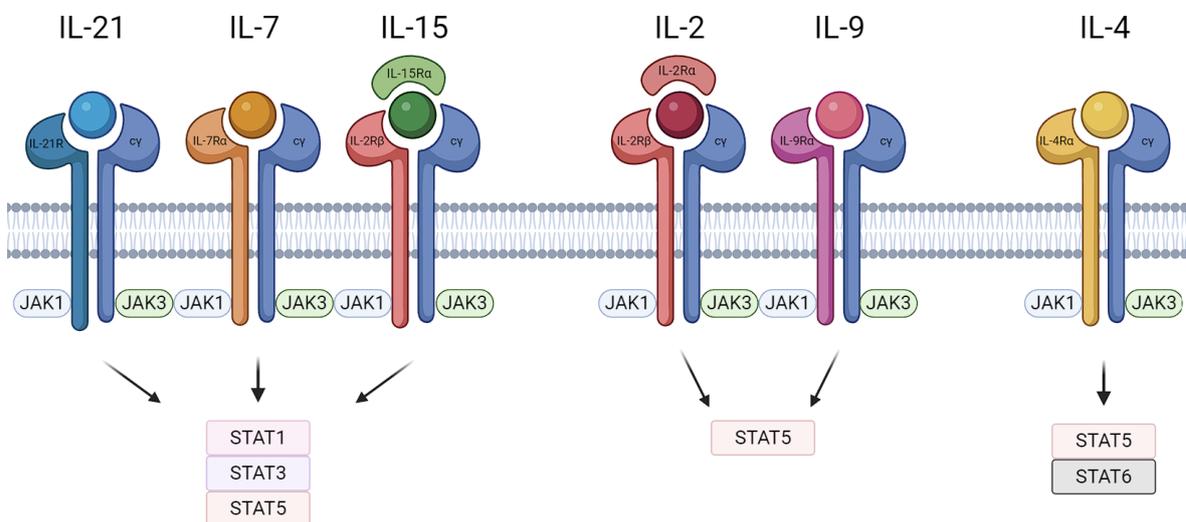


Abbildung 2 Jeder Rezeptor der γ -Zytokin-Familie bildet in Kombination mit der Gamma-Ketten-Untereinheit einen heterodimeren oder heterotrimeren Rezeptorkomplex. Durch die Bindung der Zytokine erfolgt die Phosphorylierung von JAK1 und JAK3, was wiederum die Aktivierung von STAT-Mitgliedern zur Folge hat. Diese aktivierten STAT-Moleküle wandern in den Zellkern und beeinflussen dort die Expression spezifischer Zielgene.

Rezeptoren der γ Familie zeichnen sich durch das Fehlen intrinsischer Proteinkinaseaktivität in ihren zytoplasmatischen Domänen im Gegensatz zu den meisten anderen Wachstumsfaktorrezeptoren aus. Daher ist die Bindung der Januskinase 1 (JAK1) an die Zytokin-spezifischen Rezeptorketten sowie die Assoziation von Januskinase 3 (JAK3) mit dem γ -Rezeptor von essenzieller Bedeutung für die Übertragung der durch Zytokine der γ -Familie induzierten Signale (40, 41).

Bislang nahm man an, dass die Bindung eines γ -Zytokins zur Vereinigung der Zytokinrezeptoruntereinheiten führt und dadurch die Signaltransduktion in Gang setzt. Jedoch verdichten sich die Hinweise, dass die Dimerisierung der Rezeptoren bereits vor der Zytokinbindung erfolgt (42). Diese vorgeformten Rezeptoren lösen keine Signaltransduktion aus, da ihre extrazellulären Domänen in einer konformationsabhängigen Weise gehemmt werden und erst durch die Bindung des jeweiligen Zytokins aktiviert werden. Diese Interaktion löst eine Konformationsänderung in den zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren aus, wodurch die assoziierten JAK1- und JAK3-Moleküle sowohl sich selbst als auch den Rezeptor phosphorylieren. Anschließend werden Signaltransduktions- und Aktivator-Transkriptions-Moleküle (STAT) zu den phosphorylierten Rezeptoren rekrutiert, wo sie ebenfalls durch JAK1 und JAK3 phosphoryliert und folglich aktiviert werden. Die γ -Familienrezeptoren initiieren vorrangig die Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5, wobei STAT6 in vergleichsweise geringerem Umfang involviert ist (43).

Nach Phosphorylierung bilden die STAT-Moleküle Dimerstrukturen durch eine bivalente Interaktion zwischen dem C-terminalen Phosphotyrosin eines Monomers und der SH2-Domäne eines anderen Monomers, was einen zentralen Mechanismus in der γ -Familienrezeptor-vermittelten Signaltransduktion darstellt. Das dimerisierte STAT-Molekül migriert anschließend in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor agiert und die Expression zahlreicher Gene reguliert, die in Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation und Überleben involviert sind. Nach Beendigung der Zytokinstimulation am Ende einer Immunantwort unterliegen die meisten T-Zellen einem programmierten Zelltod, der als Apoptose bezeichnet wird. Ein Teil dieser aktivierten T-Zellen bleibt jedoch als Gedächtnis-T-Zellen über Jahre hinweg funktionsfähig (44). Eine konstitutive Aktivierung dieses Signalwegs, sei es durch genetische Mutationen oder eine verstärkte Expression von beteiligten Molekülen, führt zu einer abnormen Proliferation und gesteigertem Überleben der T-Zellen (45–49, 40).

Ein weiterer wichtiger Signalweg für T-Zellen ist der Interleukin-6 induzierten Signalweg, welcher ebenfalls auf den JAK/STAT-Signalweg beruht. IL-6 als ein proinflammatorisches Zytokin spielt im angeborenen und adaptiven Immunsystem eine wichtige Rolle. IL-6 nimmt eine essentielle Rolle bei der Immunantwort, dem

Zellüberleben, der Apoptose und der Proliferation von T-Zellen, welche die Immunantwort regulieren, ein (50–52).

Die intrazelluläre Signaltransduktion von IL-6 erfolgt durch Transphosphorylierung und Aktivierung von Januskinasen, welche wiederum Tyrosin in der intrazellulären Domäne phosphorylieren. Dies löst die Rekrutierung STAT1 und STAT3 aus, welche daraufhin phosphoryliert werden. Die phosphorylierten und dimerisierten STAT-Moleküle können nun in den Zellkern gelangen und dort in die Transkription der DNA der jeweiligen Zelle eingreifen (43).

Generell spielt der JAK/STAT-Signalweg eine entscheidende Rolle in der physiologischen Aktivierung von T-Zellen während der Immunantwort, da die Signaltransduktion von Zytokinen zur T-Zell-Aktivierung, Differenzierung und Expansion beiträgt (53, 43).

1.7 Regulierung des γ c-Rezeptors

Obwohl wir bereits viel über die Regulierung der α -Ketten der γ c-Familie wissen, ist unser Verständnis der Regulation des γ c-Rezeptors begrenzt. Derzeit gibt es nur wenige Erkenntnisse über die Regulation des γ c-Rezeptors, was möglicherweise auf ein weit verbreitetes Missverständnis zurückzuführen ist. Dieses Missverständnis basiert auf der Annahme, dass die γ c-Expression konstitutiv und nicht durch Transkription reguliert ist. Dieser Irrtum gründet sich auf der Tatsache, dass der γ c-Promotor weder eine TATA- noch eine CAAT-Box aufweist, was darauf hindeutet, dass er den klassischen Merkmalen eines Housekeeping-Gens entspricht (54). Daraus wurde fälschlicherweise geschlossen, dass alle lymphatischen Zellen γ c konstitutiv exprimieren.

In Kontrast dazu wurde festgestellt, dass die γ c-Konzentration zwischen verschiedenen Lymphozyten-Untergruppen variiert und sich abhängig von ihrem Aktivierungsstatus ändern kann. Während der T-Zell-Entwicklung im Thymus wird γ c beispielsweise auf unreifen Doppel-Negativ-T-Zellen (DN) und Post-Selektions-Thymozyten stark exprimiert, während es auf den Prä-Selektions-Doppel-Positiv-T-Zellen deutlich herunterreguliert ist (55, 56). Zusätzlich führt die T-Zell-Aktivierung zur Induktion der γ c-Expression, wie durch TCR-Stimulation *in vitro* (57, 58) oder nach Virusinfektion *in vivo* (59) gezeigt wurde.

Auf der mRNA-Ebene wurde eine neue Spleißisoform von γc in sowohl Maus- als auch Human-T-Zellen identifiziert. Diese Isoform, bekannt als $s\gamma c$, kodiert für ein verkürztes γc -Protein, das löslich ist und potenziell sezerniert wird. Es fungiert als Regulator der γc -Zytokinsignalgebung und wird in aktivierten T-Zellen hochreguliert (57). All diese Beobachtungen legen nahe, dass die Expression von γc aktiv reguliert wird und dass ihre Regulation eine bedeutende Rolle bei der Immunantwort von T-Zellen spielen könnte.

1.8 Die γc -Zytokine

Die Familie der gemeinsamen Zytokinrezeptor- γ -Kette (γc) umfasst eine Reihe von Zytokinen, darunter Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21. Diese Zytokine haben breite pleiotrope Wirkungen auf das Immunsystem, indem sie sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem beeinflussen. Sie sind maßgeblich an der Entwicklung von verschiedenen Arten von Immunzellen beteiligt, darunter T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und angeborene lymphoide Zellen (ILCs). Abhängig vom Kontext können diese Zytokine entweder das Überleben oder den Zelltod von Immunzellen fördern und die Immunantwort auf verschiedene Weise modulieren. Diese Arbeit fokussiert sich dabei auf die Rolle der Zytokine IL-2 und IL-7 während der T-Zellaktivierung

1.8.1 IL-2

IL-2 ist ein vielseitiges Zytokin mit einem breiten Wirkungsspektrum. In T-Zellen führt die Aktivierung durch den TCR und die entsprechende Ko-Stimulation über CD28 zur Produktion von IL-2 und gleichzeitig zur Hochregulierung der Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors. Die Interaktion von IL-2 mit dem IL-2R treibt wiederum die Differenzierung von Effektor-T-Zellen voran. (60). Dadurch reguliert es die klonale Expansion von T-Zellen und beeinflusst die Proliferation sowie den aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) aktivierter T-Zellen (61–63). Außerdem wird IL-2 eine Rolle bei der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu TH2-Zellen nachgesagt. Dies geschieht, indem IL-2 die Transkription von IL-4 und IL-4R α über STAT5 fördert. Gleichzeitig ermöglicht IL-2 auch die Differenzierung zu TH1-Zellen (64, 65). Ein weiterer wichtiger Aspekt von IL-2 besteht darin, die Entwicklung von Tregs zu fördern. Durch seinen Einfluss auf die NK-Zellen sowie das Wachstum und

die Proliferation von T-Lymphozyten beeinflusst IL-2 indirekt auch die Produktion fast aller Zytokine, die von diesen Zellen produziert werden.

Ein Mangel an IL-2, CD25 oder CD122 beeinträchtigt die Anzahl und Funktion von Tregs, was zu lymphoproliferativen und Autoimmunerkrankungen führen kann (66). Interessanterweise wird STAT5 als ein wesentlicher Faktor für die Treg-Entwicklung betrachtet (67). In vitro kann IL-2 die Proliferation und klonale Expansion von Tregs vermitteln, während die Neutralisierung von IL-2 in vivo die klonale Expansion in den Lymphknoten verhindert (68, 69).

1.8.2 IL-7

IL-7 spielt eine essenzielle Rolle in der Entwicklung von T-Zellen, in Bezug auf das Überleben von Lymphozyten, insbesondere von naiven und Gedächtnis-T-Zellen (70, 71). Dieser Effekt basiert auf der Expression des IL-7R α auf diesen Zelltypen, da sowohl naive als auch Gedächtnis T-Zellen den IL-7R α exprimieren, wohingegen aktivierte T-Zellen die Expression herunterregulieren (72, 73).

Die Regulation der T-Zell-Homöostase ist maßgeblich von IL-7 sowie der Wechselwirkung zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und HLA-Klasse-II-Molekülen abhängig. Historisch wurde angenommen, dass die Produktion von IL-7 konstant ist und wenig durch äußere Einflüsse beeinflusst wird (17). Heutzutage wird jedoch davon ausgegangen, dass eine Feedback-Schleife die IL-7-Produktion reguliert (74). Dennoch bleibt die Annahme bestehen, dass die IL-7-Konzentration im Wesentlichen durch den Verbrauch und nicht durch die Produktion bestimmt wird. Da T-Zellen um die begrenzte Menge an verfügbarem IL-7 konkurrieren, beeinflusst die vorhandene Menge an IL-7 direkt die Größe und Diversität des T-Zell-Pools. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Expression des IL-7R so reguliert wird, dass nur diejenigen Zellen diesen Rezeptor exprimieren, die für ihr Überleben auf IL-7 angewiesen sind. Diese Form der Regulation hat erheblichen Einfluss auf die Diversität des gesamten T-Zell-Repertoires (75). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass IL-7 und andere durch Gamma-Ketten-Zytokine vermittelte Signale die Transkription und somit die Expression des CD8-Korezeptors regulieren. Diese Regulation ist essenziell für die Steuerung der Reaktivität der Zellen gegenüber Selbstantigenen innerhalb der Grenzen der Selbsttoleranz (76). Wie beschrieben, wird in T-Zellen der IL-7R α nach Aktivierung

herunterreguliert. In dendritischen Zellen hingegen führt die Herunterregulierung von MHC-Klasse-II-Molekülen dazu, dass CD4⁺ T-Zellen nicht aktiviert werden können, was wiederum zu einer verminderten homöostatischen Proliferation führt.(74).

Bei einer Beeinträchtigung des IL-7-Signalwegs durch Störungen, wie beispielsweise Mutationen im IL-7R α oder des JAK-Proteins, offenbaren betroffene Individuen vergleichbare Entwicklungsdefekte in den T-Zellen, wie sie bei Patienten mit X-SCID beobachtet werden (77). In dieser Hinsicht können die ausbleibenden T-Zellen infolge von Mutationen in der γ c ebenso auf den gestörten IL-7-Signalweg zurückgeführt werden (78, 79).

1.9 Der Einfluss von γ c Zytokinen in Typ1-Diabetes

In autoimmunen Erkrankungen wie Typ-1-Diabetes (T1D) spielen Dysregulationen der IL-2- und IL-7-Signalwege eine wichtige Rolle. Diese Erkrankungen, die von Immundefizienzen bis hin zu autoinflammatorischen Phänomenen reichen, sind auf Unregelmäßigkeiten in der Regulation von Immunantworten zurückzuführen (80, 81). Insbesondere zeigt sich bei T1D eine gestörte IL-2-Antwort, was zu einer verminderten Funktion regulatorischer T-Zellen führt und somit die Kontrolle über die Generierung selbstreaktiver T-Zellen beeinträchtigt (81).

Darüber hinaus können erhöhte IL-7-Level oder eine gesteigerte Empfindlichkeit von T-Zellen gegenüber IL-7 die Entstehung selbstreaktiver T-Zellen begünstigen (1). In NOD-Tiermodellen war die Blockade der IL-7-Rezeptor-Alpha-Kette (IL-7R α) in der Lage, neuen Ausbruch von Diabetes zu verhindern (und rückgängig zu machen). Effektor-T-Zellen von behandelten Tieren produzierten weniger IFN γ und verloren die Fähigkeit, Diabetes nach adoptiver Übertragung zu induzieren. Darüber hinaus führte die exogene Verabreichung von IL-7 zu einem Anstieg des Diabetes bei NOD-Mäusen (82, 83).

Die vorliegenden Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass Abweichungen in der T-Zellantwort auf die Zytokine IL-2 und IL-7 einen erheblichen Einfluss auf die Immunpathologie von Typ-1-Diabetes (T1D) haben könnten. Dies wurde ebenfalls durch eine Analyse der Expression der γ c-Rezeptoren in T-Zellen von T1D-Patienten und gesunden Kontrollen untersucht (84). Interessanterweise ergab diese Untersuchung eine signifikante Erhöhung der Expression von γ c- und IL-7R α -

Rezeptoren in T-Zellen von T1D-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen.

Außerdem zeigten Gedächtnis-CD4⁺-T-Zellen von Patienten mit T1D keine positive Korrelation zwischen der Expression des γ_c und IL-2R α , wie sie bei gesunden Kontrollpersonen beobachtet wurde. Da diese positive Korrelation bei naiven T-Zellen von T1D-Patienten erhalten blieb, lässt sich vermuten, dass T1D-spezifische Veränderungen der γ_c -Expression während der Bildung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen auftreten. Das Fehlen der Korrelation zwischen γ_c und IL-2R α sowie die allgemein erhöhte γ_c -Expression deuteten auf eine T1D-spezifische Hochregulation von γ_c in T-Zellen mit niedriger oder mittlerer IL-2R α -Expression hin. Diese Feststellung legt nahe, dass es bei T1D zu einer möglichen Dysregulation in der Koordination der Expression dieser Rezeptoren kommen könnte, was wiederum auf eine Störung des zellulären Mikromilieus und der Signalwege hindeuten, die an der Regulation der T-Zellantwort beteiligt sind. Die zugrunde liegenden Mechanismen dieser beobachteten Diskrepanzen in der Expression von γ_c und IL-2R α bei T1D-Patienten sind derzeit Gegenstand weiterer Untersuchungen. Es wird angenommen, dass komplexe zelluläre Signalnetzwerke und regulatorische Schleifen an der Modulation der Expression dieser Rezeptoren beteiligt sein könnten. Darüber hinaus könnten genetische und epigenetische Faktoren eine Rolle spielen, die die Expression und Funktion dieser Rezeptoren beeinflussen.

Monti et al. zeigten, dass die Blockierung von IL-2R α durch Daclizumab die proliferative Reaktion von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen auf das homöostatische Zytokin IL-7 erhöht. Da der IL-7R sich die γ_c -Kette mit dem IL-2R teilt, führt die Blockierung von IL-2R α durch Daclizumab zur verstärkten Bildung des IL-7R, wodurch IL-7 effizienter an die Zelloberfläche binden kann.⁽⁸⁵⁾ Diese Befunde legen nahe, dass die Expression und Funktion dieser Rezeptoren nicht nur durch die Verfügbarkeit ihrer ligandenspezifischen Zytokine, sondern auch durch gegenseitige regulatorische Wechselwirkungen beeinflusst werden können.

Die vorliegenden Erkenntnisse unterstreichen die Dringlichkeit einer eingehenden Untersuchung der molekularen Mechanismen, die der Dysregulation der Expression von γ_c , IL-2R α und IL-7R α bei T1D zugrunde liegen. Zusammenfassend deutet die vorliegende Evidenz darauf hin, dass das Gleichgewicht der Expressionsniveaus von γ_c und IL-2R α /IL-7R α für die T-Zellaktivierung, Differenzierung und Funktion

von entscheidender Bedeutung ist. Die erhöhte γ c-Expression bei T1D-Patienten könnte daher ein zentraler Faktor in der Pathogenese dieser Erkrankung darstellen. Eine vertiefte Kenntnis dieser Prozesse könnte nicht nur zu einem umfassenderen Verständnis der Pathogenese von T1D führen, sondern auch potenzielle therapeutische Ansätze zur Modulation dieser Zytokinrezeptoren aufzeigen.

1.10 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, ein in vitro Modell mit modulierter γ c-Expression durch lentivirale Transduktion zu etablieren, um die Auswirkungen variierender γ c-Rezeptor-Expression eingehend zu untersuchen. Im Rahmen dieser Studie erfolgt eine umfassende Analyse der Entwicklungs- und Aktivierungsabhängigkeiten, wobei insbesondere die Interaktionen zwischen γ c und den Rezeptoren IL-2R sowie IL-7R im Fokus stehen. Die spezifischen Ziele dieser Arbeit sind:

- 1.) Etablierung eines in vitro-Modells in primären T-Zellen mit modulierter γ c-Expression.
- 2.) Charakterisierung der Auswirkungen der γ c-Modulierung mittels lentiviraler Transduktion auf den T-Zell-Phänotyp.
- 3.) Untersuchung der Effekte unterschiedlicher γ c-Expression auf T-Zell-Aktivierung, Differenzierung, Überleben und Reifung
- 4.) Analyse der Auswirkungen der γ c-Modulierung auf die Zytokinsignalgebung und die freigesetzten Zytokine im zeitlichen Verlauf nach T-Zell-Aktivierung.

2 Veröffentlichung: High common- γ cytokine receptor levels promote expression of Interleukin-2/Interleukin-7 receptor α -chains with implications on T-cell differentiation and function

Beitrag zu dieser Veröffentlichung: 95%

- In-vitro-Experimente mit transduzierten & nicht transduzierten primären T-Zellen
- Generierung von Vektoren für die lentivirale Transduktion
- Testen der Vektoren in HEK293T-Zellen auf Wirksamkeit und Sensitivität
- Virusvermehrung und Transduktion von primären T-Zellen
- Analyse der transduzierten primären T-Zellen
- FACS-Analysen
- CBA-Analysen
- Datenanalysen



Received: 9 February 2024 | Accepted: 3 May 2024

DOI: 10.1111/imm.13800

ORIGINAL ARTICLE



High common- γ cytokine receptor levels promote expression of Interleukin-2/Interleukin-7 receptor α -chains with implications on T-cell differentiation and function

Ju-Young Kim | Ertan Mayatepek | Julia Seyfarth | Marc Jacobsen

Department of General Pediatrics, Neonatology, and Pediatric Cardiology, Medical Faculty and University Hospital Duesseldorf, Heinrich Heine University Duesseldorf, Duesseldorf, Germany

Correspondence

Marc Jacobsen, Department of General Pediatrics, Neonatology and Pediatric Cardiology, University Children's Hospital Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany.
Email: marc.jacobsen@med.uni-duesseldorf.de

Funding information

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Number: JA 1479/9-1

Abstract

Cytokines of the common- γ receptor chain (γ_c) family are crucial for T-cell differentiation and dysregulation of γ_c cytokine pathways is involved in the pathogenesis of autoimmune diseases. There is increasing evidence that the availability of the γ_c receptor (CD132) for the associated receptor chains has implications for T-cell functions. Here we studied the influence of differential γ_c expression on the expression of the IL-2R α (CD25), the IL-7R α (CD127) and the differentiation of activated naïve T cells. We fine-tuned the regulation of γ_c expression in human primary naïve T cells by lentiviral transduction using small hairpin (sh)RNAs and γ_c cDNA. Differential γ_c levels were then analysed for effects on T-cell phenotype and function after activation. Differential γ_c expression markedly affected IL-2R α and IL-7R α expression on activated naïve T cells. High γ_c expression (γ_{c-high}) induced significantly higher expression of IL-2R α and re-expression of IL-7R α after activation. Inhibition of γ_c caused lower IL-2R α /IL-7R α expression and impaired proliferation of activated naïve T cells. In contrast, γ_{c-high} T cells secreted significantly higher concentrations of effector cytokines (i.e., IFN- γ , IL-6) and showed higher cytokine-receptor induced STAT5 phosphorylation during initial stages as well as persistently higher pSTAT1 and pSTAT3 levels after activation. Finally, accelerated transition towards a CD45RO expressing effector/memory phenotype was seen especially for CD4⁺ γ_{c-high} naïve T cells. These results suggested that high expression of γ_c promotes expression of IL-2R α and IL-7R α on activated naïve T cells with significant effects on differentiation and effector cytokine expression.

KEYWORDS

CD127, CD132, CD25, common- γ receptor chain, IL-2 receptor α -chain, IL-7 receptor α -chain, lentiviral transduction, T-cell activation, type 1 diabetes

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/), which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Authors. *Immunology* published by John Wiley & Sons Ltd.

INTRODUCTION

Common- γ cytokines are named after the γ_c chain receptor chain (CD132) that is part of all receptor complexes in this family. γ_c cytokines fulfil various functions in the immune system and, especially, T-cell activation and differentiation depend on γ_c cytokines (mainly IL-2 and IL-7) [1]. IL-2 provides the crucial third signal during T-cell activation promoting proliferation and differentiation of naïve T cells towards effector T cells. IL-7 is central for the survival of naïve T cells and the generation of memory T cells after activation. The distinct functions of IL-2 and IL-7 are reflected by receptor expression differences [2]. While the IL-2 receptor α -chain (IL-2R α , CD25) is only moderately expressed in naïve T cells, marked up-regulation of IL-2R α upon T-cell activation is seen. In contrast, the IL-7 receptor α -chain (IL-7R α , CD127) is constitutively expressed on naïve T cells, is down-regulated rapidly after T-cell activation and re-expression of IL-7R α is induced on long-lived memory T cells [3]. γ_c is constitutively expressed on T cells and increased expression during T-cell activation has been described [4].

Dysregulation of IL-2 or IL-7 pathways can result in immunopathologies like immune deficiencies, auto-inflammatory diseases and/or auto-immunity [5, 6]. For example, in the autoimmune disease type 1 diabetes (T1D), an impaired IL-2 response leads to decreased regulatory T cell function, resulting in a loss of control over the generation of self-reactive T cells [6]. In addition, increased availability of IL-7 and/or higher sensitivity of T cells to IL-7 can promote the generation of self-reactive T cells [7]. Hence, changes in the T-cell response to both, IL-2 and IL-7, potentially affect immunopathology. Against this background, it was important to identify changes in the expression of γ_c receptors in T cells from patients with T1D [8]. Higher γ_c and IL-7R α expression were seen in T cells from T1D patients as compared to healthy controls [8]. In addition, the correlation between the expression of γ_c and IL-2R α , which has been described in T cells from healthy individuals, was disrupted in children with T1D [8]. The underlying mechanisms of associated IL-2R α / γ_c expression are unclear yet. However, these results argue for the necessity of a coordinated regulation to ensure fine-balanced γ_c and family cytokine receptor expression. This assumption was strengthened by Monti et al, who provided evidence that blocking of IL-2R α affected the availability of γ_c and caused increased γ_c dimerization with the IL-7R α chain [9]. In conclusion, previous studies support the assumption that the relative expression levels of γ_c and IL-2R α /IL-7R α may be important determinants for T-cell activation, differentiation and function.

Our own studies showed that in vitro activation of T cells and modulation by lentiviral transduction can be used as a model for characterization of γ_c cytokine functions [10]. To study the effects of differential γ_c expression on T-cell activation and differentiation, we transduced primary human naïve T cells after in vitro activation with CD3/CD28 coupled beads with γ_c receptor cDNA as well as shRNAs specific for γ_c . Overexpression (γ_{c-high}), as well as down-regulation of γ_c (using two shRNAs with different capacity to inhibit γ_c expression), was performed. Effects on γ_c cytokine receptors (i.e., IL-2R α , IL-7R α) expression, T-cell survival, maturation, cytokine signalling, and secreted cytokines were then analysed during the time course after T-cell activation.

MATERIALS AND METHODS

Enrichment and in vitro activation of naïve CD4⁺ T cells of PBMCs

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats or heparinized whole blood by density centrifugation (Biocoll Separating Solution, Biochrom) according to manufacturer's instructions. Buffy coats of healthy human individuals were retrieved from the Department of Transfusion Medicine and whole blood was taken from staff members of the Children's Hospital (both part of the University Hospital Duesseldorf). All donors provided written informed consent. The study was approved by the ethical committee of the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Duesseldorf (ID5445).

Untouched naïve T-cells were isolated from PBMC (5×10^7) by immunomagnetic non-contact enrichment (EasySept™ Human naïve Pan T cell isolation kit; Stemcell technology). An enrichment purity >98% was confirmed by flow cytometry. For initial in vitro T-cell activation, 1×10^5 naïve T cells were cultured per well of 96-well round bottom plates using X-vivo15 medium (200 μ L/well, Lonza) supplemented with Penicillin (100 U/mL)/Streptomycin (100 μ g/mL) (Sigma-Aldrich) at 37°C and 5% CO₂. Dynabeads T-Activator CD3/CD28 (0.5 μ L/well) (ThermoFisher) were added and the medium was supplemented with human recombinant IL-7 (1 ng/mL) (Sigma Aldrich). These in vitro activated T cells were used for lentiviral transduction and phenotype analyses by multi-colour flow cytometry. Different approaches of reactivation were performed and the details are indicated within the results section and the respective figure legends.

Multi-colour flow cytometry analysis of γ_c family receptors, CD45 isoforms and STAT phosphorylation

Cytokine receptor measurements were performed during the time course after T-cell activation with and without lentiviral transduction. IL-2R α and IL-7R α expression was determined *ex vivo* and on different time points thereafter using monoclonal antibodies against CD4 (0.02 μ L, clone SK3, colour PE-Cy7, BioLegend), CD8 (0.5 μ L, clone HIT8a, colour PerCP-Cy5.5, BioLegend), γ_c (0.5 μ L, clone TUGh4, colour AF647, BD), IL-2R α (0.5 μ L, clone M-A251, BV711, BioLegend), α IL-7R α (0.2 μ L, clone A019D5, PE, BioLegend), and viability dye eF780 (eBioscience).

Isotype controls were included for γ_c (Clone MOPC-21, AF488, BioLegend) to determine non-specific antibody binding. For STAT phosphorylation analysis, STAT1 (0.5 μ L, clone KIKSI0803, colour PE-Cy7, Invitrogen), STAT3 (0.5 μ L, clone LUVNKLA, colour APC, Invitrogen) and STAT5 (0.5 μ L, clone SRBCZX, colour PE, Invitrogen).

For CD45RO analysis, a monoclonal antibody against CD45RO (0.5 μ L, clone UCHL1, colour BV711, BioLegend) was used.

Mean fluorescence intensity (MFI) was determined for analysis of expression. Measurements were done using an LSR Fortessa (equipped with blue, red, violet, and yellow/green lasers, BD Biosciences). Data processing was performed using FlowJo software (FlowJo v10, LLC). A representative experiment to indicate the gating procedure is shown as Figure S1.

γ_c shRNA/cDNA plasmids for lentiviral T-cell transduction were tested in HEK293T-cells

For preselection of γ_c specific shRNAs with different inhibitory efficacy, five commercially available candidates (TRCN0000058468, TRCN0000058469, TRCN0000058472, TRCN0000372590, TRCN0000372591, TRCN0000372653; Sigma-Aldrich) were analysed by concomitant transfection of HEK293T cells with γ_c cDNA as described [11]. In brief, shRNAs were transferred into a GFP containing Lentiviral Gene Ontology plasmid (LeGO, kindly provided by B. Fehse, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany) as described [12]. γ_c cDNA was transferred into LeGO plasmids containing eBFP. γ_c cDNA eBFP LeGO plasmids were then co-transfected with shRNA plasmids or empty GFP-containing vector constructs into HEK293T cells. After culture (i.e., 24 h) HEK293T-cells were measured by flow cytometry. shRNA effects on γ_c cDNA were calculated as eBFP MFI differences between shRNA containing and

the 'empty' GFP LeGO vector. Three shRNAs (i.e., sh468, sh590, sh653) showed different levels of capacity to inhibit γ_c expression (data not shown) and were selected for naïve T-cell transduction.

Lentiviral transduction of naïve T-cells and in vitro time course experiments

Lentiviral transduction of activated primary naïve T cells was performed as described [11, 12] with minor modifications. Lentiviral particles containing supernatants were added on day 2 after initial activation. After overnight incubation, samples were washed and reconstituted in medium (for details see above) containing CD3/CD28 activating beads (0.5 μ L/well). Restimulation after lentiviral transduction was included since previous studies showed a better survival of T cells at late time points when being restimulated after lentiviral transduction [11]. Expression of lentiviral plasmids in primary T cells is detected after 2–3 days [12], which is why the time course analyses were started on day 4 after the first T-cell activation. A LeGO control vector (VC) expressing the same fluorescent marker as the respective modulatory shRNA or γ_c cDNA was included in all experiments. A schematic depiction of this approach is shown as Figure 1a.

In vitro competitive T-cell survival assay

To analyse the functional effects of modulated γ_c expression, we performed a previously described assay [11] based on concomitant transduction with lentiviruses containing either shRNAs or γ_c cDNA together with a VC (see above). Adjustment of added lentiviral supernatant volumes (according to single transduction experiments) was done to transduce comparable proportions of naïve T cells within the same culture well. Absolute numbers have been calculated by normalizing transduced T-cell numbers to counting beads (10 μ L; 123count eBeads, Thermo Fischer Scientific) added before flow cytometry analysis. Measurements were performed on d6, d8, and d10 after T-cell activation. The experimental scheme is depicted in Figure 3b. Representative FACS-plots are given in Figure S2.

Cytometric bead assay-based quantification of alternative cytokines

The LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay kit (LEGENDplex™ HU Th Cytokine Panel (12-plex)

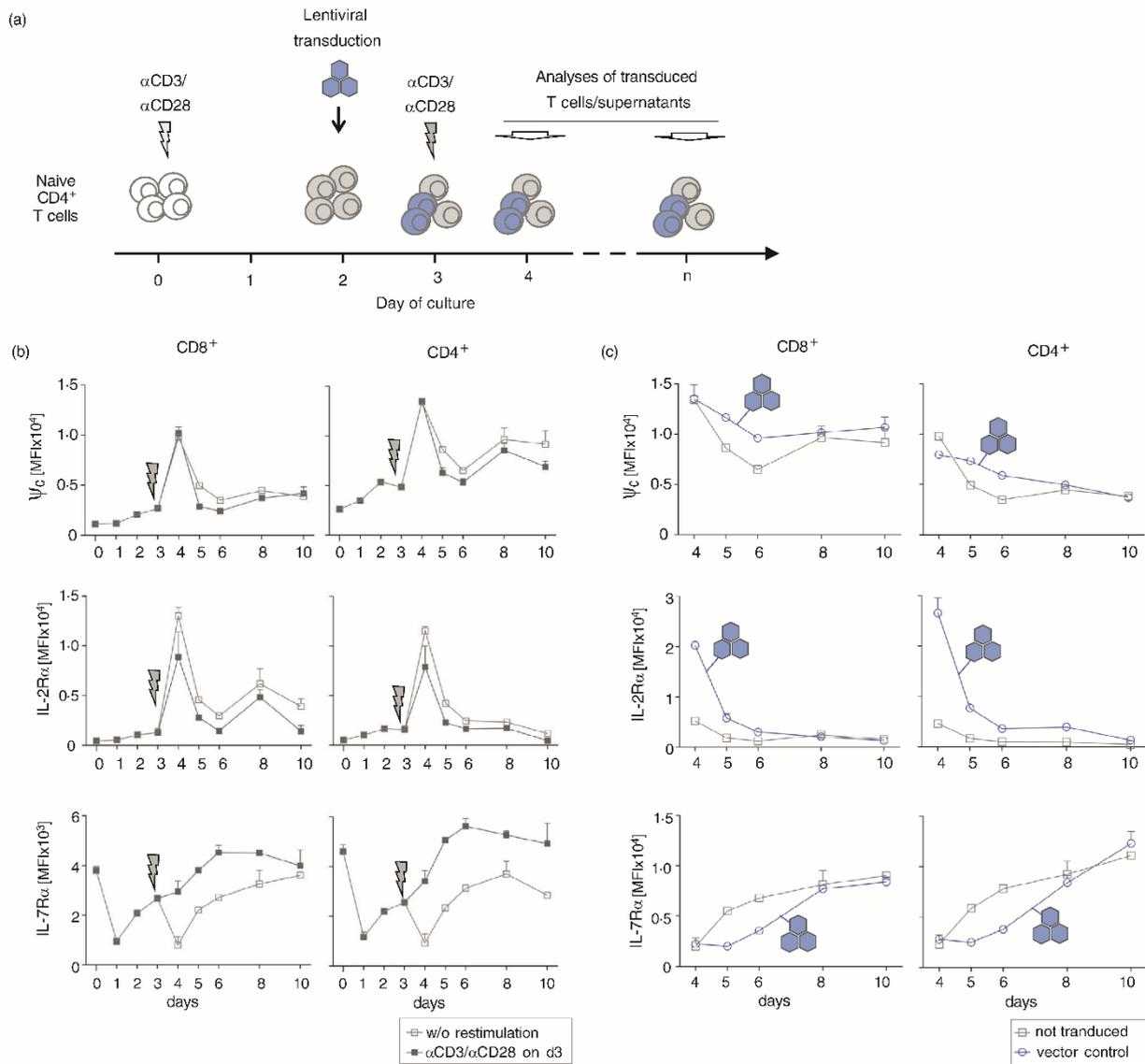


FIGURE 1 Time course analyses of γ_c , IL-2R α and IL-7R α expression after T-cell activation and lentiviral transduction of naïve T cells. (a) Schematic depiction of naïve T-cell activation, restimulation, and lentiviral transduction using a vector control. Flash symbols indicate the time points of α CD3/ α CD28 stimulation on day (d)0 (open) and d3 (grey). Blue hexagons indicate lentiviral transduction. (b, c) Time course analyses of γ_c , IL-2R α and IL-7R α expression in activated CD4⁺ (left panels) and CD8⁺ (right panels) naïve T cells. Results from representative experiments are shown. Symbols and error bars indicate mean values of duplicates and standard deviations, respectively. (b) Comparison of candidate expression with α CD3/ α CD28 or without (w/o) restimulation on d3. (c) Analysis of vector control transduction effects on γ_c , IL-2R α and IL-7R α expression.

w/VbP V02, Biologend, USA) was used for the simultaneous detection of different human cytokines (i.e., IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-22, IFN- γ , TNF- α) in culture supernatants according to manufacturer's instructions. Measurements were done using an LSR Fortessa (BD). Data were analysed using the cloud version of the Biologend LEGENDplex Data Analysis Software (Qognit. Inc).

Statistical analyses

GraphPad Prism (Version 10, GraphPad Software) was used for statistical analyses. Because of moderate numbers of experimental values, non-parametric distributions were assumed. In accordance, the Wilcoxon Signed-rank test was used to determine the significance of pairwise comparison of modulated γ_c effects and VC on T-cell

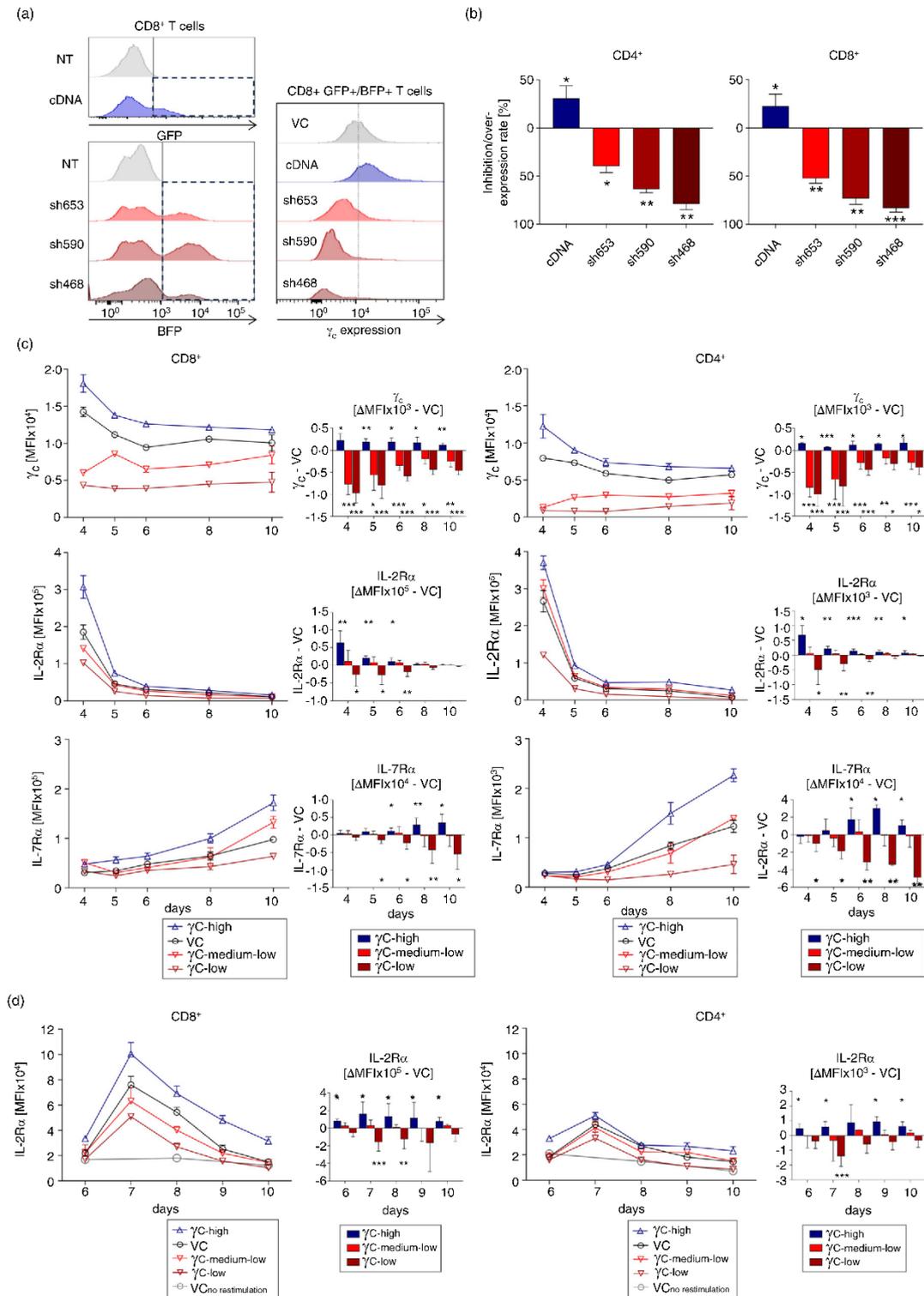


FIGURE 2 Legend on next page.

phenotype, signal transduction, and cytokine expression. A p -value <0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Time course analyses of γ_c , IL-2R α , IL-7R α expression and effects of lentiviral transduction during T-cell activation

T-cell expression of γ_c , IL-2R α , and IL-7R α is regulated during activation and differentiation. To determine these phenotype changes and to analyse the effects of assay-specific re-stimulation and lentiviral transduction, we performed time course phenotype analyses of naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells under distinct conditions. Initial activation by CD3/CD28 cross-linking is followed by a second addition of CD3/CD28 beads on d3 (Figure 1a). T-cell phenotype was initially analysed with or without re-stimulation (Figure 1b). γ_c and IL-2R α chains showed strong up-regulation within the first days and a maximum was reached on d4 (Figure 1b). Thereafter, γ_c and IL-2R α decreased rapidly (until d6) and γ_c showed re-expression between d8 and d10 (Figure 1b). Only minor differences were seen for γ_c and IL-2R α on CD4⁺ and CD8⁺ T cells when restimulation was done on d3 (Figure 1b). For the IL-7R α , a rapid decrease of expression was detected until d1 and this was followed by steady re-expression thereafter (Figure 1b). Restimulation on d3 transiently decreased IL-7R α expression but re-expression continued thereafter (Figure 1b).

Next, the influence of lentiviral transduction on the phenotype of activated (and restimulated) naïve T cells was analysed starting on d4 (Figure 1c). Both, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, showed less marked γ_c down-

regulation as well as delayed IL-7R α re-expression when transduced with a vector control (VC) (Figure 1c). In addition, IL-2R α expression levels were markedly higher in transduced T cells indicating boosted activation by lentiviral transduction (Figure 1c). As a consequence, VC transduction was used to control for lentiviral effects on T cells in all further experiments.

Identification of γ_c specific shRNAs with differential inhibitory capacity in activated naïve T cells

Next, we screened commercially available shRNAs for their capacity to inhibit γ_c . Three shRNAs (i.e., sh468, sh590, and sh653) with differential capacity to inhibit γ_c expression were identified on the basis of concomitant transfection of HEK293T cells with γ_c cDNA (see methods) and were selected for transduction of activated naïve T cells. The expression of γ_c was then determined for shRNAs as well as cDNA and compared to VC in transduced T cells (Figure 2a). The γ_c cDNA caused approx. 30% (range 15%–45%) increased γ_c expression and the shRNAs showed differential abilities to inhibit γ_c expression (Figure 2a,b). Sh468 had the strongest effect on γ_c expression (83% median inhibition; range 75%–86%; Figure 2a,b). Sh653 had the least inhibitory effect on γ_c expression (52%; range 47%–60%) and sh590 inhibited γ_c expression by approx. 73% (range 65%–82%) (Figure 2a,b). Low γ_c expression induced by sh468 strongly impaired T-cell survival in vitro and was, therefore, not included for further experiments. According to the efficacy to modulate γ_c expression, we termed T cells transduced with the cDNA (γ_{c-high}), sh653 ($\gamma_{c-medium-low}$) and sh590 (γ_{c-low}) throughout.

FIGURE 2 γ_c specific small hairpin (sh)RNA and γ_c cDNA transduction influence on γ_c , IL-2R α and IL-7R α expression after naïve T-cell activation. Lentiviral transduction of naïve T cells with different shRNAs specific for γ_c , γ_c cDNA and a vector control for flow cytometry phenotype analysis. (a) Representative histograms depicting the flow cytometry gating procedure for the lentiviral vector markers GFP (or BFP) are shown. Non-transduced T cells (NT) were used as a background control. Gates with dashed lines indicate the selected populations (i.e., GFP⁺, BFP⁺) for analysis of γ_c mean fluorescence intensity (MFI) (b) Differential expression of γ_c compared between shRNAs/cDNA of γ_c and the vector control (set to zero line) in activated CD4⁺ and CD8⁺ naïve T cells on day 5 is depicted as bar charts indicating median and range of independent experiments ($n = 3$). (c) Time course expression of γ_c , IL-2R α and IL-7R α MFI are depicted for lentiviral transduced naïve T cells with higher γ_{c-high} (cDNA) and lower γ_c ($\gamma_{c-medium-low}$, sh653; γ_{c-low} , sh590) as well as a vector control (VC) from a representative experiment (connected symbol plots). Symbols and error bars indicate mean values of duplicates and standard deviations, respectively. In addition, comparisons of individual time points for γ_c , IL-2R α and IL-7R α (all MFIs compared to VC; zero line) expression are shown in respective bar charts. Bars indicate median and range of independent experiments ($n = 5$). (d) IL-2R α MFI expression of CD4⁺ and CD8⁺ γ_c modulated naïve T cells (i.e., γ_{c-high} , $\gamma_{c-medium-low}$, γ_{c-low} , VC) after restimulation with α CD3/ α CD28 beads on day 5. Analyses were done on d6, d7, d8, d9 and d10. Flash symbols indicate the time point of restimulation with α CD3/ α CD28 beads. Differences from independent experiments ($n = 5$) were compared using the Wilcoxon Signedrank test and p -values below 0.05 were considered significant. Significant differences are indicated by asterisks: * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$.

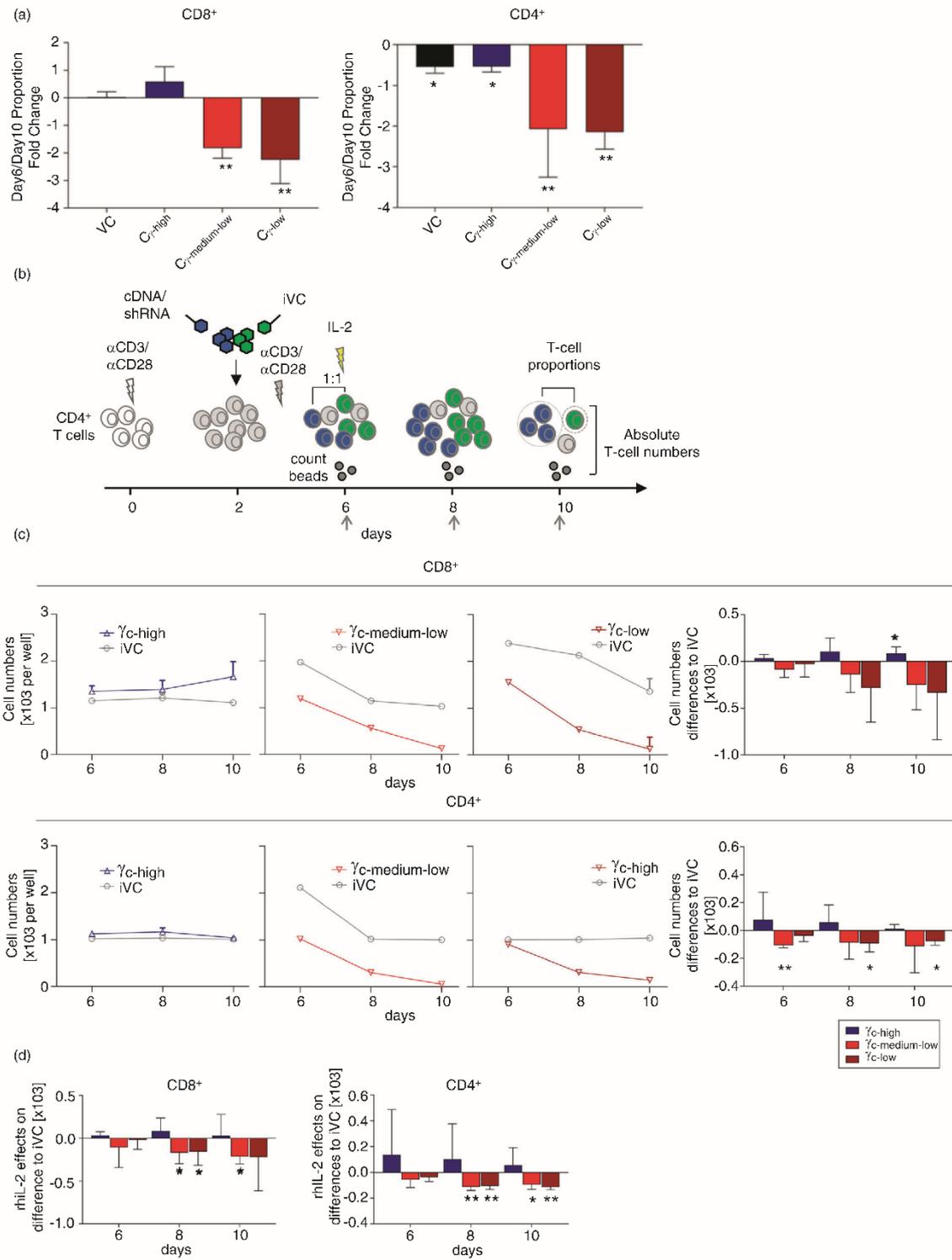


FIGURE 3 Legend on next page.

Influence of shRNAs inhibition and overexpression of γ_c on IL-2R α and IL-7R α expression after T-cell activation

Next, we analysed the phenotype of $\gamma_{c\text{-high}}$, $\gamma_{c\text{-medium-low}}$ and $\gamma_{c\text{-low}}$ naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells during the time course after activation. As expected, time course analyses confirmed γ_c modulation in transduced T cells (Figure 2c; upper graphs). Notably, we detected significant expression differences also for the IL-2R α and the IL-7R α chains in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 2c). $\gamma_{c\text{-high}}$ T cells had higher IL-2R α expression (as compared to VC) with significant differences until d6 for CD8⁺ T cells and throughout for CD4⁺ T cells (Figure 2c). $\gamma_{c\text{-medium-low}}$ T cells showed no significant differences IL-2R α expression while $\gamma_{c\text{-low}}$ had significantly decreased IL-2R α expression on d4, d5, and d6 (Figure 2c). For the IL-7R α , over-expression of γ_c led to significantly increased levels of re-expression from d6 on for CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 2c). As for the IL-2R α , only $\gamma_{c\text{-low}}$ T cells showed significant differences and decreased IL-7R α re-expression was detected from d4 (for CD4⁺ T cells) and d5 (for CD8⁺ T cells) (Figure 2c).

γ_c induced differences in expression were associated with endogenous IL-2R α /IL-7R α levels and rapidly decreasing IL-2R α expression after d4 complicated the measurement of γ_c effects. To confirm these results, we reactivated transduced T cells on d5 and determined the effects on IL-2R α expression thereafter (Figure 2d). Increased IL-2R α expression was detected after reactivation in $\gamma_{c\text{-high}}$ CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 2d). In addition, decreased IL-2R α expression was confirmed for $\gamma_{c\text{-low}}$ whereas no differences were seen for $\gamma_{c\text{-medium-low}}$ (Figure 2d). These results suggested promoting effects of high γ_c on IL-2R α and IL-7R α expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells after activation whereas only very low levels of γ_c expression affected IL-2R α and IL-7R α expression. Next, we aimed at characterizing

functional implications of T cells with modulated γ_c expression.

Lower γ_c levels entail a competitive proliferation disadvantage that cannot be compensated by increased IL-2 availability

Differential γ_c expression levels may affect T-cell functions including proliferation and survival. To address this question, we initially compared the proportions of T cells with modulated γ_c expression over time. Both, $\gamma_{c\text{-medium-low}}$ and $\gamma_{c\text{-low}}$ T-cell proportions, decreased markedly between d5 and d9 (Figure 3a). $\gamma_{c\text{-high}}$ CD4⁺ T-cell proportions decreased moderately and were similar to the VC. CD8⁺ $\gamma_{c\text{-high}}$ T cells showed a moderate but not significant increase between d5 and d9 (Figure 3a). Since changes in the absolute cell numbers and/or culture milieu conditions may influence these results, we used a previously described in vitro competitive growth assay based on concomitant transduction of T cells with a shRNA or cDNA together with an internal VC (Figure 3b). Different fluorescent dyes (i.e., GFP, eBFP) and inclusion of count beads allowed discrimination and quantification of T-cell subsets to compare cell growth and survival (Figure 3b). Decreasing numbers were especially detected for CD4⁺ $\gamma_{c\text{-medium-low}}$ and $\gamma_{c\text{-low}}$ T cells during the time course and lower numbers as compared to the internal VC were detected for different time points (Figure 3c). Only moderate differences were seen for CD4⁺ and CD8⁺ $\gamma_{c\text{-high}}$ T cells and increased numbers were only detected for CD8⁺ $\gamma_{c\text{-high}}$ T cells on d10 (Figure 3c). Since IL-2 is well described to promote T-cell proliferation and survival, we added recombinant IL-2 to determine if impaired growth of $\gamma_{c\text{-medium-low}}$ and $\gamma_{c\text{-low}}$ T cells can be reverted. Interestingly, addition of IL-2 even increased the absolute differences between $\gamma_{c\text{-medium-low}}$ or $\gamma_{c\text{-low}}$ and the iVC for both, CD4⁺ and CD8⁺ T cells

FIGURE 3 Effects of $\gamma_{c\text{-high}}$, $\gamma_{c\text{-medium-low}}$ and $\gamma_{c\text{-low}}$ expression on competitive T-cell survival in vitro. (a) Changes in the proportions of $\gamma_{c\text{-high}}$, $\gamma_{c\text{-medium-low}}$, $\gamma_{c\text{-low}}$ and VC naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells between d6 and d10 of culture. (b) Schematic depiction of the competitive cell growth in vitro assay for flow cytometry analysis of proportions and absolute numbers. This assay is based on concomitant transduction of T cells with a vector containing a candidate modulating function (here inhibition by shRNAs specific for γ_c or cDNA-mediated overexpression of γ_c) each together with an internal vector control (iVC) marked by different fluorescent dyes (i.e., GFP, BFP) and at comparable proportions. Immediately before flow cytometry analyses, count beads are added to each sample to determine absolute cell numbers per sample. This way, T cells with differential γ_c expression can be compared to T cells transduced with the iVC in the same well to analyse effects on cell numbers and proportions. Arrows indicate the time points of flow cytometry analyses. (c) Time course analyses of relative numbers of $\gamma_{c\text{-high}}$, $\gamma_{c\text{-medium-low}}$, $\gamma_{c\text{-low}}$ transduced naïve T cells as well as for the iVC depicted for a representative experiment (connected symbol plots). Symbols and error bars indicate mean values of duplicates and standard deviations. Bar charts show subtracted values of T cells with modulated γ_c expression from the iVC (set to zero line) for each time point. (d) Differences of samples with modulated γ_c expression compared to iVC in the presence or absence of human recombinant IL-2 are shown as bar charts. Analyses were done on d6, d8, and d10. Differences from independent experiments ($n = 3$) were compared using the Wilcoxon Signed-rank test and p -values below 0.05 were considered significant. Significant differences are indicated by asterisks: * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$.

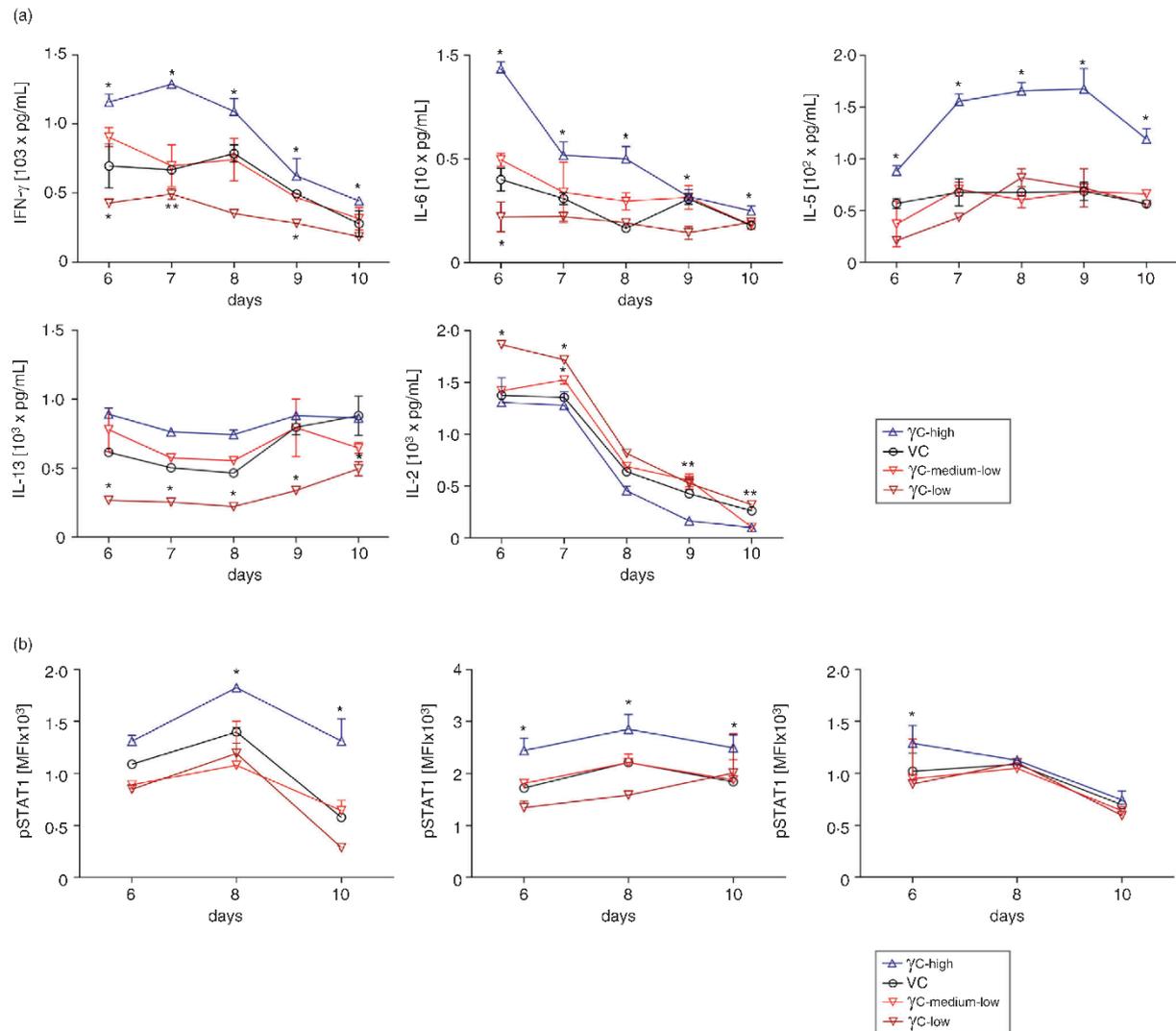


FIGURE 4 Cytokine expression and cytokine receptor signalling of γ_c -high, γ_c -medium-low, γ_c -low naive T cells. (a) T-cell cytokine concentrations were measured in the supernatant of transduced γ_c -high, γ_c -medium-low, γ_c -low, and VC T cells on d6, d7, d8, d9, d10 using the Th Cytokine 12-plex cytometric bead assay. Cytokine showing differential levels at one-time point or more (i.e., IFN- γ , IL-6, IL-5, IL-13, IL-2) are depicted. Median values and range from 5 repeated experiments are shown. Cytokine concentrations were compared to VC transduced T cells using the Wilcoxon Signed-rank test and p -values below 0.05 were considered significant. Significant differences are indicated by asterisks: * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$. (b) Phosphorylation of STAT1, STAT3, and STAT5 was determined in transduced γ_c -high, γ_c -medium-low, γ_c -low, and VC T cells using intracellular measurement by flow cytometry. Results from representative experiments are shown. Symbols and error bars indicate mean values of duplicates and standard deviations, respectively. Bar charts show subtracted values of T cells with modulated γ_c expression from the VC for each time point. Analyses were done on d6, d9 and d10. Differences from independent experiments ($n = 5$) were compared using the Wilcoxon Signed-rank test and p -values below 0.05 were considered significant. Significant differences are indicated by asterisks: * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$.

(Figure 3d). These results suggested impaired sensitivity of T cells with low γ_c expression to IL-2 and negative effects of lower γ_c expression on the in vitro growth of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. In contrast, only moderate effects of high γ_c expression on T-cell growth and survival were seen.

Higher effector cytokine secretion and cytokine-induced STAT signalling of γ_c -high T cells

Activated naive T cells differentiate and develop effector cell functions that can be measured by the secretion of

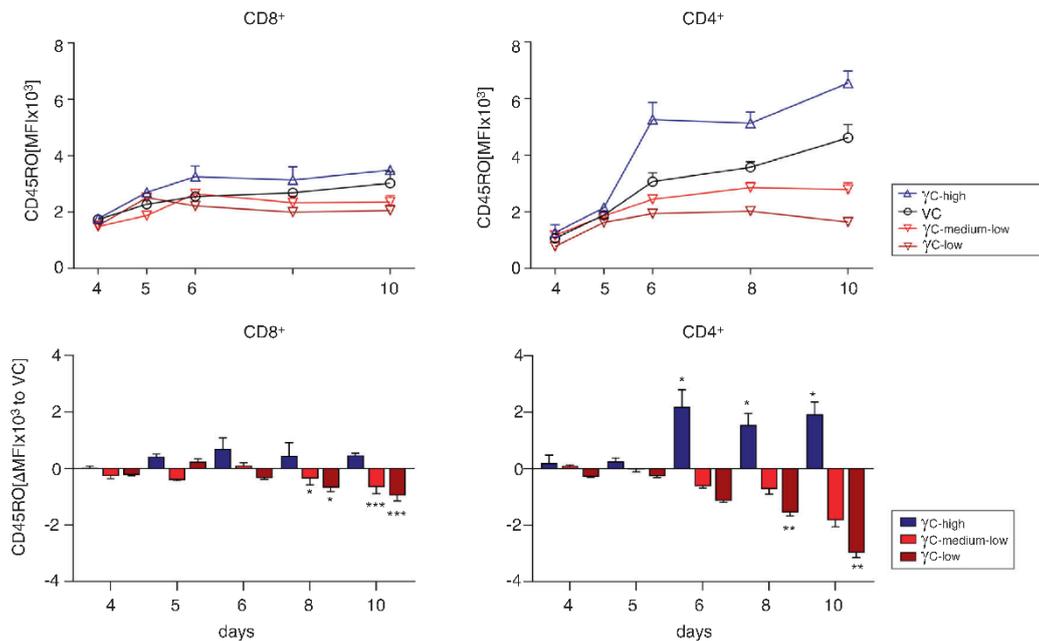


FIGURE 5 CD45 isoform transition of γ_c -high, γ_c -medium-low, γ_c -low activated naive T cells. Time course changes in expression of the CD45RO isoform were measured in γ_c -high, γ_c -medium-low, γ_c -low, and VC transduced CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Only vector marker (i.e., GFP, BFP) positive T cells were analysed. Results from representative experiments are shown. Symbols and error bars indicate mean values of duplicates and standard deviations, respectively. Bar charts show subtracted values of T cells with modulated γ_c expression from the internal VC for each time point. Analyses were done on d4, d5, d6, d8, and d10. Differences from independent experiments ($n = 5$) were compared using the Wilcoxon Signed-rank test and p -values below 0.05 were considered significant. Significant differences are indicated by asterisks: * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$.

cytokines. Next, we analysed the cytokines in the supernatant of transduced T cells at different time points (i.e., d4, d5, d6, d8, and d10). Altogether 11 cytokines were measured and five cytokines showed differences in γ_c modulated T cells as compared to VC transduced T cells (Figure 4a). Notably, γ_c -high T cells had significantly higher concentrations of IFN- γ in the supernatant at all time points as compared to VC and γ_c -low T cells (Figure 4a). IL-6 showed a similar pattern as IFN- γ being significantly higher at all time points and most marked at early time points (Figure 4a). IL-5 was also higher in γ_c -high T-cell supernatants throughout the time course. Two cytokines (i.e., IL-2, IL-13) showed differences for γ_c -low T cells. IL-2 was lower at four-time points (i.e., d4, 5, 8, 10) and IL-13 at all time points in supernatants of γ_c -low T cells (Figure 4a).

Since changes in the cytokines produced by γ_c -high T cells may autologously affect cytokine receptor signalling, we next measured phosphorylation of the Signal Transducer and Activators of Transcription (STAT) family members (i.e., STAT1, STAT3, STAT5) at three-time points (i.e., d6, d8, and d10). γ_c -medium-low T cells showed no changes in STAT phosphorylation and for γ_c -low T

cells decreased pSTAT3 levels were only detected on d6 (Figure 4b). In contrast, γ_c -high T cells had increased pSTAT3 levels at all time points and STAT5 phosphorylation was higher at d6 and decreased thereafter (Figure 4b). STAT1 phosphorylation increased between d6 and d8 showing significantly higher levels in γ_c -high T cells as compared to the VC (Figure 4b). These results suggested that changes in the cytokine milieu as a consequence of high γ_c expression affected cytokine receptor signalling pathways with potential effects on the differentiation of naive T cells.

High γ_c levels promote transition to CD45RO expression in naive CD4⁺ T cells

To determine the effect of differential γ_c expression on naive T-cell differentiation, we monitored transition of CD45 isoforms. Naive T cells are characterized by high expression of the CD45RA isoform and absence of the CD45RO isoform before activation. After activation of naive T cells, changes in alternative splicing cause transition towards CD45RO. CD8⁺ T cells showed moderately

increased CD45RO expression during the time course and $\gamma_{c\text{-medium-low}}$ as well as $\gamma_{c\text{-low}}$ cells had lower CD45RO levels (as compared to VC) on d8 and d10 (Figure 5). Only moderately higher CD45RO expression was seen for $\gamma_{c\text{-high}}$ CD8⁺ T cells at all time points (Figure 5). In contrast, $\gamma_{c\text{-high}}$ CD4⁺ T cells had significantly higher CD45RO expression on d6, d8, and d10 as compared to the VC (Figure 5). Similar to CD8⁺ T cells, $\gamma_{c\text{-low}}$ CD4⁺ T cells showed inhibitory effects on CD45 transition, with significantly reduced levels on d8 and d10 as compared to VC T cells (Figure 5). We concluded that differentiation towards an effector/memory phenotype was significantly accelerated in activated naïve CD4⁺ T cells with high γ_c expression.

DISCUSSION

Modulation of γ_c expression had marked effects on the phenotype of naïve T cells. $\gamma_{c\text{-high}}$ T cells showed enhanced expression of IL-2R α and re-expression of IL-7R α at later stages whereas $\gamma_{c\text{-low}}$ T cells were lower for both, IL-2R α and IL-7R α . Direct γ_c mediated effects as well as indirect effects, may account for differential IL-2R α /IL-7R α expression. Indirect effects, for example, caused by differences in the response to γ_c family cytokines, are likely and these may cause functional differences seen in $\gamma_{c\text{-high}}$ and $\gamma_{c\text{-low}}$ T cells. Changes in IL-2R α /IL-7R α expression, however, may also result from differences in the direct interaction between γ_c and IL-2R α /IL-7R α . This assumption is strengthened by the fact that both, IL-2R α and IL-7R α , show increased (or decreased) expression levels at individual time points but no changes in the time course expression profile. Indirect effects on IL-2R α /IL-7R α expression would potentially lead to delayed effects but this was not detected in our assay. Moreover, γ_c effects were seemingly dependent on endogenous IL-2R α /IL-7R α expression and only moderate differences were detected in the absence of these receptors. Direct interaction of γ_c and its family cytokine receptors (i.e., dimerization with IL-7R α , trimerization with IL-2R α together with the IL-2R β) have long been assumed to depend on prior cytokine binding. However, there is increasing evidence that γ_c heteromers are pre-formed in the absence of cytokines [13–15]. The influence of the extracellular domains on IL-7R α / γ_c receptor dimerization was shown [15], and recently, Cai et al., identified binding sites in the transmembrane domain of γ_c and several γ_c family receptors that are crucial for dimerization [16]. In the absence of the respective cytokine, dimers did not trigger signal transduction, as they were inhibited by the extracellular domain in a conformation-dependent manner [16]. The results of the

present study suggested that differential expression of γ_c may affect simultaneous IL-2R α and IL-7R α expression. One possible explanation for this would be increased stability of IL-2R α /IL-7R α expression as part of heteromers formed with γ_c (e.g., dimerization with γ_c may counteract internalization/recycling as described for the IL-7R α) [17]. In this context, it is important to realize that the affinity to γ_c differs between family receptors [2, 13, 14]. Two studies showed that the IL-7R α has a high affinity to γ_c and thus limits the binding of other family cytokines to the γ_c chain [13, 14]. It can therefore be assumed that different γ_c cytokine receptors are not equally affected by the availability of γ_c . The relevance of γ_c availability for the IL-7 signalling has been shown by Monti et al., who treated T cells with antibodies against IL-2R α and showed increased γ_c /IL-7R α binding and IL-7 signalling as the consequence [9]. In addition, the effect of γ_c expression on the IL-2R trimerization has been predicted in a mathematical model [18].

γ_c expression effects are of great interest since immunopathology as well as immunodeficiency are seen in the context of aberrant γ_c expression. γ_c caused X-linked immunodeficiency can be effectively treated by gene therapy to regain γ_c functions [19]. Orr et al. showed that the expression level of γ_c is central for successful reconstitution and that requirements differ between cellular subsets [19].

Functional changes in the T-cell response were associated with differential γ_c expression in the present study. We provided evidence that $\gamma_{c\text{-low}}$ and $\gamma_{c\text{-medium-low}}$ T cells showed impaired survival/growth in vitro whereas $\gamma_{c\text{-high}}$ T cells showed only moderate differences in cell growth. In contrast, we detected marked changes in cytokine milieu and T-cell cytokine signalling in $\gamma_{c\text{-high}}$ T cells. STAT5 phosphorylation was higher in $\gamma_{c\text{-high}}$ T cells only at the earliest time point (d3). We demonstrated before that T1D patients with high γ_c expression on T cells had increased proportions of IL-2 sensitive pSTAT5⁻ effector T-cells [8]. However, other cytokines (e.g., IL-15) may be responsible for these differences as STAT5 is commonly used by cytokines from the γ_c family [20]. Both, STAT1 and STAT3 phosphorylation levels were higher in $\gamma_{c\text{-high}}$ T cells and this suggested changes in the cytokine milieu as a consequence of γ_c modulation. In accordance, we detected higher effector T-cell cytokine concentrations (i.e., IFN- γ , IL-6) in the supernatant of $\gamma_{c\text{-high}}$ T cells. In addition, IL-5 was higher in the supernatant of $\gamma_{c\text{-high}}$ T cells and this also rendered T-cell polarization effects possible. Notably, γ_c effects on effector cytokines were only seen in $\gamma_{c\text{-high}}$ T cells and this suggested the relevance of aberrant high γ_c for T-cell functions in patients with autoimmune diseases. Of note, increased IFN- γ and IL-6 in the supernatants of

γ_c -high T cells is in accordance with previous findings that antibody-mediated inhibition of γ_c inhibits the expression of IFN- γ and IL-6 [21]. The functional relevance of differential γ_c expression for T cells was strengthened by the fact that CD4⁺ naïve γ_c -high T cells showed accelerated transition towards the CD45RO variant. This suggested that high γ_c expression promoted the differentiation of naïve T cells towards effector and memory T cells. Future studies will have to investigate the underlying mechanisms and the exact role of γ_c expression levels for the differentiation of naïve T cells.

The role of γ_c cytokines in T-cell function and in immunopathology of autoimmune diseases has been studied in detail. Dysregulation of IL-2R/IL-7R α signaling was found for autoimmune diseases and this can affect the interplay between effector and regulatory T cells, which requires fine-balanced regulation of sensitivity to IL-2 and IL-7 [6]. Immunogenetic and functional immunological studies demonstrated that dysregulation of the IL-2/IL-2R axis may impair protective regulatory T cells and contribute to the development of autoimmune diseases [6, 22]. In contrast, IL-7 has been described to promote effector T cells and especially those with low-affinity for self-antigens depend on IL-7 [7]. A role of γ_c expression in these processes was suggested by previous studies showing increased expression of γ_c in autoimmune and inflammatory diseases [8, 23, 24]. A previous study of our own found higher expression of γ_c and IL-7R α in T cells from children with T1D [8]. This study also indicated that not only expression of individual γ_c receptors was affected, but that the relative expression level of γ_c and IL-2R α may be important. While T cells from healthy individuals had a positive correlation between the expression of γ_c and IL-2R α , this correlation was not detected in children with T1D. This finding suggested that changes of γ_c /IL-2R α ratios in T cells from T1D patients are likely due to γ_c dysregulation [8]. The present study strengthened the notion that γ_c regulation can affect IL-2R α expression and can be causative for aberrant γ_c /IL-2R α ratios in T cells from T1D patients. However, further studies are needed to characterize the effects of higher γ_c levels on regulatory T cells, which strongly depend on IL-2 signaling and play a decisive role in immunopathology of T1D.

The mechanisms underlying differential γ_c expression in T cells cannot be deduced from the investigations presented here. Especially, the factors controlling γ_c regulation after T-cell activation need to be elucidated. Since the lentiviral modulation performed in the present study requires initial T cell activation, alternative approaches are needed to address this important question in future studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the German Research Foundation (DFG, JA 1479/9-1). We thank all participants who donated blood for this study. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no conflict of interests to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Marc Jacobsen  <https://orcid.org/0000-0002-4703-5652>

REFERENCES

1. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(7):480–90.
2. Waickman AT, Park JY, Park JH. The common gamma-chain cytokine receptor: tricks-and-treats for T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(2):253–69.
3. Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(2):144–54.
4. Hong C, Luckey MA, Ligons DL, Waickman AT, Park JY, Kim GY, et al. Activated T cells secrete an alternatively spliced form of common gamma-chain that inhibits cytokine signaling and exacerbates inflammation. *Immunity.* 2014;40(6):910–23.
5. Dooms H. Interleukin-7: fuel for the autoimmune attack. *J Autoimmun.* 2013;45:40–8.
6. Gupta S, Cerosaletti K, Long SA. Renegade homeostatic cytokine responses in T1D: drivers of regulatory/effector T cell imbalance. *Clin Immunol.* 2014;151(2):146–54.
7. Deshpande P, Cavanagh MM, Le Saux S, Singh K, Weyand CM, Goronzy JJ. IL-7- and IL-15-mediated TCR sensitization enables T cell responses to self-antigens. *J Immunol.* 2013;190(4):1416–23.
8. Seyfarth J, Mutze N, Antony Cruz J, Kummer S, Reinauer C, Mayatepek E, et al. CD4(+) T-cells with high common gamma chain expression and disturbed cytokine production are enriched in children with Type-1 diabetes. *Front Immunol.* 2019;10:820.
9. Monti P, Brigatti C, Heninger AK, Scirpoli M, Bonifacio E. Disengaging the IL-2 receptor with daclizumab enhances IL-7-mediated proliferation of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Am J Transplant.* 2009;9(12):2727–35.
10. Guler A, Lopez Venegas M, Adankwah E, Mayatepek E, Nausch N, Jacobsen M. Suppressor of cytokine signalling 3 is crucial for interleukin-7 receptor re-expression after T-cell activation and interleukin-7 dependent proliferation. *Eur J Immunol.* 2019;50:234–44.
11. Guler A, Lopez Venegas M, Adankwah E, Mayatepek E, Nausch N, Jacobsen M. Suppressor of cytokine signalling 3 is crucial for interleukin-7 receptor re-expression after T-cell

- activation and interleukin-7 dependent proliferation. *Eur J Immunol.* 2020;50(2):234–44.
12. Kleinsteinuber K, Heesch K, Schattling S, Sander-Juelch C, Mock U, Riecken K, et al. SOCS3 promotes interleukin-17 expression of human T cells. *Blood.* 2012;120(22):4374–82.
 13. Gonnord P, Angermann BR, Sadtler K, Gombos E, Chappert P, Meier-Schellersheim M, et al. A hierarchy of affinities between cytokine receptors and the common gamma chain leads to pathway cross-talk. *Sci Signal.* 2018;11(524).
 14. Waickman AT, Keller HR, Kim TH, Luckey MA, Tai X, Hong C, et al. The cytokine receptor IL-7Ralpha impairs IL-2 receptor signaling and constrains the in vitro differentiation of Foxp3(+). *Treg Cells iScience.* 2020;23(8):101421.
 15. McElroy CA, Holland PJ, Zhao P, Lim JM, Wells L, Eisenstein E, et al. Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(7):2503–8.
 16. Cai T, Lenoir Capello R, Pi X, Wu H, Chou JJ. Structural basis of gamma chain family receptor sharing at the membrane level. *Science.* 2023;381(6657):569–76.
 17. Henriques CM, Rino J, Nibbs RJ, Graham GJ, Barata JT. IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7Ralpha in T cells. *Blood.* 2010;115(16):3269–77.
 18. Ponce LF, Garcia-Martinez K, Leon K. Quantitative contribution of IL2Rgamma to the dynamic formation of IL2-IL2R complexes. *PLoS One.* 2016;11(5):e0155684.
 19. Orr SJ, Roessler S, Quigley L, Chan T, Ford JW, O'Connor GM, et al. Implications for gene therapy-limiting expression of IL-2R gamma c delineate differences in signaling thresholds required for lymphocyte development and maintenance. *J Immunol.* 2010;185(3):1393–403.
 20. Smyth CM, Ginn SL, Deakin CT, Logan GJ, Alexander IE. Limiting gammac expression differentially affects signaling via the interleukin (IL)-7 and IL-15 receptors. *Blood.* 2007;110(1):91–8.
 21. Hechinger AK, Smith BA, Flynn R, Hanke K, McDonald-Hyman C, Taylor PA, et al. Therapeutic activity of multiple common gamma-chain cytokine inhibition in acute and chronic GVHD. *Blood.* 2015;125(3):570–80.
 22. Maier LM, Lowe CE, Cooper J, Downes K, Anderson DE, Severson C, et al. IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. *PLoS Genet.* 2009;5(1):e1000322.
 23. Nishio J, Kohsaka H, Shimamura T, Hamuro J, Miyasaka N. Abundant expression of common cytokine receptor gamma chain (CD132) in rheumatoid joints. *J Rheumatol.* 2001;28(2):240–4.
 24. Smith MD. Abundant expression of common cytokine receptor chain (CD132) in rheumatoid joints. *J Rheumatol.* 2001;28(11):2561–3.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Kim J-Y, Mayatepek E, Seyfarth J, Jacobsen M. High common- γ cytokine receptor levels promote expression of Interleukin-2/Interleukin-7 receptor α -chains with implications on T-cell differentiation and function. *Immunology.* 2024. <https://doi.org/10.1111/imm.13800>

4. Diskussion

Die Studie untersucht die Rolle der γ c-Expression während der Aktivierung von primären menschlichen T-Zellen. Dabei wurde mittels cDNA-Überexpression eine erhöhte γ c-Expression in aktivierten T-Zellen (*γ c-high*) erreicht, was zu einer phänotypischen Veränderung führte, die durch eine erhöhte Expression von IL-2R α und IL-7R α gekennzeichnet war.

Die Unterdrückung der γ c-Expression wurde mittels *Small-Hairpin-RNA* (shRNA) gegen γ c erreicht. Dabei wurden shRNA mit unterschiedlichen Effizienzstufen verwendet. Es zeigte sich, dass die stark inhibierte γ c-Expression (*γ c-low*) zu einer verminderten Expression von IL-7R α und IL-2R α in T-Zellen führte.

Für die Studie wurde die Methode der Genmodulation durch lentivirale Transduktion verwendet. Diese Methode eignete sich besonders, da sie eine vorherige Aktivierung der T-Zellen erfordert und unsere modulierenden Zielgene effektiv in primären T-Zellen einbringen konnte.

Auch funktionelle Effekte konnten nachgewiesen werden. Eine erhöhte γ c-Expression scheint die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen zu fördern. Die Studie zeigt, dass T-Zellen mit hoher γ c-Expression bessere Überlebens- und Wachstumseigenschaften aufweisen als solche mit niedriger γ c-Expression. Zudem wurde in diesen Zellen eine verstärkte Signalisierung der Proteine STAT5, STAT1 und STAT3 festgestellt, was auf eine erhöhte Aktivierung und Proliferation hinweist.

Es ist jedoch wichtig, einige Einschränkungen dieser Studie zu berücksichtigen. Zunächst wurden die Experimente hauptsächlich *in vitro* durchgeführt, was möglicherweise nicht alle Aspekte der komplexen *In-vivo*-Immunantwort widerspiegelt. Darüber hinaus konzentrierte sich unsere Studie auf einen spezifischen Aspekt der γ c-Expression und ihrer Auswirkungen auf IL-2R α und IL-7R α . Andere potenzielle Wechselwirkungen und Effekte könnten ebenfalls eine Rolle spielen und sollten in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Insgesamt liefert die Studie wichtige Einblicke in die Bedeutung der γc -Expression für die Funktion von T-Zellen.

4.1 Veränderter phänotyp in aktivierten T-Zellen nach modulation der γc Expression

4.1.1 γc -Expression in T-Zellen

Bislang haben sich nur wenige Studien mit der γc -Expression von T-Zellen befasst. Dies könnte auf die vorherrschende Annahme zurückzuführen sein, dass die γc -Expression konstitutiv ist und nicht durch Transkription reguliert wird (32). Mehrere Studien berichten jedoch von einer Hochregulierung der γc -Expression nach der Aktivierung durch Zytokine und T-Zell-Rezeptoren oder während Infektionen (58). Es wurde gezeigt, dass γc intrazellulär gespeichert wird und nach der T-Zell-Aktivierung zur Plasmamembran transloziert wird.

Es kann zudem angenommen werden, dass die γc -Expression einen erheblichen Einfluss auf die Empfindlichkeit der T-Zellen gegenüber den Zytokinen IL-2 und IL-7 hat. Dies liegt daran, dass die Signalweiterleitung dieser Zytokine von der Expression der IL-2R α - und IL-7R α -Rezeptoren abhängt. Eine erhöhte γc -Expression könnte somit die Bindungsaffinität und Signalstärke dieser Rezeptoren verstärken, was zu einer gesteigerten zellulären Antwort führt (86). Darüber hinaus weisen erste Studien auf eine bedeutende Rolle des gemeinsamen γc -Rezeptors und seiner löslichen Varianten in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen hin. Diese Varianten könnten durch ihre Interaktion mit zirkulierenden Zytokinen und Rezeptoren die Immunantwort modulieren und möglicherweise zur Entstehung und Aufrechterhaltung autoimmuner Prozesse beitragen (87, 88, 57).

4.1.2 Einfluss der γc -Expression auf den Phänotyp und die Rezeptor-Expression von naiven T-Zellen: Direkte und indirekte Mechanismen der Regulation

Die Modulation der γc -Expression hatte ausgeprägte Auswirkungen auf den Phänotyp von naiven T-Zellen. Eine γc -Überexpression in T-Zellen führte zu einer verstärkten Expression von IL-2R α während der Aktivierungsphase und zu einer verstärkten Reexpression von IL-7R α in späteren Stadien (17, 70). Eine Inhibition hingegen zeigte

den gegenteiligen Effekt, während γc -low T-Zellen niedrigere Werte für IL-2R α als auch für IL-7R α aufwiesen, zeigte die schwächere shRNA γc -medium low nur eine moderat niedrigere Expression. Diese Ergebnisse zeigten eindeutige Effekte der γc -Modulation auf den Phänotyp von T-Zellen, als auch den Einfluss von verschiedenen starken Modulationseffekten (60).

Die beobachteten phänotypischen Veränderungen könnten sowohl auf direkte als auch indirekte γc -vermittelte Effekte zurückzuführen sein, die die unterschiedliche Expression von IL-2R α und IL-7R α beeinflussen (70, 89). Indirekte Effekte, die möglicherweise durch Unterschiede in der Reaktion auf γc -Familien-Zytokine verursacht werden, sind möglich, wurden aber in unserem Assay nicht festgestellt (16, 17, 90). Indirekte Mechanismen könnten beispielsweise veränderte Zytokin-induzierte Signale, Transkriptionelle Regulation oder Epigenetische Modifikationen sein. Diese indirekten Mechanismen könnten die funktionellen Unterschiede zwischen γc -high und γc -low T-Zellen erklären, da variierende Reaktionsmuster auf γc -vermittelte Signale zu differenzierten zellulären Antworten führen können. Beispielsweise könnten γc -high T-Zellen durch eine verstärkte Signaltransduktion eine erhöhte Proliferations- und Überlebensfähigkeit aufweisen, während γc -low T-Zellen eine abgeschwächte Reaktion auf dieselben Zytokine zeigen und somit weniger robust in ihrer Funktion sind. Diese Unterschiede in der zytokinvermittelten Signalübertragung könnten somit maßgeblich zu den beobachteten Phänotypvariationen beitragen.

Indirekte Effekte, die potenziell zu verzögerten Veränderungen in der Expression von IL-2R α und IL-7R α führen könnten, wurden in unserem Assay nicht festgestellt. Solche indirekten Effekte hätten sich durch eine zeitlich verzögerte Änderung der Expressionsniveaus gezeigt, was jedoch nicht beobachtet wurde. Im Gegenteil es wurde in dieser Studie beobachtet, dass sowohl IL-2R α als auch IL-7R α zu bestimmten Zeitpunkten ein verändertes absolutes Expressionsniveaus aufweisen, jedoch keine signifikanten Veränderungen im zeitlichen Verlauf des Expressionsprofils zeigen (siehe Figure 1) (92). Diese konstante zeitliche Expression deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen γc und den Rezeptoren einen unmittelbaren Einfluss auf deren Expressionsniveau hat, unabhängig von langfristigen Modulationen. Diese Beobachtung verstärkt die Annahme, dass die direkte Interaktion zwischen γc und den

Rezeptoren die primäre Rolle in der Regulation ihrer Expression spielt, schließt jedoch einen langfristigen indirekten Effekt nicht aus (91).

Darüber hinaus scheinen die γ_c -vermittelten Effekte stark von der endogenen Expression von IL-2R α und IL-7R α abhängig zu sein. In unseren Experimenten wurden nur moderate Unterschiede in den durch γ_c ausgelösten Wirkungen beobachtet, wenn IL-2R α oder IL-7R α herunterreguliert waren. Dies legt nahe, dass die Anwesenheit von IL-2R α und IL-7R α notwendig ist, um die volle Bandbreite der γ_c -vermittelten Effekte zu entfalten. Ohne diese Rezeptoren sind die Modulationseffekte von γ_c deutlich abgeschwächt, was die zentrale Bedeutung der direkten Interaktion zwischen γ_c und IL-2R α beziehungsweise IL-7R α weiter hervorhebt.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Regulation der IL-2R α - und IL-7R α -Expression durch γ_c sowohl auf direkten molekularen Interaktionen als auch auf der endogenen Präsenz dieser Rezeptoren beruht. Weitere Studien sind erforderlich, um die genauen Mechanismen dieser Interaktionen vollständig zu verstehen und die Bedeutung dieser Befunde in einem physiologischen und pathophysiologischen Kontext zu klären.

4.1.3 Die Bedeutung der γ_c -Expression und ihrer Interaktion mit Zytokinrezeptoren für die T-Zell-Funktion und Immunregulation

Die direkte Interaktion von γ_c und seinen Familienzytokinrezeptoren, wie der Dimerisierung mit IL-7R α und der Trimerisierung mit IL-2R α zusammen mit IL-2R β , wurde lange Zeit als abhängig von der vorherigen Zytokinbindung angesehen. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass γ_c -Heteromere bereits in Abwesenheit von Zytokinen vorgeformt sind (93, 94). So wurde beispielsweise gezeigt, dass die extrazellulären Domänen einen entscheidenden Einfluss auf die Dimerisierung von IL-7R α und γ_c haben (31). Zudem identifizierten Cai et al. kürzlich Bindungsstellen in der Transmembrandomäne von γ_c und mehreren γ_c -Familienrezeptoren, die für die Dimerisierung entscheidend sind (42). In Abwesenheit des jeweiligen Zytokins lösten diese vorgeformten Dimere keine Signaltransduktion aus, da sie durch die extrazelluläre Domäne in einer konformationsabhängigen Weise gehemmt wurden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen nahe, dass eine unterschiedliche γ c-Expression die gleichzeitige Expression von IL-2R α und IL-7R α beeinflussen kann. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine erhöhte Stabilität der IL-2R α /IL-7R α -Expression als Teil von Heteromeren sein, die mit γ c gebildet werden (95). Beispielsweise könnte die Dimerisierung mit γ c die Internalisierung und das Recycling von IL-7R α entgegenwirken, wie es in früheren Studien beschrieben wurde. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erkennen, dass die Affinität zu γ c zwischen den verschiedenen Familienrezeptoren variiert (32). Zwei Studien zeigten, dass IL-7R α eine hohe Affinität zu γ c hat und dadurch die Bindung anderer Familienzytokine an die γ c-Kette begrenzt. Es kann daher angenommen werden, dass verschiedene γ c-Zytokinrezeptoren nicht gleichermaßen von der Verfügbarkeit von γ c betroffen sind.

Die Relevanz der γ c-Verfügbarkeit für die IL-7-Signalübertragung wurde von Monti et al. demonstriert (84). In ihrer Studie behandelten sie T-Zellen mit Antikörpern gegen IL-2R α , was zu einer erhöhten γ c/IL-7R α -Bindung und einer verstärkten IL-7-Signalübertragung führte. Darüber hinaus wurde der Einfluss der γ c-Expression auf die IL-2R-Trimerisierung in einem mathematischen Modell vorhergesagt (96). Diese Modelle legen nahe, dass die Verfügbarkeit von γ c eine entscheidende Rolle bei der effizienten Trimerisierung von IL-2R spielt und somit die Signalübertragung moduliert.

Die Auswirkungen der γ c-Expression sind von großem wissenschaftlichem Interesse, da sowohl Immunopathologien als auch Immundefizienzen im Zusammenhang mit abweichender γ c-Expression beobachtet werden. Eine durch γ c-vermittelte X-chromosomale Immundefizienz kann effektiv durch Gentherapie behandelt werden, um die γ c-Funktion wiederherzustellen. Orr et al. zeigten in ihren Studien, dass das Expressionsniveau von γ c entscheidend für eine erfolgreiche Rekonstitution ist und dass die Anforderungen hierfür zwischen den verschiedenen Zellsubtypen variieren (97). Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung der präzisen Regulation der γ c-Expression für die Aufrechterhaltung einer funktionierenden Immunantwort und bieten gleichzeitig potenzielle therapeutische Ansätze zur Behandlung von Immundefizienzen und Immunopathologien.

4.2 Die zentrale Rolle der γ c-Expression in der Regulation von T-Zellantworten und der Immunhomöostase

Die von IL-2R α und IL-7R α vermittelten T-Zellfunktionen sind stark von der Verfügbarkeit der common gamma chain (γ c) abhängig. Eine Dysregulation dieser Signalwege wird mit einem erhöhten Risiko für Immunpathologien in Verbindung gebracht. Insbesondere das Zusammenspiel zwischen Effektor- und regulatorischen T-Zellantworten erfordert eine fein abgestimmte Regulierung der Empfindlichkeit gegenüber den Zytokinen IL-2 und IL-7 (80). Studien haben gezeigt, dass eine Dysregulation der IL-2/IL-2R-Achse die schützenden Funktionen der regulatorischen T-Zellen beeinträchtigen kann, was zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beitragen kann (80, 98, 99).

Darüber hinaus spielt IL-7 eine entscheidende Rolle bei der Förderung von Effektor-T-Zellen, insbesondere solchen mit geringer Affinität für Selbstantigene, die stark auf IL-7 angewiesen sind (81, 100). Die Rolle der γ c-Expression in diesen Prozessen wird durch Studien unterstützt, die eine erhöhte Expression von γ c bei Autoimmun- und entzündlichen Erkrankungen zeigten (1, 101, 17). Unsere eigenen früheren Untersuchungen ergaben, dass T-Zellen von Kindern mit Typ-1-Diabetes eine höhere Expression von γ c und IL-7R α aufwiesen (1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl das individuelle Expressionsniveau der γ c-Rezeptoren als auch das Verhältnis zwischen γ c und IL-2R α von Bedeutung sind. Bei gesunden Personen besteht eine positive Korrelation zwischen der Expression von γ c und IL-2R α , die jedoch bei Kindern mit Typ-1-Diabetes nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtungen weisen auf eine Dysregulation der γ c-/IL-2R α -Verhältnisse als Bestandteil der Immunpathologie bei Typ-1-Diabetes hin.

Die komplexe Rolle von γ c in der Regulation der T-Zellantworten und der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts ist von zentraler Bedeutung. Eine gestörte γ c-Expression kann die Funktion der IL-2R α - und IL-7R α -Signalwege direkt beeinflussen und zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen beitragen, indem das empfindliche Gleichgewicht zwischen Effektor- und regulatorischen T-Zellpopulationen gestört wird. Angesichts dieser Befunde ist es entscheidend, die Mechanismen der γ c-Expression und -Regulation

weiter zu untersuchen, um potenzielle therapeutische Ansätze zur Korrektur von Dysregulationen im Zytokinrezeptorsystem zu entwickeln (17).

Darüber hinaus ist es wichtig, die molekularen und zellulären Prozesse zu verstehen, die die Expression und Funktion der γ_c regulieren. Die Identifikation von Faktoren, die diese Prozesse beeinflussen, könnte neue Zielstrukturen für therapeutische Interventionen liefern. Zukünftige Forschung sollte sich auf die Interaktionen zwischen γ_c und anderen Komponenten des Immunsystems konzentrieren, um ein umfassenderes Bild der immunologischen Regulation zu erhalten (100).

Die Rolle von γ_c ist nicht auf die T-Zellantworten beschränkt, sondern erstreckt sich auf andere Bereiche des Immunsystems, einschließlich der B-Zell-Funktion und der Entwicklung von NK-Zellen (17). Eine umfassende Untersuchung dieser Aspekte könnte zusätzliche Einblicke in die weitreichenden Auswirkungen der γ_c -Dysregulation bieten. Die Entwicklung von Modellsystemen, die die γ_c -Expression in verschiedenen Immunzelltypen untersuchen, könnte dazu beitragen, die spezifischen Auswirkungen der γ_c -Dysregulation in verschiedenen Kontexten besser zu verstehen.

Therapeutisch gesehen, könnte die gezielte Modulation der γ_c -Expression und -Funktion einen vielversprechenden Ansatz darstellen. Beispielsweise könnten Strategien zur Verstärkung der γ_c -Expression in bestimmten Zelltypen dazu beitragen, die Immunantwort zu stärken, während eine Reduktion der γ_c -Expression in anderen Kontexten nützlich sein könnte, um überschießende Immunreaktionen zu dämpfen. Dies erfordert jedoch eine präzise Kontrolle und ein tiefes Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Erforschung der γ_c -Expression und -Regulation ein vielversprechendes Feld ist, das das Potenzial hat, neue therapeutische Ansätze für eine Vielzahl von Immunerkrankungen zu eröffnen. Die zentrale Rolle von γ_c in der T-Zellregulation und der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts macht sie zu einem zu einem bedeutenden Fokus für kommende Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten. Durch die Vertiefung unseres Verständnisses der γ_c -abhängigen Signalwege können wir möglicherweise innovative

Behandlungen entwickeln, die das Immunsystem gezielt modulieren und so zur Behandlung und Prävention von Autoimmunerkrankungen beitragen.

4.3 Die Rolle der γ c-Expression in der Regulation der T-Zell-Funktion und Immunantwort: Funktionelle und Signaltransduktions-Aspekte

In der vorliegenden Studie wurden funktionelle Veränderungen der T-Zellantwort in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Expression des γ c umfassend untersucht. Unsere detaillierten Untersuchungen haben eindeutig gezeigt, dass T-Zellen mit niedriger (*γ c-low*) und moderat niedriger (*γ c-medium-low*) Expression des γ c eine signifikant beeinträchtigte Überlebens- und Wachstumsfähigkeit *in vitro* aufwiesen. Dies deutet stark darauf hin, dass eine reduzierte Expression von γ c die Vitalität und Proliferation dieser Zellen erheblich beeinträchtigt. Diese Beeinträchtigung könnte auf eine verminderte Signaltransduktion und eine gestörte Aktivierung von Überlebenswegen zurückzuführen sein, die normalerweise durch die γ c-Kette vermittelt werden (17, 102). Eine genauere Analyse der Signalwege zeigte, dass wichtige Überlebenssignale, wie jene, die durch die IL-2-Rezeptor-Signalgebung vermittelt werden, bei reduzierter γ c-Expression deutlich abgeschwächt sind.

Im Gegensatz dazu zeigten T-Zellen mit hoher γ c-Expression (*γ c-high*) nur moderate Unterschiede im Zellwachstum, was darauf hindeutet, dass eine hohe Expression von γ c das Wachstum nicht wesentlich beeinflusst. Es ist daher anzunehmen, dass vor allem das Fehlen von γ c einen starken Einfluss auf das Zellwachstum hat, während eine Überexpression über den Zeitraum unserer Untersuchung keinen kurzfristigen Effekt zeigt. Diese Unterschiede in der Zellproliferation und im Überleben unterstreichen die zentrale Rolle der γ c-Expression in der Regulation der T-Zell-Physiologie und betonen die kritische Bedeutung der γ c-Kette für die Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase (69).

Zusätzlich zu diesen Beobachtungen konnten signifikante Veränderungen im Zytokinmilieu und in der T-Zell-Zytokin-Signalgebung bei *γ c-high* T-Zellen festgestellt werden. Ein bemerkenswerter Befund war die erhöhte Phosphorylierung von STAT5

in γ c-high T-Zellen, die jedoch nur zum frühesten Zeitpunkt (Tag 3) beobachtet wurde. Frühere Studien haben gezeigt, dass T1D-Patienten (Typ-1-Diabetes) mit hoher γ c-Expression in T-Zellen einen erhöhten Anteil an IL-2-sensitiven pSTAT5+-Effektor-T-Zellen aufwiesen (1). Dies legt nahe, dass die verstärkte Signaltransduktion über den STAT5-Weg zumindest teilweise durch die erhöhte γ c-Expression vermittelt wird. Es ist jedoch auch möglich, dass andere Zytokine, wie IL-15, für diese Unterschiede verantwortlich sind, da STAT5 ein gemeinsamer Signalweg für mehrere Zytokine der γ c-Familie ist (17, 103). Die Erhöhung der STAT5-Phosphorylierung könnte daher auf eine allgemein erhöhte Sensitivität der γ c-high T-Zellen gegenüber mehreren γ c-Familienzytokinen und weiteren Signalen hinweisen (102).

Darüber hinaus wurden sowohl die Phosphorylierungsniveaus von STAT1 als auch von STAT3 in γ c-high T-Zellen erhöht beobachtet. Diese erhöhte Aktivierung von STAT1 und STAT3 deutet auf Veränderungen im Zytokinmilieu als direkte Folge der γ c-Modulation hin. Die verstärkte Aktivierung dieser Signalwege könnte auf eine erhöhte Sensitivität oder Konzentration von Zytokinen wie IFN- γ und IL-6 hinweisen, die für die Aktivierung von STAT1 und STAT3 bekannt sind. Entsprechend diesen Beobachtungen wurden im Überstand von γ c-high T-Zellen höhere Konzentrationen von Effektor-T-Zell-Zytokinen wie IFN- γ und IL-6 nachgewiesen. Interessanterweise wurde auch eine erhöhte Konzentration von IL-5 im Überstand von γ c-high T-Zellen festgestellt, was auf einen möglichen Einfluss der gesteigerten γ c-Expression auf die Polarisierung der T-Zellen hinweist. Diese Veränderungen im Zytokinprofil sind von großer Bedeutung, da sie auf eine veränderte Immunantwort hinweisen, die durch die modifizierte γ c-Expression beeinflusst wird.

Die funktionelle Relevanz der unterschiedlichen γ c-Expression bei T-Zellen wurde durch die Beobachtung verstärkt, dass CD4+ naive γ c-high T-Zellen einen beschleunigten Übergang zur CD45RO-Variante zeigten. Dies deutet darauf hin, dass eine hohe γ c-Expression die Differenzierung naiver T-Zellen zu Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen fördert. Zukünftige Studien müssen die zugrunde liegenden Mechanismen und die genaue Rolle der γ c-Expressionsniveaus bei der Differenzierung naiver T-Zellen weiter untersuchen.

Die erhöhte Produktion von Effektorzytokinen könnte zur Förderung einer pro-inflammatorischen Umgebung beitragen, die die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen begünstigt. Dies könnte besonders relevant sein in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, wo eine verstärkte inflammatorische Reaktion oft eine zentrale Rolle spielt. Besonders bemerkenswert ist, dass γ c-Effekte auf Effektorzytokine ausschließlich bei γ c-high T-Zellen beobachtet wurden. Diese Befunde unterstreichen die Relevanz einer aberrant hohen γ c-Expression für die T-Zellfunktionen, insbesondere bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen. Eine erhöhte IFN- γ - und IL-6-Expression in den Überständen von γ c-high T-Zellen steht im Einklang mit früheren Studien, die gezeigt haben, dass die durch Antikörper vermittelte Hemmung von γ c die Expression von IFN- γ und IL-6 reduziert (104). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine hohe γ c-Expression eine pro-inflammatorische Umgebung fördern kann, was potenziell zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beiträgt (16).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die γ c-Expression eine entscheidende Rolle bei der Regulation der T-Zell-Aktivität und der Vermittlung der Immunantwort spielt. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Bedeutung einer präzisen γ c-Regulation für die T-Zell-Funktion und zeigen auf, dass Veränderungen in der γ c-Expression tiefgreifende Auswirkungen auf das Zytokinmilieu und die Immunreaktionen haben können.

4.4 Ausblick

Die vorliegende Studie liefert wichtige Erkenntnisse über die Rolle der γc -Expression bei der Regulation von T-Zellantworten und Immunhomöostase. Meine Ergebnisse legen nahe, dass eine Modulation der γc -Expression potenziell weitreichende Auswirkungen auf den Phänotyp und die Funktion von T-Zellen hat. Es ist jedoch wichtig, einige Einschränkungen dieser Studie zu berücksichtigen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die γc -Expression eine entscheidende Rolle bei der Regulation der T-Zell-Aktivität und der Vermittlung der Immunantwort spielt. Die Unterschiede in der γc -Expression beeinflussen nicht nur das Überleben und das Wachstum der T-Zellen, sondern auch die Signaltransduktion und die Zytokinproduktion, was weitreichende Auswirkungen auf die Immunpathologie und die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen haben könnte. Zukünftige Forschungsarbeiten sollten darauf abzielen, die genauen Mechanismen, durch die γc die T-Zell-Funktion reguliert, weiter zu untersuchen, die auf die γc -Expression abzielen, um die Immunantwort bei Autoimmunerkrankungen besser zu verstehen.

In Erweiterung dieser Erkenntnisse haben unsere Untersuchungen auch gezeigt, dass die verstärkte Signaltransduktion über den STAT-Weg in γc -high T-Zellen zu einer differenzierten Immunantwort führt. Die erhöhte Phosphorylierung von STAT5, STAT1 und STAT3 deutet darauf hin, dass eine hohe γc -Expression nicht nur die Zellproliferation unterstützt, sondern auch spezifische Signalkaskaden aktiviert, die für die T-Zell-Funktion und -Differenzierung entscheidend sind. Die Tatsache, dass diese Effekte in γc -low und γc -medium-low T-Zellen nicht beobachtet wurden, unterstreicht die Bedeutung einer ausreichend hohen γc -Expression für die effiziente T-Zell-Signalübertragung.

Darüber hinaus legen unsere Daten nahe, dass die modulierte γc -Expression tiefgreifende Auswirkungen auf das Zytokinprofil der T-Zellen hat. Die erhöhte Sekretion von IFN- γ , IL-6 und IL-5 in γc -high T-Zellen könnte auf eine veränderte Balance zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Signalen hindeuten. Dies könnte dazu beitragen, die erhöhte inflammatorische Aktivität zu erklären, die häufig bei Autoimmunerkrankungen beobachtet wird. Die Identifikation

dieser veränderten Zytokinmuster bietet wertvolle Einblicke in die potenziellen Mechanismen, durch die γ_c zur Immunpathologie beiträgt.

Abschließend ist festzuhalten, dass die umfassende Charakterisierung der γ_c -Expression und ihrer Auswirkungen auf die T-Zell-Funktion und das Zytokinmilieu neue Perspektiven für das Verständnis der Immunregulation bietet. Die Feststellung, dass γ_c -high T-Zellen eine veränderte Zytokinsekretion und Signaltransduktion aufweisen, unterstreicht die Komplexität der γ_c -vermittelten Immunantworten. Zukünftige Studien sollten darauf abzielen, die molekularen Mechanismen weiter zu entschlüsseln, die diese Veränderungen vermitteln, und mögliche therapeutische Strategien zu entwickeln, die die γ_c -Expression gezielt modulieren, um pathologische Immunreaktionen zu verhindern oder zu mildern.

Abschließend lässt sich festhalten, dass diese Studie wichtige Hinweise auf die multifunktionale Rolle der γ_c -Expression in der T-Zell-Biologie liefert. Die Erkenntnisse über die modulierte γ_c -Expression und ihre weitreichenden Auswirkungen auf die T-Zell-Funktion und die Immunantworten öffnen neue Wege für das Verständnis und die gezielte Steuerung immunologischer Prozesse. Insbesondere die veränderten Zytokinprofile und Signaltransduktionswege in γ_c -high T-Zellen könnten Schlüsselmechanismen sein, die bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen. Zukünftige Forschungsarbeiten sollten daher nicht nur die genauen molekularen Mechanismen weiter aufklären, sondern auch untersuchen, wie eine gezielte Beeinflussung der γ_c -Expression therapeutisch genutzt werden könnte, um dysregulierte Immunantworten zu modulieren und damit zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien für Autoimmunerkrankungen beizutragen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die gemeinsamen Signalwege der γ -Zytokin-Familie haben einen Einfluss auf das funktionelle Schicksal von T-Zellen im Rahmen des adoptiven Zelltransfers. Diese Zytokine, nämlich IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21, interagieren mit ihren einzigartigen Zytokin-Rezeptoren. Die Signalwege, die von diesen Rezeptoren ausgehen, führen zu vielfältigen biologischen Ergebnissen, die wiederum die Differenzierung, Effektorfunktion und Gedächtnisentwicklung von T-Zellen beeinflussen.....	5
Abbildung 2 Jeder Rezeptor der γ -Zytokin-Familie bildet in Kombination mit der Gamma-Ketten-Untereinheit einen heterodimeren oder heterotrimeren Rezeptorkomplex. Durch die Bindung der Zytokine erfolgt die Phosphorylierung von JAK1 und JAK3, was wiederum die Aktivierung von STAT-Mitgliedern zur Folge hat. Diese aktivierten STAT-Moleküle wandern in den Zellkern und beeinflussen dort die Expression spezifischer Zielgene.	7

Literaturverzeichnis

1. Seyfarth, J.; Mütze, N.; Antony Cruz, J.; Kummer, S.; Reinauer, C.; Mayatepek, E.; Meissner, T.; Jacobsen, M. CD4⁺ T-Cells With High Common γ Chain Expression and Disturbed Cytokine Production Are Enriched in Children With Type-1 Diabetes. *Frontiers in immunology [Online]* **2019**, *10*, 820.
2. Biron, C. A. Innate Immunity. *Viral Pathogenesis*; Elsevier, 2016; pp 41–55.
3. McDonald, D. R.; Levy, O. Innate Immunity. *Clinical Immunology*; Elsevier, 2019; 39-53.e1.
4. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology [Online]* **2010**, *125* (2 Suppl 2), S3-23.
5. Parham, P. *The immune system*, Fourth edition; Garland Science, an imprint of Taylor and Francis: Boca Raton, FL, 2014.
6. Byrne, J. A.; Butler, J. L.; Cooper, M. D. Differential activation requirements for virgin and memory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Online]* **1988**, *141* (10), 3249–3257.
7. Tay, R. E.; Richardson, E. K.; Toh, H. C. Revisiting the role of CD4⁺ T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms. *Cancer gene therapy [Online]* **2021**, *28* (1-2), 5–17.
8. Luckheeram, R. V.; Zhou, R.; Verma, A. D.; Xia, B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology [Online]* **2012**, *2012*, 925135.
9. Murphy, K.; Weaver, C. *Janeway's Immunobiology*, 9th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2016.
10. Hogquist, K. A.; Baldwin, T. A.; Jameson, S. C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature reviews. Immunology [Online]* **2005**, *5* (10), 772–782.
11. Kyewski, B.; Klein, L. A central role for central tolerance. *Annual review of immunology [Online]* **2006**, *24*, 571–606.

12. Shirafkan, F.; Hensel, L.; Rattay, K. Immune tolerance and the prevention of autoimmune diseases essentially depend on thymic tissue homeostasis. *Frontiers in immunology [Online]* **2024**, *15*, 1339714.
13. Grieco, F. A.; Vendrame, F.; Spagnuolo, I.; Dotta, F. Innate immunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. *Seminars in immunopathology [Online]* **2011**, *33* (1), 57–66.
14. Lis, J.; Jarząb, A.; Witkowska, D. Rola mimikry molekularnej w etiologii schorzeń o charakterze autoimmunizacyjnym. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online) [Online]* **2012**, *66*, 475–491.
15. Noguchi, M.; Yi, H.; Rosenblatt, H. M.; Filipovich, A. H.; Adelstein, S.; Modi, W. S.; McBride, O. W.; Leonard, W. J. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell [Online]* **1993**, *73* (1), 147–157.
16. Leonard, W. J. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nature reviews. Immunology [Online]* **2001**, *1* (3), 200–208.
17. Rochman, Y.; Spolski, R.; Leonard, W. J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nature reviews. Immunology [Online]* **2009**, *9* (7), 480–490.
18. Wang, H. M.; Smith, K. A. The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure. *The Journal of experimental medicine [Online]* **1987**, *166* (4), 1055–1069.
19. Nelson, B. H.; Willerford, D. M. Biology of the interleukin-2 receptor. *Advances in immunology [Online]* **1998**, *70*, 1–81.
20. Rickert, M.; Boulanger, M. J.; Goriatcheva, N.; Garcia, K. C. Compensatory energetic mechanisms mediating the assembly of signaling complexes between interleukin-2 and its alpha, beta, and gamma(c) receptors. *Journal of molecular biology [Online]* **2004**, *339* (5), 1115–1128.
21. Nakamura, Y.; Russell, S. M.; Mess, S. A.; Friedmann, M.; Erdos, M.; Francois, C.; Jacques, Y.; Adelstein, S.; Leonard, W. J. Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature [Online]* **1994**, *369* (6478), 330–333.

22. Nelson, B. H.; Lord, J. D.; Greenberg, P. D. Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature [Online]* **1994**, *369* (6478), 333–336.
23. Arima, N.; Kamio, M.; Imada, K.; Hori, T.; Hattori, T.; Tsudo, M.; Okuma, M.; Uchiyama, T. Pseudo-high affinity interleukin 2 (IL-2) receptor lacks the third component that is essential for functional IL-2 binding and signaling. *The Journal of experimental medicine [Online]* **1992**, *176* (5), 1265–1272.
24. Takeshita, T.; Asao, H.; Ohtani, K.; Ishii, N.; Kumaki, S.; Tanaka, N.; Munakata, H.; Nakamura, M.; Sugamura, K. Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science (New York, N.Y.) [Online]* **1992**, *257* (5068), 379–382.
25. Minami, Y.; Kono, T.; Miyazaki, T.; Taniguchi, T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annual review of immunology [Online]* **1993**, *11*, 245–268.
26. Becknell, B.; Caligiuri, M. A. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Advances in immunology [Online]* **2005**, *86*, 209–239.
27. Malek, T. R.; Bayer, A. L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature reviews. Immunology [Online]* **2004**, *4* (9), 665–674.
28. Gaffen, S. L. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine [Online]* **2001**, *14* (2), 63–77.
29. Malek, T. R.; Castro, I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity [Online]* **2010**, *33* (2), 153–165.
30. Kondo, M.; Takeshita, T.; Higuchi, M.; Nakamura, M.; Sudo, T.; Nishikawa, S.; Sugamura, K. Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes. *Science (New York, N.Y.) [Online]* **1994**, *263* (5152), 1453–1454.
31. McElroy, C. A.; Holland, P. J.; Zhao, P.; Lim, J.-M.; Wells, L.; Eisenstein, E.; Walsh, S. T. R. Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Online]* **2012**, *109* (7), 2503–2508.

32. Waickman, A. T.; Park, J.-Y.; Park, J.-H. The common γ -chain cytokine receptor: tricks-and-treats for T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS [Online]* **2016**, *73* (2), 253–269.
33. Barata, J. T.; Durum, S. K.; Seddon, B. Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nature immunology [Online]* **2019**, *20* (12), 1584–1593.
34. He, R.; Geha, R. S. Thymic stromal lymphopoietin. *Annals of the New York Academy of Sciences [Online]* **2010**, *1183*, 13–24.
35. Palmer, M. J.; Mahajan, V. S.; Trajman, L. C.; Irvine, D. J.; Lauffenburger, D. A.; Chen, J. Interleukin-7 receptor signaling network: an integrated systems perspective. *Cellular & molecular immunology [Online]* **2008**, *5* (2), 79–89.
36. Mackall, C. L.; Fry, T. J.; Gress, R. E. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nature reviews. Immunology [Online]* **2011**, *11* (5), 330–342.
37. Martin, C. E.; Spasova, D. S.; Frimpong-Boateng, K.; Kim, H.-O.; Lee, M.; Kim, K. S.; Surh, C. D. Interleukin-7 Availability Is Maintained by a Hematopoietic Cytokine Sink Comprising Innate Lymphoid Cells and T Cells. *Immunity [Online]* **2017**, *47* (1), 171-182.e4.
38. Takada, K.; Jameson, S. C. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nature reviews. Immunology [Online]* **2009**, *9* (12), 823–832.
39. Kaech, S. M.; Tan, J. T.; Wherry, E. J.; Konieczny, B. T.; Surh, C. D.; Ahmed, R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature immunology [Online]* **2003**, *4* (12), 1191–1198.
40. Waldmann, T. A.; Chen, J. Disorders of the JAK/STAT Pathway in T Cell Lymphoma Pathogenesis: Implications for Immunotherapy. *Annual review of immunology [Online]* **2017**, *35*, 533–550.
41. Leonard, W. J.; O'Shea, J. J. Jaks and STATs: biological implications. *Annual review of immunology [Online]* **1998**, *16*, 293–322.
42. Cai, T.; Lenoir Capello, R.; Pi, X.; Wu, H.; Chou, J. J. Structural basis of γ chain family receptor sharing at the membrane level. *Science (New York, N.Y.) [Online]* **2023**, *381* (6657), 569–576.

43. Levy, D. E.; Darnell, J. E. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews. Molecular cell biology [Online]* **2002**, 3 (9), 651–662.
44. Kaneko, S.; Suzuki, N.; Koizumi, H.; Yamamoto, S.; Sakane, T. Rescue by cytokines of apoptotic cell death induced by IL-2 deprivation of human antigen-specific T cell clones. *Clinical and experimental immunology [Online]* **1997**, 109 (1), 185–193.
45. Bergmann, A. K.; Schneppenheim, S.; Seifert, M.; Betts, M. J.; Haake, A.; Lopez, C.; Maria Murga Penas, E.; Vater, I.; Jayne, S.; Dyer, M. J. S.; Schrappe, M.; Dührsen, U.; Ammerpohl, O.; Russell, R. B.; Küppers, R.; Dürig, J.; Siebert, R. Recurrent mutation of JAK3 in T-cell prolymphocytic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer [Online]* **2014**, 53 (4), 309–316.
46. Degryse, S.; Bock, C. E. de; Cox, L.; Demeyer, S.; Gielen, O.; Mentens, N.; Jacobs, K.; Geerdens, E.; Gianfelici, V.; Hulselmans, G.; Fiers, M.; Aerts, S.; Meijerink, J. P.; Tousseyn, T.; Cools, J. JAK3 mutants transform hematopoietic cells through JAK1 activation, causing T-cell acute lymphoblastic leukemia in a mouse model. *Blood [Online]* **2014**, 124 (20), 3092–3100.
47. Koo, G. C.; Tan, S. Y.; Tang, T.; Poon, S. L.; Allen, G. E.; Tan, L.; Chong, S. C.; Ong, W. S.; Tay, K.; Tao, M.; Quek, R.; Loong, S.; Yeoh, K.-W.; Yap, S. P.; Lee, K. A.; Lim, L. C.; Tan, D.; Goh, C.; Cutcutache, I.; Yu, W.; Ng, C. C. Y.; Rajasegaran, V.; Heng, H. L.; Gan, A.; Ong, C. K.; Rozen, S.; Tan, P.; Teh, B. T.; Lim, S. T. Janus kinase 3-activating mutations identified in natural killer/T-cell lymphoma. *Cancer discovery [Online]* **2012**, 2 (7), 591–597.
48. Kiel, M. J.; Velusamy, T.; Rolland, D.; Sahasrabudde, A. A.; Chung, F.; Bailey, N. G.; Schrader, A.; Li, B.; Li, J. Z.; Ozel, A. B.; Betz, B. L.; Miranda, R. N.; Medeiros, L. J.; Zhao, L.; Herling, M.; Lim, M. S.; Elenitoba-Johnson, K. S. J. Integrated genomic sequencing reveals mutational landscape of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood [Online]* **2014**, 124 (9), 1460–1472.
49. Rajala, H. L. M.; Eldfors, S.; Kuusanmäki, H.; van Adrichem, A. J.; Olson, T.; Lagström, S.; Andersson, E. I.; Jerez, A.; Clemente, M. J.; Yan, Y.; Zhang, D.; Awwad, A.; Ellonen, P.; Kallioniemi, O.; Wennerberg, K.; Porkka, K.; Maciejewski, J. P.; Loughran, T. P.; Heckman, C.; Mustjoki, S. Discovery of somatic STAT5b

- mutations in large granular lymphocytic leukemia. *Blood [Online]* **2013**, *121* (22), 4541–4550.
50. Adkins, B.; Chun, K.; Hamilton, K.; Nassiri, M. Naive murine neonatal T cells undergo apoptosis in response to primary stimulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Online]* **1996**, *157* (4), 1343–1349.
51. Ayroldi, E.; Zollo, O.; Cannarile, L.; Adamio, F. d'; Grohmann, U.; Delfino, D. V.; Riccardi, C. Interleukin-6 (IL-6) prevents activation-induced cell death: IL-2-independent inhibition of Fas/fasL expression and cell death. *Blood [Online]* **1998**, *92* (11), 4212–4219.
52. Li, B.; Jones, L. L.; Geiger, T. L. IL-6 Promotes T Cell Proliferation and Expansion under Inflammatory Conditions in Association with Low-Level ROR γ t Expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Online]* **2018**, *201* (10), 2934–2946.
53. Lan, R. Y.; Selmi, C.; Gershwin, M. E. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). *Journal of autoimmunity [Online]* **2008**, *31* (1), 7–12.
54. Markiewicz, S.; Bosselut, R.; Le Deist, F.; Villartay, J. P. de; Hivroz, C.; Ghysdael, J.; Fischer, A.; Saint Basile, G. de. Tissue-specific activity of the gammac chain gene promoter depends upon an Ets binding site and is regulated by GA-binding protein. *The Journal of biological chemistry [Online]* **1996**, *271* (25), 14849–14855.
55. McCaughtry, T. M.; Etzensperger, R.; Alag, A.; Tai, X.; Kurtulus, S.; Park, J.-H.; Grinberg, A.; Love, P.; Feigenbaum, L.; Erman, B.; Singer, A. Conditional deletion of cytokine receptor chains reveals that IL-7 and IL-15 specify CD8 cytotoxic lineage fate in the thymus. *The Journal of experimental medicine [Online]* **2012**, *209* (12), 2263–2276.
56. Kondo, M.; Ohashi, Y.; Tada, K.; Nakamura, M.; Sugamura, K. Expression of the mouse interleukin-2 receptor gamma chain in various cell populations of the thymus and spleen. *European journal of immunology [Online]* **1994**, *24* (9), 2026–2030.
57. Hong, C.; Luckey, M. A.; Ligons, D. L.; Waickman, A. T.; Park, J.-Y.; Kim, G. Y.; Keller, H. R.; Etzensperger, R.; Tai, X.; Lazarevic, V.; Feigenbaum, L.; Catalfamo,

- M.; Walsh, S. T. R.; Park, J.-H. Activated T cells secrete an alternatively spliced form of common γ -chain that inhibits cytokine signaling and exacerbates inflammation. *Immunity [Online]* **2014**, *40* (6), 910–923.
58. Nakarai, T.; Robertson, M. J.; Streuli, M.; Wu, Z.; Ciardelli, T. L.; Smith, K. A.; Ritz, J. Interleukin 2 receptor gamma chain expression on resting and activated lymphoid cells. *The Journal of experimental medicine [Online]* **1994**, *180* (1), 241–251.
59. Kalia, V.; Sarkar, S.; Subramaniam, S.; Haining, W. N.; Smith, K. A.; Ahmed, R. Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8⁺ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity [Online]* **2010**, *32* (1), 91–103.
60. Kim, H. P.; Imbert, J.; Leonard, W. J. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine & growth factor reviews [Online]* **2006**, *17* (5), 349–366.
61. Lenardo, M. J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature [Online]* **1991**, *353* (6347), 858–861.
62. D'Souza, W. N.; Lefrançois, L. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Online]* **2003**, *171* (11), 5727–5735.
63. Liao, W.; Lin, J.-X.; Wang, L.; Li, P.; Leonard, W. J. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nature immunology [Online]* **2011**, *12* (6), 551–559.
64. Le Gros, G.; Ben-Sasson, S. Z.; Seder, R.; Finkelman, F. D.; Paul, W. E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *The Journal of experimental medicine [Online]* **1990**, *172* (3), 921–929.
65. Cote-Sierra, J.; Foucras, G.; Guo, L.; Chiodetti, L.; Young, H. A.; Hu-Li, J.; Zhu, J.; Paul, W. E. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Online]* **2004**, *101* (11), 3880–3885.
66. Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell [Online]* **2008**, *133* (5), 775–787.

67. Antov, A.; Yang, L.; Vig, M.; Baltimore, D.; van Parijs, L. Essential role for STAT5 signaling in CD25+CD4+ regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Online]* **2003**, 171 (7), 3435–3441.
68. Bayer, A. L.; Yu, A.; Adeegbe, D.; Malek, T. R. Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period. *The Journal of experimental medicine [Online]* **2005**, 201 (5), 769–777.
69. Pandiyan, P.; Lenardo, M. J. The control of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell survival. *Biology direct [Online]* **2008**, 3, 6.
70. Mazzucchelli, R.; Durum, S. K. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature reviews. Immunology [Online]* **2007**, 7 (2), 144–154.
71. Surh, C. D.; Sprent, J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity [Online]* **2008**, 29 (6), 848–862.
72. Alves, N. L.; van Leeuwen, E. M. M.; Derks, I. A. M.; van Lier, R. A. W. Differential regulation of human IL-7 receptor alpha expression by IL-7 and TCR signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Online]* **2008**, 180 (8), 5201–5210.
73. Schluns, K. S.; Kieper, W. C.; Jameson, S. C.; Lefrançois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nature immunology [Online]* **2000**, 1 (5), 426–432.
74. Guimond, M.; Veenstra, R. G.; Grindler, D. J.; Zhang, H.; Cui, Y.; Murphy, R. D.; Kim, S. Y.; Na, R.; Hennighausen, L.; Kurtulus, S.; Erman, B.; Matzinger, P.; Merchant, M. S.; Mackall, C. L. Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nature immunology [Online]* **2009**, 10 (2), 149–157.
75. Park, J.-H.; Yu, Q.; Erman, B.; Appelbaum, J. S.; Montoya-Durango, D.; Grimes, H. L.; Singer, A. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity [Online]* **2004**, 21 (2), 289–302.
76. Park, J.-H.; Adoro, S.; Lucas, P. J.; Sarafova, S. D.; Alag, A. S.; Doan, L. L.; Erman, B.; Liu, X.; Ellmeier, W.; Bosselut, R.; Feigenbaum, L.; Singer, A.

- 'Coreceptor tuning': cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR. *Nature immunology [Online]* **2007**, *8* (10), 1049–1059.
77. Puel, A.; Ziegler, S. F.; Buckley, R. H.; Leonard, W. J. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nature genetics [Online]* **1998**, *20* (4), 394–397.
78. Russell, S. M.; Tayebi, N.; Nakajima, H.; Riedy, M. C.; Roberts, J. L.; Aman, M. J.; Migone, T. S.; Noguchi, M.; Markert, M. L.; Buckley, R. H.; O'Shea, J. J.; Leonard, W. J. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science (New York, N.Y.) [Online]* **1995**, *270* (5237), 797–800.
79. Macchi, P.; Villa, A.; Giliani, S.; Sacco, M. G.; Frattini, A.; Porta, F.; Ugazio, A. G.; Johnston, J. A.; Candotti, F.; O'Shea, J. J. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature [Online]* **1995**, *377* (6544), 65–68.
80. Gupta, S.; Cerosaletti, K.; Long, S. A. Renegade homeostatic cytokine responses in T1D: drivers of regulatory/effector T cell imbalance. *Clinical immunology (Orlando, Fla.) [Online]* **2014**, *151* (2), 146–154.
81. Deshpande, P.; Cavanagh, M. M.; Le Saux, S.; Singh, K.; Weyand, C. M.; Goronzy, J. J. IL-7- and IL-15-mediated TCR sensitization enables T cell responses to self-antigens. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Online]* **2013**, *190* (4), 1416–1423.
82. Calzascia, T.; Pellegrini, M.; Lin, A.; Garza, K. M.; Elford, A. R.; Shahinian, A.; Ohashi, P. S.; Mak, T. W. CD4 T cells, lymphopenia, and IL-7 in a multistep pathway to autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Online]* **2008**, *105* (8), 2999–3004.
83. Penaranda, C.; Kuswanto, W.; Hofmann, J.; Kenefeck, R.; Narendran, P.; Walker, L. S. K.; Bluestone, J. A.; Abbas, A. K.; Dooks, H. IL-7 receptor blockade reverses autoimmune diabetes by promoting inhibition of effector/memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Online]* **2012**, *109* (31), 12668–12673.

84. Monti, P.; Brigatti, C.; Heninger, A. K.; Scirpoli, M.; Bonifacio, E. Disengaging the IL-2 receptor with daclizumab enhances IL-7-mediated proliferation of CD4(+) and CD8(+) T cells. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons [Online]* **2009**, 9 (12), 2727–2735.
85. Güler, A.; Lopez Venegas, M.; Adankwah, E.; Mayatepek, E.; Nausch, N.; Jacobsen, M. Suppressor of cytokine signalling 3 is crucial for interleukin-7 receptor re-expression after T-cell activation and interleukin-7 dependent proliferation. *European journal of immunology [Online]* **2020**, 50 (2), 234–244.
86. Read, K. A.; Powell, M. D.; McDonald, P. W.; Oestreich, K. J. IL-2, IL-7, and IL-15: Multistage regulators of CD4(+) T helper cell differentiation. *Experimental hematology [Online]* **2016**, 44 (9), 799–808.
87. Demirci, G.; Strom, T. B.; Li, X. C. Islet allograft rejection in nonobese diabetic mice involves the common gamma-chain and CD28/CD154-dependent and -independent mechanisms. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Online]* **2003**, 171 (7), 3878–3885.
88. Lee, B.; Jo, Y.; Kim, G.; Ali, L. A.; Sohn, D. H.; Lee, S.-G.; Kim, K.; Shin, E.; Ryu, S. H.; Hong, C. Specific Inhibition of Soluble γ c Receptor Attenuates Collagen-Induced Arthritis by Modulating the Inflammatory T Cell Responses. *Frontiers in immunology [Online]* **2019**, 10, 209.
89. Ring, A. M.; Lin, J.-X.; Feng, D.; Mitra, S.; Rickert, M.; Bowman, G. R.; Pande, V. S.; Li, P.; Moraga, I.; Spolski, R.; Ozkan, E.; Leonard, W. J.; Garcia, K. C. Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nature immunology [Online]* **2012**, 13 (12), 1187–1195.
90. Corcoran, A. E.; Smart, F. M.; Cowling, R. J.; Crompton, T.; Owen, M. J.; Venkitaraman, A. R. The interleukin-7 receptor alpha chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis. *The EMBO journal [Online]* **1996**, 15 (8), 1924–1932.
91. Noguchi, M.; Nakamura, Y.; Russell, S. M.; Ziegler, S. F.; Tsang, M.; Cao, X.; Leonard, W. J. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science (New York, N.Y.) [Online]* **1993**, 262 (5141), 1877–1880.

92. Leonard, W. J.; Shores, E. W.; Love, P. E. Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunological reviews [Online]* **1995**, *148*, 97–114.
93. Gonnord, P.; Angermann, B. R.; Sadtler, K.; Gombos, E.; Chappert, P.; Meier-Schellersheim, M.; Varma, R. A hierarchy of affinities between cytokine receptors and the common gamma chain leads to pathway cross-talk. *Science signaling* **2018**, *11* (524). DOI: 10.1126/scisignal.aal1253.
94. Waickman, A. T.; Keller, H. R.; Kim, T.-H.; Luckey, M. A.; Tai, X.; Hong, C.; Molina-París, C.; Walsh, S. T. R.; Park, J.-H. The Cytokine Receptor IL-7R α Impairs IL-2 Receptor Signaling and Constrains the In Vitro Differentiation of Foxp3+ Treg Cells. *iScience [Online]* **2020**, *23* (8), 101421.
95. Henriques, C. M.; Rino, J.; Nibbs, R. J.; Graham, G. J.; Barata, J. T. IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R α in T cells. *Blood [Online]* **2010**, *115* (16), 3269–3277.
96. Ponce, L. F.; García-Martínez, K.; León, K. Quantitative Contribution of IL2R γ to the Dynamic Formation of IL2-IL2R Complexes. *PloS one [Online]* **2016**, *11* (5), e0155684.
97. Orr, S. J.; Roessler, S.; Quigley, L.; Chan, T.; Ford, J. W.; O'Connor, G. M.; McVicar, D. W. Implications for gene therapy-limiting expression of IL-2R gamma c delineate differences in signaling thresholds required for lymphocyte development and maintenance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Online]* **2010**, *185* (3), 1393–1403.
98. Maier, L. M.; Lowe, C. E.; Cooper, J.; Downes, K.; Anderson, D. E.; Severson, C.; Clark, P. M.; Healy, B.; Walker, N.; Aubin, C.; Oksenberg, J. R.; Hauser, S. L.; Compston, A.; Sawcer, S.; Jager, P. L. de; Wicker, L. S.; Todd, J. A.; Hafler, D. A. IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. *PLoS Genetics [Online]* **2009**, *5* (1), e1000322.
99. Boyman, O.; Sprent, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature reviews. Immunology [Online]* **2012**, *12* (3), 180–190.

100. Fry, T. J.; Mackall, C. L. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood [Online]* **2002**, *99* (11), 3892–3904.
101. Nishio, J.; Kohsaka, H.; Shimamura, T.; Hamuro, J.; Miyasaka, N. Abundant expression of common cytokine receptor gamma chain (CD132) in rheumatoid joints. *The Journal of rheumatology [Online]* **2001**, *28* (2), 240–244.
102. Lin, J.-X.; Leonard, W. J. The Common Cytokine Receptor γ Chain Family of Cytokines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2018**, *10* (9). DOI: 10.1101/cshperspect.a028449.
103. Smyth, C. M.; Ginn, S. L.; Deakin, C. T.; Logan, G. J.; Alexander, I. E. Limiting γ c expression differentially affects signaling via the interleukin (IL)-7 and IL-15 receptors. *Blood [Online]* **2007**, *110* (1), 91–98.
104. Hechinger, A.-K.; Smith, B. A. H.; Flynn, R.; Hanke, K.; McDonald-Hyman, C.; Taylor, P. A.; Pfeifer, D.; Hackanson, B.; Leonhardt, F.; Prinz, G.; Dierbach, H.; Schmitt-Graeff, A.; Kovarik, J.; Blazar, B. R.; Zeiser, R. Therapeutic activity of multiple common γ -chain cytokine inhibition in acute and chronic GVHD. *Blood [Online]* **2015**, *125* (3), 570–580.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Marc Jacobsen und Dr. Julia Seyfarth bedanken, dass ich die Dissertation unter Ihrer Betreuung anfertigen durfte. Die letzten drei Jahre haben mir viel Freude bereitet. Ich habe viel Neues gelernt und konnte mich stets auf Ihre Unterstützung verlassen.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Philipp Lang für die Übernahme der Zweitbetreuung bedanken.

Herzlichen Dank auch an meine Büro-Kollegen Jean De Dieu Harelimana, Hubert Senanu Ahor und Wilfred Aniagyei. Durch die fachlichen und außerfachlichen Diskussionen wurde es nie langweilig. Die fachlichen Diskussionen haben zudem viele Lösungsansätze hervorgebracht.

Ein großer Dank geht an unsere medizinischen Doktoranden und Masterstudenten Bastian, Josephine, Johanna, Sabine, Rosie, Sophie, Maryam, Steffen, Souhaila und Katharina für die großartige Zusammenarbeit und den wertvollen Austausch.

Vielen Dank an das gesamte Stoffwechsellabor für die stetige Hilfe bei auftauchenden Problemen und die netten Gespräche in der Küche. Ich habe mich im Labor immer wohl gefühlt!

Ein besonderer Dank geht an die wahre Heldin des Labors, Anette Seibt. Durch ihren unermüdlichen Einsatz und ihre Hilfsbereitschaft bei jedem Problem war sie eine unverzichtbare Unterstützung.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken. Sie haben mich bei jedem Weg, den ich eingeschlagen habe, unterstützt. Ich danke Ihnen, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, diesen Weg bis hierhin zu gehen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Suebin Jo. Ich möchte Dir für Deinen dauerhaften Rückhalt und Dein Vertrauen besonders danken. Du hast mich in den Höhen und Tiefen während meiner Arbeit begleitet und mir das Ja-Wort gegeben. Danke!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den _____

Ju-Young Kim